

АНДРОКЛИННЫЙ ЭМБРИОИДОГЕНЕЗ КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К СОХРАНЕНИЮ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Проанализированы преимущества андроклинного эмбриоидогенеза как способа клонирования растений в культуре *in vitro* изолированных пыльников. На основе комплексного подхода разработана биотехнология стабильного получения андроклинных растений-регенерантов. Рассматривается возможность использования разработанной биотехнологии в целях сохранения биоразнообразия.

Ключевые слова: биотехнология, андроклиния, эмбриоидогенез, растения-регенеранты.

Одно из направлений практического применения биотехнологии – микроразмножение и тиражирование в культуре *in vitro* растений, имеющий ряд преимуществ по сравнению с традиционным вегетативным размножением. Последующая репатриация таких растений в природные экосистемы может способствовать сохранению многообразия растительного мира.

Перспективное направление в этой области – андроклинная гаплоидия. Биологический феномен андроклинии состоит в формировании растения-регенеранта на основе переключения программы развития гаплоидных клеток пыльника с обычного гаметофитного пути, связанного с образованием пыльцевого зерна (мужского гаметофита), на иной путь – спорофитный [8, с. 3]. Полученные гаплоидные растения представляют собой клоны, сохраняющие генотип исходных донорных растений. Перевод гаплоидов в дигаплоидное состояние позволяет получать полноценные семена таких растений.

На протяжении ряда лет в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН на основе комплексного исследования феномена андроклинии у яровой мягкой пшеницы ведется разработка стабильного массового получения и тиражирования растений-регенерантов в культуре *in vitro* пыльников.

В работе используются: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы [4, с. 4-30], метод цитологических исследований [1, с. 26-67, 185], метод сканирующей электронной микроскопии в собственной модификации, экспресс-метод твердофазного иммуноферментного анализа растительных образцов [5, с. 1222-1224].

Экспериментально выявлено, что путями морфогенеза, приводящими к образованию полноценных гаплоидных регенерантов, в услови-

ях выполненных экспериментов являются эмбриоидогенез и гемморизогенез. Эмбриоидогенез состоит в формировании из сильновакуолизированной микроспоры (инициальной клетки андроклинии [3, с. 43-58]) эмбриоида – зародышеподобной структуры, гемморизогенез – в сопряженном формировании на морфогенном (способным к регенерации растений-регенерантов) каллусе множественных почек и корней..

Установлено, что биотехнологически оптимален эмбриоидогенез. Основное преимущество эмбриоидогенеза заключается в том, что единицей репродукции в данном случае является эмбриоид как зачаток целого организма – зародышеподобная структура со всеми характерными для зародыша пшеницы органами [2, с. 63]. В результате исключается процедура многократных пересадок на питательные среды различного состава, как это происходит в случае регенерации растений через каллусную культуру. Кроме того, одноклеточное происхождение эмбриоидов гарантирует образование гаплоидных растений-клонов, генотип которых идентичен генотипу родительского растения.

Сотрудниками лаборатории разработан методический подход, позволяющий управлять морфогенезом *in vitro* сильновакуолизованных микроспор [8, с. 48-51]. Сопоставление данных цитоэмбриологического анализа и твердофазного иммуноферментного анализа позволило установить, что индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор определяется балансом между концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в модифицированной индукционной питательной среде Potato II и содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльнике в момент инокуляции. Применение экспресс-метода иммуноферментного анализа позволяет быстро и надежно проводить

Фундаментальные проблемы изучения и сохранения биологического разнообразия

определение количественного содержания эндогенных фитогормонов в большом количестве растительных образцов. Полученные данные дают основание для выбора концентрации 2,4-Д, оптимальной для индукции эмбриодогенеза у конкретного генотипа яровой мягкой пшеницы, и исключают необходимость эмпирического подбора условий культивирования *in vitro*.

Совместно с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург) в лаборатории разработан методический подход, позволяющий методом световой микроскопии исследовать объекты, ранее изученные методом сканирующей электронной микроскопии. Данный подход позволяет совмещать детали внешнего и внутреннего строения, и тем самым получать четкое представление о структуре изучаемого объекта. Использование данного подхода позволяет убедительно доказать факт индукции именно эмбриодогенеза, как пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор.

Также с использованием этого подхода были детально изучены этапы развития эмбриоидов от инициальных клеток до растений-регенерантов [6, с. 9-14]. Показано, что развитие эмбриоидов *in vitro* принципиально сходно с развитием зиготических зародышей донорных растений пшеницы в естественных условиях, что является еще одной веской причиной использования для получения полно-

ценных растений-регенерантов именно эмбриоидов.

Кроме того, выявлен особый тип эмбриоидов – полиэмбриоиды [7, с. 105-106]. Основное отличие полиэмбриоидов от биполярных эмбриоидов, схожих с зиготическими зародышами, – наличие множественных симметрично расположенных в апикальной части полиэмбриоида апикальных меристем побега. Несмотря на такое отличие, формирование и развитие органов у полиэмбриоидов происходит также как и у зиготических зародышей. При прорастании полиэмбриоидов образуются растения-регенеранты с увеличенным количеством побегов. Это позволяет значительно увеличивать выход гаплоидных растений-регенерантов, что существенно при массовом тиражировании растений в культуре *in vitro*.

Таким образом, комплексный подход позволил выявить особенности андроклиного эмбриодогенеза, разработать способ управления морфогенезом *in vitro* и, тем самым, создать биотехнологию стабильного получения и тиражирования растений-регенерантов в культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы на основе андроклиного эмбриодогенеза. Применение разработанной биотехнологии для получения и тиражирования андроклинных регенерантов различных видов злаковых и последующая репатриация таких растений «эмбриодогенного» происхождения в природные экосистемы может способствовать сохранению биоразнообразия.

Список использованной литературы:

1. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
2. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
3. Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. – Уфа: Гилем, 2001б. – 175 с.
4. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. – 39 с.
5. 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.
6. Сельдиминова О.А. Морфогенез эмбриоида *in vitro* и зародыша *in vivo* у пшеницы: Автореф. дисс....кандидата биол. наук. – Уфа, 2002. – 23 с.
7. Сельдиминова О.А., Титова Г.Е. Особенности развития микроспоральных эмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы // Материалы II Междунар. школы «Эмбриология, генетика и биотехнология». – Уфа, 2007. – С. 105-106.
8. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдиминова О.А. – М.: Наука, 2005. – 101 с.

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 05-04-97911, № 05-04-08114, № 08-04-97045), Академией наук Республики Башкортостан (проект № 40/40-П), а также программой «Ведущие научные школы Российской Федерации» (проекты НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4, лидер Школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина).