УДК 633.1:633.31/37:57.085.2

DOI: 10.31563/1684-7628-2018-48-4-34-39

Н.Н. Круглова, В.И. Никонов

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ОПТИМАЛЬНОЙ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ПЫЛЬНИКА ПРИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ**Ключевые слова:** пыльник; микроспора; биотехнология; культура *in vitro*; яровая мягкая пшеница; *Triticum aestivum* L.

Введение. Современные биотехнологические методы культуры *in vitro* кардинально меняют процесс селекционной работы по получению высокопродуктивных гибридных линий и сортов яровой мягкой пшеницы, устойчивых к неблагоприятным факторам конкретного региона. Практическую значимость методов культуры *in vitro* различных эксплантов определяет образование на конечном этапе полноценных фертильных растений-регенерантов [1–3]. Перспективное экспериментальное направление в этой области исследований – метод культуры *in vitro* пыльников. В основе метода лежит уникальный феномен андроклинии (в другой терминологии – андрогенез *in vitro*), состоящий в образовании растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника. При этом такая клетка переключает программу развития с обычного гаметофитного пути, ведущего в естественных условиях к формированию пыльцевого зерна (гаметофита), на принципиально иной – спорофитный – путь развития, ведущий в условиях культуры *in vitro* к формированию растения (спорофита) [4].

Метод культуры *in vitro* пыльников в настоящее время – один из немногих способов закрепления гетерозисного эффекта у гибридов первого поколения. Кроме того, использование этого метода позволяет получать гомозиготные константные линии гибридов за сравнительно короткое время, что значительно сокращает сроки селекции. Данный метод облегчает отбор ценных генотипов, возникающих в результате рекомбинации генетических факторов родительских форм, что дает возможность ускоренной оценки перспективности гибридных популяций или мутантных форм [5, 6]. В то же время широкому внедрению метода культуры *in vitro* пыльников в селекционную практику препятствует ряд обстоятельств, важнейшее среди которых – низкий выход андроклинных регенерантов. Основная проблема, связанная с разработкой эффективной биотехнологии массового стабильного получения андроклинных регенерантов, состоит в выявлении и использовании стадии развития пыльника, биотехнологически оптимальной при инокуляции пыльников на питательную среду *in vitro*. На примере яровой мягкой пшеницы установлено, что такие пыльники находятся в стадии «созревание» и содержат

сильновакуолизированные микроспоры (по периодизации [7]); дано обоснование таких микроспор как инициальных клеток андроклинии, при этом показано, что сильновакуолизированная микроспора обладает структурными свойствами меристематических клеток и тем самым сходна с ранней яйцеклеткой-зиготой, дающей начало зиготическому зародышу при амфимиксисе, и клетками зародышевого мешка, нуцеллуса и интегумента, образующими адвентивные зародыши при апомиксисе [4, 5, 8]. Сильновакуолизированную микроспору по ряду признаков предложено расценивать как ствольную клетку [9].

Для эффективных массовых биотехнологических исследований важно использовать простой и надежный критерий выявления стадии развития пыльника, оптимальной для инокуляции *in vitro* (иначе говоря – содержащего сильновакуолизированные микроспоры). Такого рода исследования для пшеницы немногочисленны и достаточно противоречивы. Так, предложено использовать подсчет колосков в колосе донорного растения пшеницы в фенофазе выхода в трубку и инокулировать только пыльники центрального колоска [10]. В работе [3] используются результаты цитологического контроля состояния микроспор/пыльцевых зерен в инокулируемых пыльниках пшеницы. Нерентабельность первого и трудоемкость второго из этих подходов снижают эффективность биотехнологии получения регенерантов методом культуры пыльников *in vitro*.

Предложено перед инокуляцией пыльников яровой мягкой пшеницы оценивать следующие параметры донорного растения: расстояние между двумя предпоследними листьями; расстояние от кончика колоса до флагового листа; соотношение между этими двумя величинами [11], при этом фенотипическим критерием для срезания колоса следует считать расположение кончика колоса на 1/5 расстояния между лигулой предпоследнего листа и флаговым листом [12]. Такая быстрая оценка удобна при массовой работе с культивируемыми пыльниками, однако необходимо уточнять данный критерий для каждого вводимого в биотехнологический процесс генотипа яровой мягкой пшеницы.

Цель работы состояла в детализации указанного морфометрического критерия оптимальной для индукции андроклинии стадии раз-

вития пыльника у ряда генотипов яровой мягкой пшеницы с целью получения регенерантов из входящих в его состав сильновакуолизированных микроспор.

Объект, методы и условия исследований.

Объектом исследования послужили сорта яровой мягкой пшеницы: Жница, Московская 35, Саратовская 55, Симбирка, Скала, Соналика, а также линия Фотос, полученная в Башкирском НИИ СХ УФИЦ РАН. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии УФИЦ РАН (Уфимский район). Этапы органогенеза растений оценивали по [13]. Экспериментальную группу составляли 30 растений каждого исследуемого генотипа. Использовали авторскую периодизацию развития пыльника пшеницы, адаптированную к биотехнологическим исследованиям [7], при этом в развитии микроспоры выделяли фазы «тетрада микроспор», «невакуолизированная микроспора», «слабовакуолизированная микроспора» и «сильновакуолизированная микроспора», в развитии пыльцевого зерна – фазы «двуклеточное пыльцевое зерно» и «трехклеточное пыльцевое зерно».

Учитывали разработанные нами с эмбриологических позиций методические нюансы [14]: в силу асинхронности развития микроспор/пыльцевых зерен в пределах одного пыльника фазу развития микроспоры/пыльцевого зерна считали наступившей, если на этой фазе находилось преобладающее количество (не менее 70 %) микроспор / пыльцевых зерен; в силу асинхронности заложения и развития колосков по соцветию и цветков по колоску от каждого донорного растения исследовали только 3 пыльника нижнего цветка пяти колосков средней трети колоса, находящиеся в одной стадии развития, – всего 15 пыльников, которые оценивали как единую популяцию.

Подсчет в пыльнике количества микроспор/пыльцевых зерен определенной фазы развития проводили общепринятым способом с помощью счетной камеры Фукса – Розенталя. В качестве основы для разработки морфометрического критерия выявления пыльников на оптимальной для индукции андроклинии стадии развития использовали следующие показатели: расстояние от основания флагового листа до основания второго сверху листа и расстояние от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса. В работе использовали метод приготовления постоянных и временных цитологических препаратов [15]. Препараты просматривали и документировали при помощи светового микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Germany).

Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Excel 2010.

Результаты исследования и их обсуждение. Изученные сорта и линия яровой мягкой

пшеницы различались по темпам развития растения, колоса, колосков, цветков, пыльников. В целом этапы органогенеза (IV–VIII), во время которых происходит развитие колоса, колосков, цветков и пыльников, последовательность дифференциации колосков (начало – в средней части колоса и далее акропетально и базипетально) совпадали у изученных объектов и соответствовали данным, известным для яровой мягкой пшеницы [13].

Фенотипически начало развития пыльника определялось по началу интенсивного роста колосоносного междоузлия. При этом шла активная дифференциация колоса, интенсивно удлинялся флаговый лист, в то же время рост второго сверху листа приостанавливался. Постепенно увеличивались линейные размеры колоса. Все эти показатели легли в основу разработки морфометрического критерия выявления стадии развития пыльника. Для этого у каждого исследуемого генотипа пшеницы в динамике развития растения и колоса определяли отношение расстояния от основания флагового листа до основания второго сверху листа (I) и расстояния от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса (II). Следует отметить, что даже при самом строгом соблюдении всех методических нюансов в пыльниках, расположенных в нижнем (первом) цветке пяти колосков средней трети колоса, в момент срезания колосьев наблюдался полиморфизм микроспор/пыльцевых зерен, обусловленный главным образом асинхронностью их развития (при этом не учитывались аномальные микроспоры и пыльцевые зерна, в том или ином количестве также присутствовавшие в каждом из исследованных пыльников). Так, в изученных пыльниках всех генотипов пшеницы одновременно наблюдались микроспоры нормальной морфологии на таких последовательных фазах развития, как «слабовакуолизированная микроспора» и «сильновакуолизированная микроспора», а у ряда генотипов – также «тетрада микроспор», «невакуолизированная микроспора», «двуклеточное пыльцевое зерно».

Выявили соответствие морфометрического отношения I:II цитологическому статусу и количеству микроспор (в фазах «тетрада микроспор», «невакуолизированная микроспора», «слабовакуолизированная микроспора», «сильновакуолизированная микроспора») и пыльцевых зерен (фаза «двуклеточное пыльцевое зерно») в пыльниках (таблица 1).

Схема морфометрического критерия колоса, цветков и пыльник на оптимальной для биотехнологических исследований стадии развития, содержащий сильновакуолизированные микроспоры, представлены на рисунках 1 и 2 на примере линии Фотос.

Таблица 1 Морфометрические критерии фаз развития микроспор и пыльцевых зерен у ряда генотипов яровой мягкой пшеницы

Генотип	Соотношение I:II	Фаза развития микроспоры/пыльцевого зерна, % от общего количества микроспор и пыльцевых зерен в пыльнике				
		ТМ	НВМ	СлВМ	СВМ	2КлПз
Саратовская 55	1.6	—	4.10	77.10	18.80	—
	2.3	—	—	90.50	9.50	—
	3.6	—	—	36.35	62.08	1.57
	4.2	—	—	4.89	87.16	7.95
Жница	1.7	—	—	85.75	14.25	—
	2.4	—	—	51.67	48.33	—
	3.6	—	—	40.10	59.90	—
	4.6	—	—	16.15	60.33	23.52
	5.2	—	—	—	8.50	91.50
Соналика	1.5	2.00	6.10	53.80	38.10	—
	2.1	1.80	8.33	31.70	58.17	—
	3.5	—	—	41.00	51.00	0.80
Фотос	1.7	—	2.00	81.33	16.67	—
	2.3	—	—	39.33	60.67	—
	3.5	—	—	25.10	36.67	38.23
Московская 35	1.6	—	15.40	41.60	43.00	—
	2.5	—	—	67.33	32.67	—
	3.5	—	—	35.33	64.67	—
Скала	1.5	1.33	—	80.50	18.17	—
	2.2	—	—	71.75	28.25	—
	3.6	—	—	38.50	61.50	—
	4.4	—	—	22.80	48.40	28.80
Симбирка	1.5	—	—	89.33	10.67	—
	2.4	—	—	30.38	53.08	16.54
	3.5	—	—	10.63	26.75	62.62
	4.0	—	—	—	1.25	98.75

Условные обозначения: ТМ – тетрада микроспор, НВМ – невакуолизованная микроспора, СлВМ – слабовакуолизованная микроспора, СВМ – сильновакуолизованная микроспора, 2КлПз – двуклеточное пыльцевое зерно. Приведены средние значения со стандартными ошибками. Значимо на 0,1 %-м уровне.

Рисунок 1

Морфометрический критерий оптимальной стадии развития пыльника пшеницы линии Фотос: 1 – схема соотношения расстояния от основания флагового листа до основания второго сверху листа и расстояния от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса; 2 – цветок пшеницы, содержащий пыльники с сильновакуолизованными микроспорами, прижизненная съемка; 3 – завязь, Пк – пыльник, СВМ – сильновакуолизованные микроспоры

такого морфометрического критерия, как величина отношения расстояния от основания флагового листа до основания второго сверху листа (I) и расстояния от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса (II); при этом зависимость морфометрического критерия и последовательных фаз развития микроспоры/пыльцевого зерна носит линейный характер.

Рисунок 2

Гнездо пыльника пшеницы линии Фотос в оптимальной для биотехнологических исследований стадии развития. Постоянный препарат, поперечный срез. $\times 170$

Фаза развития микроспор/пыльцевых зерен в пыльниках пшеницы каждого изученного генотипа может быть выявлена с использованием

Оптимальная для биотехнологических исследований фаза сильновакуолизованной микроспоры в пыльниках нижнего (первого)

цветка пяти колосков средней трети колоса у исследованных генотипов пшеницы выявляется при использовании этого морфометрического критерия следующим образом: у сорта Соналика при соотношении I:II в 2.1, у линии Фотос – 2.3, у сорта Симбирка – 2.4, у сорта Московская 35 – 3.5, у сорта Скала – 3.6, у сорта Саратовская 55 – 4.2, у сорта Жница – 4.6. Такой разброс морфометрического критерия одной и той же фазы развития микроспоры можно объяснить главным образом различными генотип-специфичными и индивидуальными темпами развития растения, колоса, колоска, цветка и пыльника у исследованных сортов и линии пшеницы. Кроме того, в такой разброс свой вклад, по-видимому, вносят метеорологические факторы (в частности, сумма температур при развитии растений от IV до VIII этапов органогенеза) и почвенные условия экотопа, однако для окончательного вывода необходимы специальные исследования. В целом отношение I:II как морфометрический критерий стадии развития пыльника достаточно достоверно отражает последовательное развитие микроспор/пыльцевых зерен в пыльниках.

Вывод. По заранее определенному для каждого вводимого в биотехнологический процесс генотипа яровой мягкой пшеницы показателю

отношения расстояния от основания флагового листа до основания второго сверху листа к расстоянию от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса можно выявить стадию развития пыльника, содержащего абсолютное большинство сильновакуолизированных микроспор как инициальных клеток андроклинии, и тем самым оптимальную для биотехнологических исследований. Важно при этом использовать для инокуляции *in vitro* пыльники только нижнего цветка пяти колосков средней трети колоса. Данный методический подход дает возможность не прибегать к предварительному трудоемкому цитологическому анализу фазы развития микроспор/пыльцевых зерен пыльников. Использование такого морфометрического критерия позволяет оптимизировать (ускорить) биотехнологический процесс получения растений-регенерантов пшеницы методом культуры *in vitro* пыльников на основе биологического феномена андроклинии.

Работа выполнена в рамках Договора о творческом сотрудничестве между Уфимским Институтом биологии УФИЦ РАН и Башкирским НИИ сельского хозяйства УФИЦ РАН. Исследования проведены с применением приборов ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН.

Библиографический список

1. Сельскохозяйственная биотехнология [Текст] / Под ред. В.С. Шевелухи; изд. 3-е, перераб. и доп. М.: Высшая школа, 2008. 710 с.
2. Лутова, Л.А. Биотехнология высших растений [Текст] / Л.А. Лутова; изд. 2-е, доп. СПб.: Санкт-Петербургский ун-т, 2010. 240 с.
3. Игнатова, С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro* [Текст] / С.А. Игнатова. Одесса: Астропринт, 2011. 224 с.
4. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы [Текст] / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдиминова. М.: Наука, 2005. 99 с.
5. От микроспоры – к сорту [Текст] / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдиминова. М.: Наука, 2010. 174 с.
6. Doubled haploidy in model and recalcitrant species. Ed. J.M. Seguí-Simarro. Lausanne: Frontiers Media, 2016. 119 p.
7. Круглова, Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* [Текст] / Н.Н. Круглова // Известия РАН. Серия биол. 1999. № 3. С. 275–281.
8. Круглова, Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Н.Н. Круглова. СПб., 2002. 48 с.
9. Батыгина, Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни [Текст] / Т.Б. Батыгина. СПб.: ДЕАН, 2014. 764 с.
10. Суханов, В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук / В.М. Суханов. Саратов, 1983. 24 с.
11. Горбунова, В.Ю. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Оптимальная фаза микроспорогенеза [Текст] / В.Ю. Горбунова, Н.Н. Круглова // Известия РАН. Серия биол. 1997. № 6. С. 668–676.
12. Горбунова, В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы [Текст]: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / В.Ю. Горбунова. СПб., 2000. 48 с.
13. Куперман, Ф.М. Морфофизиология растений [Текст] / Ф.М. Куперман. М.: МГУ, 1977. 256 с.
14. Круглова, Н.Н. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro* [Текст] / Н.Н. Круглова, О.А. Сельдиминова. Уфа: Гилем, 2011. 124 с.
15. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы [Текст] / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятов, Х.Х. Джалилова, Г.М. Ильина, Н.В. Чубатова. М.: МГУ, 2004. 312 с.

Сведения об авторах

1. **Круглова Наталья Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физиологии растений Уфимского Института биологии УФИЦ РАН, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 69, тел./факс: 8 (347) 2356247, e-mail: kruglova@anrb.ru.

2. **Никонов Владимир Иванович**, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией селекции и семеноводства яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ УФИЦ РАН, 450071, г. Уфа, ул. Зорге, 19, тел./факс: 8 (347) 2230708.

Перспективное направление современных биотехнологических исследований по выведению высокопродуктивных сортов яровой мягкой пшеницы – метод культуры *in vitro* пыльников. В основе этого метода лежит уникальный биологический феномен андроклинии, состоящий в образовании в условиях *in vitro* растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника, которая меняет программу развития с гаметофитного пути на спорофитный. Основная проблема, связанная с разработкой эффективной биотехнологии массового стабильного получения андроклинических регенерантов, состоит в выявлении и использовании стадии развития пыльника, оптимальной для инокуляции в питательную среду *in vitro*. Ранее нами было установлено, что такие пыльники у яровой мягкой пшеницы должны содержать сильновакуолизированные микроспоры как инициальные клетки андроклинии. В данной работе на примере коллекции генотипов яровой

мягкой пшеницы детализирован предложенный (Горбунова, Круглова, 1997; Горбунова, 2000) морфометрический критерий стадии развития пыльника, содержащего сильновакуолизированные микроспоры. Критерий состоит в использовании отношения расстояния от основания флагового листа до основания второго сверху листа к расстоянию от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса. Такой критерий позволяет выявить фазу развития микроспор/пыльцевых зерен каждого вводимого в биотехнологический процесс генотипа пшеницы (в пыльниках нижнего цветка пяти колосков средней трети колоса), не прибегая к предварительному трудоемкому цитологическому анализу состояния пыльников. Использование этого простого и надежного критерия позволит ускорить биотехнологические исследования пшеницы методом культуры *in vitro* изолированных пыльников.

N. Kruglova, V. Nikonov

THE MORPHOMETRIC CRITERION OF OPTIMAL STAGE OF ANTHR DEVELOPMENT FOR SPRING SOFT WHEAT BIOTECHNOLOGICAL STUDIES

Key words: *anther; microspore; biotechnology; culture in vitro; spring soft wheat; Triticum aestivum L.*

Authors' personal details

1. **Kruglova Natalia**, Doctor of Biology, professor, chief scientific researcher of the laboratory of plant physiology of Ufa Institute of Biology of UFRC RAS, Ufa, 450054, av. October, 69, phone/fax: 8 (347) 2356247, e-mail: kruglova@anrb.ru.

2. **Nikonov Vladimir**, Candidate of Agriculture, head of laboratory of breeding and seed production of spring wheat of Bashkirian Research Institute of Agriculture of UFRC RAS, Ufa, 450071, Zorge str., 19, phone/fax: 8 (347) 2230708.

The promising direction of modern biotechnological researches on the breeding of high-yielding varieties of spring soft wheat is the method of anther culture *in vitro*. The basis of this method is a unique biological phenomenon of androcliny, consisting in the formation of plant-regenerant in *in vitro* conditions from morphogenetically competent anther cell, which changes its developmental program from gametophytic pathway to sporophytic one. The main problem associated with the elaboration of effective biotechnology of mass stable production of androclonic regenerants is to identify and to

use the stage of anther development, optimal for inoculation on the nutrient medium *in vitro*. Informed us for spring soft wheat it was found that such anthers should contain strongly vacuolated microspores as initial cells of androcliny. In this paper on the example of the collection of genotypes of spring soft wheat the morphometric criterion of developmental stage of anther containing strongly vacuolated microspores (proposed by Горбунова, Круглова, 1997; Горбунова, 2000) is detailed. The criterion is consists in using of the ratio of the distance from the base of the flag leaf to the base of the sec-

ond from top leaf and the distance from the base of the flag leaf to the tip of the spike in the tube. Such criterion allows to identify the development phase of the microspores/pollen grains of each wheat genotype input into the biotechnological process (in the anthers of the lower flower of the five spikes of the

middle third of the ear) without resorting to time-consuming preliminary cytological analysis of the condition of the anthers. Using this simple and reliable criterion will accelerate the wheat biotechnological researches by anther culture *in vitro*.

© Круглова Н.Н., Никонов В.И.