

УДК 57.085.23

КУЛЬТУРА SHED – МИКРОСПОР ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

А.О. Блинков^{1,2}, В.С. Рубец², М.Р. Халилуев^{1,2}¹ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия² Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Гаплоидные технологии стали незаменимым инструментом в селекции растений, с их помощью стало возможным закреплять ценные рецессивные признаки, проводить за короткие сроки интрогрессии генов устойчивости при отдалённой гибридизации, осуществлять манипуляции с уровнями пloidности и за один сезон получать чистые линии. Для эффективной работы с данными методами необходима большая исходная популяция удвоенных гаплоидов, однако до сих пор ограничивающими факторами у злаков остаются низкий уровень формирования эмбриоидов, трудности с регенерацией и дигаплоидизацией, а также альбинизм. В связи с этим, важной составляющей современных исследований является повышение эффективности формирования эмбриогенных структур при культивировании различных эксплантов: пыльников и микроспор. Подбор условий и режимов для выделения микроспор у самоопыляющихся злаков особенно важен, поскольку у них непрочная экзина, разрушение которой приводит к их гибели и снижению выхода гаплоидных растений соответственно.

За основу настоящей работы для изолирования и культивирования микроспор был использован немеханический метод их выделения, который в английской научной литературе называют shed-microspores culture. Его преимуществом является простота и меньшая подверженность микроспор стрессам, в отличие от механического изолирования, в котором присутствуют такие этапы как измельчение растительного материала, многократные центрифугирования, отделение дебриса через ряд фильтров. Несмотря на то, что данному методу выделения микроспор посвящено мало работ (Ziauddin et al., 1990; Supena et al., 2006; Ari et al., 2016), во всех случаях отмечается тенденция к формированию максимального количества эмбриоподобных структур. Таким образом, целью данной работы являлась оценка эффективности культивирования shed – микроспор на выход гаплоидных растений озимой тритикале.

Растительным материалом для исследований служили гибриды озимой тритикале: F₂ 130h, F₂ 967h и F₃ 557h. Донорные растения выращивали в полевых условиях. Предварительно колосья, содержащие ранние одноядерные микроспоры, выдерживали при 4 °С в течение 14 суток. За этот период времени микроспоры достигали средней одноядерной вакуолизированной стадии развития.

Микроспоры изолировали двумя методами:

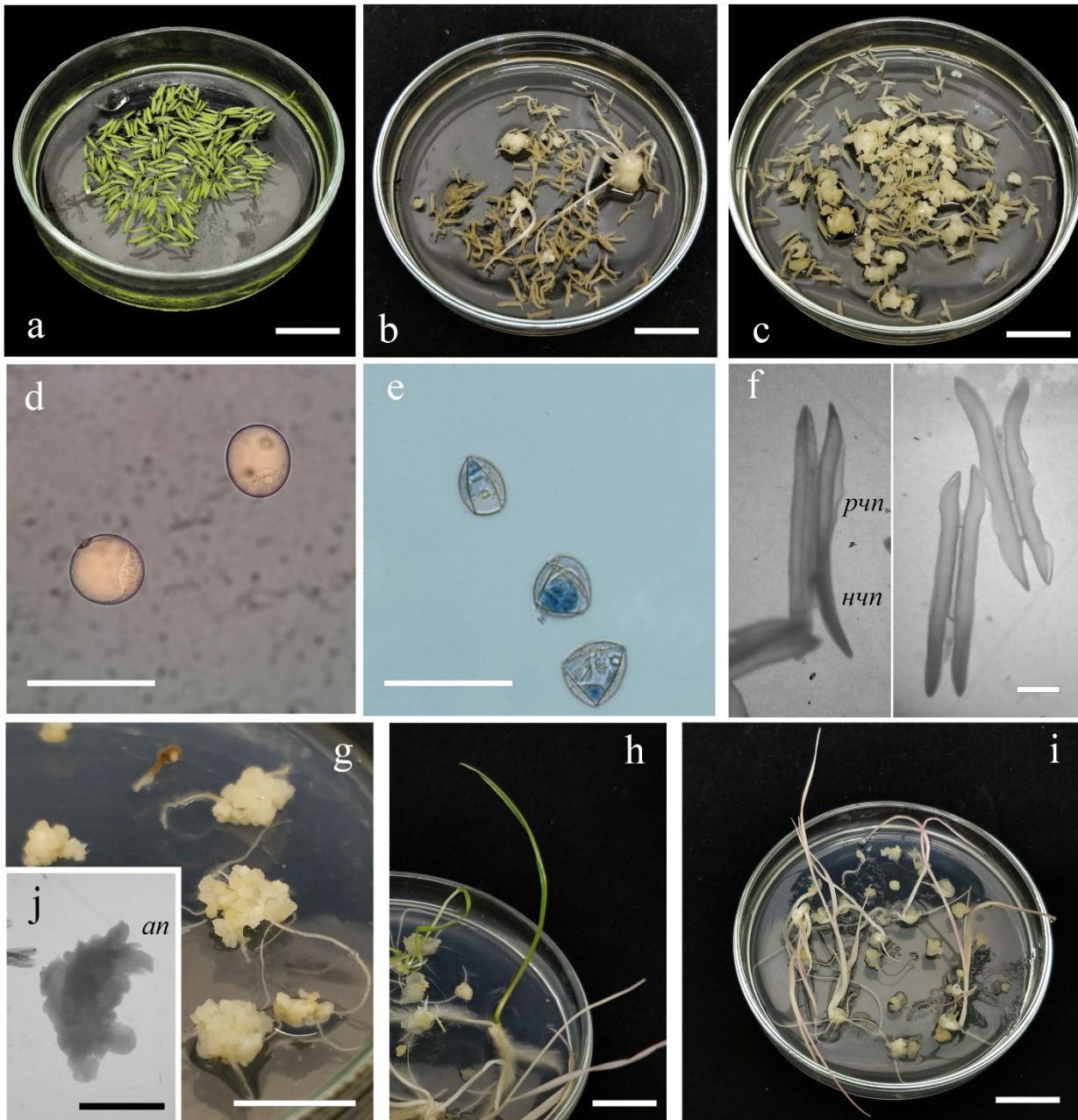
1. В различных концентрациях раствора маннитола (0,3 М, 0,5 М и 0,7 М), из расчёта пыльники двух колосьев/ 20 мл раствора маннитола (что составляет примерно 10 пыльников/1 мл). Инкубировали в темноте при 28 °С.

2. В неагаризованной питательной среде 190–2 с увеличенной концентрацией мальтозы до 90 г./л. Пыльники помещали в среду с такой же плотностью, как описано в первом методе. Микроспоры инкубировали в темноте при 28 °С до формирования эмбриоподобных структур.

Для сравнения эффективности культивирования shed – микроспор параллельно был проведен эксперимент по культивированию механически- изолированных микроспор согласно Pauk et al., 2000.

Оценку жизнеспособности микроспор осуществляли красителем Голубым Эванса. Новообразования переносили на агаризованную питательную среду 190–2Cu для формирования полноценных растений. Культивирование осуществляли при 16/8-часовом фотопериоде и температуре 25 °С.

Ни в одной из концентраций маннитола не наблюдался обильный выход микроспор на 3 сутки, хотя Ziauddin et al., 1990 описывает выход 2/3 микроспор ячменя в раствор 0,3 М маннитола в течение первых трёх дней. Начиная с 5 суток можно было заметить небольшой выход микроспор, который отмечали визуально по образованию мутной зернистой среды и цитологическому анализу. На 10 сутки пыльцевые мешки все ещё в основном были целиком заполнены микроспорами. Оценка жизнеспособности микроспор на 10 сутки культивирования в маннитолу показала высокую степень плазмолиза (Рис. е). В связи с высокой гибелью микроспор дальнейшую работу по их культивированию данным методом мы не производили.



При использовании второго метода наблюдался более дружный выход микроспор на пятые сутки, однако полного выхода микроспор не наблюдалось. В течение культивирования происходило раскрытие щелей и выход микроспор практически у всех культивируемых пыльников (Рис. f). На 10 сутки в среднем наблюдалось 40 % жизнеспособных микроспор (Рис. d). В работе Supena et al., 2006 пыльники перца раскрывались только после 2–3 недели культивирования. В то же время Ziauddin et al., 1990 сообщает, что при культивировании пыльников ячменя в жидкой питательной среде процент вышедших микроспор был очень мал и в дальнейшем, после отделения микроспор от пыльников они плазмолизировались.

Формирование эмбриоподобных структур наблюдалось на 5–6 неделю культивирования (Рис. b, c). Аналогичные сроки формирования новообразований сообщают и другие авторы для методов культивирования изолированных микроспор и пыльников (Pauk et al., 2000). Однако в работе Ziauddin et al., 1990 культивирование shed – микроспор способствовало скорейшему формированию эмбриоидов в 2 раза. В основном все полученные эмбриоподобные структуры формировались непосредственно вне пыльников, что идентично результатам Supena et al., 2006.

Культивирование shed – микроспор озимой тритикале показало высокую эффективность: гаплоидные растения были получены у всех изучаемых генотипов. В основном происходило формирование каллуса (рис. j). Для гибрида F₂ 130h средний выход составил 3 новообразования (рис. b), для F₂ 967h 60 новообразований и для гибрида F₃ 557h 116,7 новообразований (рис. c) на 200 пыльников. Механическое изолирование микроспор оказалось безрезультатным, подобную ситуацию описывает Ziauddin et al., 1990, который сообщает, что трудно повторить процедуры других лабораторий, вероятно из-за сильного влияния роста растений.

Количество регенерированных растений составило в среднем 24 % от общего количества эмбрионных структур, из которых только 10 % оказались зелёными (рис. h). Формирование неморфогенных каллусов (рис. g) и высокий уровень растений – альбиносов (рис. i) являются для нас главными проблемами, которые в дальнейшем мы собираемся решать. Трудности при использовании данного метода описывают и другие авторы: формирование многоклеточных структур без последующей регенерации (Ziauddin et al., 1990), формирование дефектных, не способных к росту, верхушечных побегов у перца (Supena et al., 2006).

Механизм, при котором происходит растрескивание незрелых пыльников с последующим выходом микроспор до сих пор точно не описан. Ziauddin et al., 1990 предполагает, что возможно роль играет кратковременное голодание в растворе маннитола, которое приводит к быстрому старению стенок пыльника. Мы же, основываясь на том, что культура shed – микроспор возможна и в жидких питательных средах (Supena et al., 2006) выдвигаем гипотезу, что быстрое растрескивание пыльников в культуре *in vitro* (растрескивание *in vivo* происходит гораздо позже во время цветения) возникает из-за осмотического давления среды, в которой они находятся.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J. Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri //Plant cell reports. – 1990. – Т. 9. – №. 2. – С. 69–72.
2. Pauk J. et al. In vitro androgenesis of triticales in isolated microspore culture //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – Т. 61. – №. 3. – С. 221–229.
3. Supena E.D.J. et al. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) //Plant cell reports. – 2006. – Т. 25. – №. 1. – С. 1–10.
4. Ari E. et al. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season //Turkish Journal of Biology. – 2016. – Т. 40. – №. 3. – С. 706–717.