

УДК 573.6.086.83:633.31/37

А.А. Нуржанова<sup>1</sup>, С.К. Турашева<sup>2</sup>, С. Ораз<sup>1</sup>, Ж.Е. Жумашева<sup>1</sup>, К.А. Кашкеев<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биологии и биотехнологии растений, <sup>2</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби,  
\*e-mail: gen\_asil@mail.ru**Сравнительная оценка морфогенетического потенциала различных гибридных линий ярового ячменя (*Hordeum vulgare*)**

В статье приводятся результаты по сравнительной оценке морфогенетической отзывчивости различных гибридных линий ярового ячменя к андрогенезу *in vitro*. Обсуждаются вопросы гормональной регуляции морфогенетических процессов и регенерации в культуре репродуктивных клеток ячменя (*Hordeum vulgare*). Выявлены гибридные линии ярового ячменя, характеризующиеся высокой способностью к андрогенезу. Данные линии рекомендуется использовать в дальнейших биотехнологических и селекционных исследованиях.

**Ключевые слова:** ячмень, морфогенез, каллусогенез, регенерация, культура пыльников, гаплоиды

A.A. Nurzhanova, S.K. Turasheva, S. Oraz, Zh.E. Zhumasheva, K.A. Kashkeev

**Comparative evaluation of morphogenetic potential in different barley hybrid lines (*Hordeum vulgare*)**

In the article have been showed comparative estimation of morphogenetical ability to androgenesis *in vitro* for different hybrid lines of spring barley. The question about hormonal regulation of morphogenesis and regeneration in culture of reproductive cells of barley (*Hordeum vulgare*) have been discussed. The hybrid lines of spring barley, which have high potential to androgenesis were studied. These hybrid lines were recommended for following research in biotechnology and breeding programs.

**Keywords:** barley, morphogenesis, callus formation, regeneration, anther culture, haploids.

A.A. Нуржанова, С.К. Турашева, С. Ораз, Ж.Е. Жумашева, К.А. Кашкеев

**Жаздық арпа (*Hordeum vulgare*) будан линияларының морфогенетикалық қабілеттерін салыстырмалы бақылау**

Мақалада жаздық арпаның тозаң дақылындағы әр түрлі будан линияларының морфогенетикалық қабілеті бойынша салыстырмалы талдау келтірілген. Арпаның (*Hordeum vulgare*) репродуктивті клетка дақылындағы морфогенетикалық және регенерация процестерінің гормональды реттеу туралы мәселелері талқылануда. Жаздық арпаның андрогенезге жоғары қабілетімен сипатталынатын будан линиялары анықталған. Бұл будан линияларын биотехнологиялық және селекциялық зерттеулерде болашақта қолдану үшін ұсынылады.

**Түйін сөздер:** арпа, морфогенез, каллусогенез, регенерация, тозаңқап культурасы, гаплоидтар.

В последнее время одним из перспективных и экологически безопасных направлений, значительно увеличивающих эффективность совершенствования сельскохозяйственных культур, является использование биотехнологических методов. Биотехнологические методы получения гаплоидов, в частности, метод андрогенеза *in vitro* ускоряет и упрощает выполнение генетико-селекционных программ, облегчает управление формообразовательным процессом в потомстве гибридов злаковых растений [1]. Редукция хромосомного набора гибридов F1 до гаплоидного состояния и последующее восстановление его до исходного уровня плоидности с созданием гомозиготных линий приводит к тому, что расщепление по генотипу

в потомстве гетерозигот совпадает с расщеплением по фенотипу и ограничивается гомозиготными классами [2]. При этом число единиц расщепления сокращается до числа типов гамет, а каждый генотип представлен группой растений – гомозиготной линией, что существенно повышает точность оценки по всем селективируемым признакам. В этой связи, применение дигаплоидных линий в скрещиваниях, существенно повышает взаимодействие структурных и регуляторных генов, что способствует преодолению тесных связей между признаками в пределах групп сортов определенного экотипа.

Широкое использование метода гаплоидии в селекции важных зерновых культур, в том числе ярового ячменя, сдерживается чрезмерно

низким выходом гаплоидных растений, получаемых *in vitro*, находящегося в зависимости от таких факторов как: генотип, условия выращивания донорных растений, стадия развития микроспор, предобработка эксплантатов, состав питательных сред, условия культивирования, а также способов удвоения полученных гаплоидов. Вышеназванные и многие другие проблемы экспериментальной гаплоидии остаются открытыми, и являются лимитирующими для практического использования дигаплоидных форм в селекционных программах. Для увеличения выхода гаплоидов предпринимаются попытки усовершенствования некоторых этапов гаплоидной технологии. При этом, различают генетическую и физиологическую стратегии в оптимизации методик получения гаплоидов. Согласно первому подходу, существуют четыре независимо наследуемых признака, характеризующих так называемую «tissue culture ability»: индукция каллусов, стабилизация каллусов, регенерация растений, соотношение альбиносов и зеленых растений. При физиологической стратегии признается, что условия выращивания донорных растений оказывают большое влияние на частоту мутации каллусов и эмбриоидов из микроспор. Установлено, что в определении способности к индукции андрогенеза главная роль принадлежит ядерным генам. Комплексный анализ компонентов генетической вариации, генетических параметров в системе диаллельных скрещиваний и в расщепляющихся поколениях показал, что способность к андрогенезу определяется различным соотношением аддитивных и доминантных эффектов, а также взаимодействием неаллельных генов, причем условия внешней среды способны влиять на наличие и силу проявления эффектов генов. Реакция в культуре пыльников определяется генотипом, факторами среды и взаимодействием генотип x фактор. При этом наибольшей силой влияния на индукцию андрогенеза обладает генотип [2, 3]. В настоящее время большинство исследователей придерживаются генетической стратегии оптимизации технологии получения гаплоидов [4, 5, 6, 7].

### Материалы и методы

Материалом исследований служили гибриды первого поколения ярового ячменя (*H.vulgare*), созданные на основе реципрокного скрещивания между устойчивыми, относительно устойчивыми и чувствительными к засолению сортами и сортообразцами: Арна x Сыр Аруы, Сыр Аруы x Арна, Арна x Сауле, Сауле x Арна, Сыр Аруы x 49/99-11, Сыр Аруы x 49/99-15, Сыр Аруы x 164/99-6, 164/99-6 x Сыр Аруы, Илек 16 x Сыр Аруы, Сыр Аруы x 3/24-01.

Для получения гомозиготных форм ярового ячменя была использована культура пыльников и микроспор вышеупомянутых гибридных линий. Колосья отбирались в фазе, соответствующей 1-ядерной стадии развития микроспор и подвергались холодной предобработке (+4...+7<sup>0</sup> С) в течение 3-5 суток. Затем в стерильных условиях пыльники изолировали и культивировали на базовой питательной среде Гамборга-Эвелеге В5, содержащей 1 мг/л ауксина 2,4-Д /12/. С целью увеличения выхода эмбриогенных структур, в качестве стимулирующего хлоропластогенез, а также в качестве источника углерода был использован 9% моносахарид мальтоза (питательная среда Вм) и 6% дисахарид сахароза (питательная среда Вс). Экспланты инкубировали в темноте при температуре 25±2<sup>0</sup> С до образования морфогенных структур. Часть морфогенных структур культивировали на среде Гамборга В5, содержащей 1,5 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП. Эмбриогенные структуры пассировали на модифицированные питательные среды МС. Модификации проводили по типу и соотношению ауксинов и цитокининов в среде с целью определения оптимального балланса экзогенных фитогормонов, регулирующих процессы морфогенеза и регенерации ярового ячменя. Были использованы следующие варианты модифицированных питательных сред: питательная среда М1 (0,4 мг/л ИУК+0,4 мг/л БАП), среда М2 (1 мг/л ИУК+2 мг/л БАП), М3 (2 мг/л ИУК+1 мг/л БАП), М4 (2 мг/л 2,4-Д+0,4 мг/л БАП), питательная среда М5 (2 мг/л 2,4-Д+1 мг/л БАП). Андрогенные структуры культивировали при интенсивности освещения 3 тыс.лк, 16 часовом фотопериоде, 60% влажности воздуха и температуре 27±2<sup>0</sup> С.

Статистическую обработку всех полученных экспериментальных данных проводили по общепринятой методике [8].

### Результаты и их обсуждение

Экспериментальный андрогенез в культуре пыльников — это комплекс процессов, связанных с переходом пыльцевого зерна с гаметофитного на спорофитный путь развития. Он заключается в получении новообразований из гаплоидных пыльцевых зерен, а из них — растений-регенерантов, которые после диплоидизации превращаются в гомозиготные диплоидные растения. Среди факторов, определяющих переключение программы развития клетки с гаметофитного на спорофитный путь развития можно выделить два основных фактора: 1) генотип растения-донора; 2) баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов. Постиндуктивный период развития пыльцевых зерен характеризуется различными путями морфогенетических преобразований. Пыльцевые эмбриониды могут развиваться по пути прямой регенерации и непрямой регенерации в культуре каллусной ткани.

В данной статье обсуждаются вопросы регуляции морфогенетических процессов, в частности гормональная регуляция морфогенеза (баланс экзогенных фитогормонов) в культуре пыльников различных гибридов ярового ячменя. При индукции пыльцевого эмбриогенеза одним из запусков сигнала спорофитного пути развития микроспор является определенное содержание экзогенной индолилуксусной кислоты (ИУК). Известно, что у растений-доноров с высоким эндогенным содержанием индолилуксусной кислоты при их дополнительной обработке экзогенной ИУК повышается эффективность пыльцевого эмбриогенеза пыльника. Исследования проводимые на пшенице показали, что предобработка растений-доноров ИУК повышает интенсивность развития микроспор, что приводит к индукции эмбрионидов на поздних стадиях развития микроспор [7]. Вместе с тем, сложность оптимизации методики получения гаплоидов заключается в том, что вариабельность концентраций гормонов является генотип-зависимым показателем, и оптимизированные для одного генотипа условия культивирования не могут подходить для других гибридов,

сортов и линий. Трудности изучения гормональной регуляции связаны с интегральным характером морфогенетических процессов и их зависимостью от многих внешних и внутренних факторов.

Результаты наших исследований показывают, что при низкой одинаковой концентрации ауксинов и цитокининов в среде МС (0,4 мг/л ИУК и 0,4 мг/л БАП) образование эмбрионидов и их развитие происходит с очень низкой частотой — количество эмбрионидов на среде М1 колеблется от 1,92% до 6,06% (таблица 1). Увеличение концентрации фитогормонов с преобладанием гормона цитокининового типа действия (вариант среды М2 с 1 мг/л ИУК и 2 мг/л БАП) приводит к небольшому возрастанию количества эмбрионидов у отдельных гибридов (36,0±6,85% для гибридной линии Сыр Аруы х 49/99-15), а также к появлению каллусов (2,0 ±0,63%). У гибрида Арна х Сыр Аруы на этом варианте питательной среды отмечалось образование эмбрионидов (4,86±1,79%) с дальнейшим их прорастанием в растение-регенеранты, однако регенеранты были бесхлорофильные (альбиносы) и нежизнеспособные. Интенсивность регенерации путем прорастания эмбрионидов зависела от их размера, консистенции и генотипа, а также от состава питательной среды. Из этих результатов следует, что для увеличения процента образования эмбрионидов и их последующего регенерирования предпочтительно увеличить содержание фитогормонов в среде, причем необходимо учесть, что доминирование в среде цитокининов, по сравнению с ауксинами не способствует развитию морфогенных структур. Поэтому было предложено использовать питательную среду МС, содержащую в 2 раза больше гормона ауксинового типа действия при соотношении ауксина ИУК и цитокинина БАП 2:1 (соответственно 2 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП). При таком балансе экзогенных фитогормонов морфогенез наблюдался абсолютно у всех гибридных линий, что, несомненно, является положительным фактом. Частота морфогенеза варьировала для разных гибридов от 3,47% до 98%. Причем, развитие клеток происходило, преимущественно по пути эмбриогенеза, чем каллусогенеза, что также является очень важным моментом в гаплопродукции ячменя.

Наибольшей отзывчивостью к эмбриогенезу обладали гибридные линии Арна х Сауле (частота эмбриогенеза составляла  $54,54 \pm 8,80\%$ ), гибридная линия, полученная при реципрокном скрещивании Сауле х Арна ( $64,28 \pm 13,28\%$ ), а также гибрид Сыр Аруы х 49/99-15 (частота эмбриогенеза составляла, соответственно  $98,0 \pm 2,0\%$ ). Последний генотип характеризовался также и высокой частотой каллусогенеза ( $10,0 \pm 4,28\%$ ) среди всех исследованных линий. Образование регенерантов было отмечено у гибрида Арна х Сыр Аруы ( $0,69\%$ ). Таким образом, наши экспериментальные данные подтверждают утверждение, что баланс фитогормонов является одним из ключевых механизмов переключения микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития.

Интересно отметить, что замена природного ауксина ИУК на синтетический его аналог (ауксин 2,4-Д), при том же (как и в варианте

М3) соотношении ауксина к цитокинину приводит к значительному снижению частоты эмбриогенеза (в среднем, в 2-5 раз), увеличению доли каллусов и образованию растений альбиносов, развившихся по непрямому пути андрогенеза, т.е. развитие их происходило посредством каллусогенеза (таблица 2). При снижении концентрации БАП в среде с высокой концентрацией ауксина 2,4-Д (вариант среды М4 с 2 мг/л 2,4-Д и 0,4 мг/л БАП) данная тенденция сохранялась, но также наблюдалось и появление растение-регенерантов. Так например, для гибридной линии Сыр Аруы х Арна все образовавшиеся эмбриогенные каллусы формировали бесхлорофильные растения-регенеранты ( $100\%$ ), а для гибрида Сыр Аруы х 49/99-15 было характерно образование растений-регенерантов как из каллусной ткани, так и из эмбриоидов (частота регенерации составляла  $15,38 \pm 5,15\%$ ).

**Таблица 1** – Частота морфогенеза в культуре пыльников гибридных линий ярового ячменя на модифицированных питательных средах МС, содержащих ауксин ИУК, %

Генотипы	среда М1 (0,4 мг/л ИУК+0,4 мг/л БАП)			среда М2 (1 мг/л ИУК+2 мг/л БАП)			среда М3 (2 мг/л ИУК+1 мг/л БАП)		
	К	Э	Р	К	Э	Р	К	Э	Р
Арна х Сыр Аруы	0	0	0	0	$4,86 \pm 1,79$	$0,69 \pm 0,69$	$0,69 \pm 0,69$	$3,47 \pm 1,15$	$0,69 \pm 0,69$
Сыр Аруы х Арна	0	$1,92 \pm 1,92$	0	0	0	0	$1,92 \pm 1,92$	$9,61 \pm 2,41$	0
Арна х Сауле	0	$6,06 \pm 2,42$	0	0	0	0	0	$54,54 \pm 8,80$	0
Сауле х Арна	0	0	0	0	0	0	0	$64,28 \pm 13,28$	0
Сыр Аруы х 49/99-11	0	0	0	0	0	0	0	$7,14 \pm 2,49$	0
Сыр Аруы х 49/99-15	0	$4,0 \pm 1,27$	0	$2,0 \pm 0,63$	$36,0 \pm 6,85$	0	$10,0 \pm 4,28$	$98,0 \pm 2,0$	0

Примечание: К- частота каллусогенеза, %; Э - частота эмбриогенеза, %; Р-частота регенерации, %

Однако, зеленые растения на этой среде постепенно трансформировались в этиолированные формы и дальнейшего их развития не происходило. Следует заметить, что формирование растений альбиносов является одной из нерешенных проблем экспериментальной гаплоидии. Однозначного мнения о причине возникновения альбинизма в процессе регенерации до сих пор нет. Исследования альбиносов, полученных в культуре пыльников пшеницы, показало, что

все они характеризуются потерей участков хлоропластной ДНК на 80% и более от общего содержания [6]. С другой стороны, существует мнение, что образование альбиносов – результат физиологических причин, а не следствий мутаций. Вследствие неизученности этой проблемы в настоящее время нет и четких рекомендаций по устранению причин возникновения бесхлорофильных растений, поэтому многие исследователи применяют эмпирический подход.

Использование в качестве регулятора морфогенеза ауксина 2,4-Д приводило к появлению в каллусной культуре некротизированных участков (с частотой от 3,03% до 25%), несмотря на регулярные пассажи на свежие питательные среды того же состава, некротизация не уменьшалась. Аналогичные явления наблюдались и в эмбриогенных тканях, культивирование

которых происходило на средах, содержащих 2,4-Д, независимо от концентрации цитокинина БАП и соответственно при различном их соотношении. По-видимому, доминирующее влияние в данном процессе оказывало присутствие в составе среды синтетического ауксина 2,4-Д.

**Таблица 2** – Частота морфогенеза в культуре пыльников гибридных линий ярового ячменя на модифицированных питательных средах МС, содержащих синтетический аналог ауксина 2,4-Д, %

Генотипы	среда М4 (2 мг/л 2,4-Д+0,4 мг/л БАП)			среда М5 (2 мг/л 2,4-Д+1 мг/л БАП)		
	К	Э	Р	К	Э	Р
Сыр Аруы х Арна	3,84± 1,26	0	100	0	0	0
Арна х Сауле	0	0	0	0	21,21±7,22	0
Сауле х Арна	7,14±2,92	0	0	7,14±2,92	0	0
Сыр Аруы х 49/99-11	3,57±1,37	25,0±8,33	0	0	17,85±7,36	0
Сыр Аруы х 49/99-15	10,0±4,28	16,0±5,23	15,38± 5,15	14,0±4,95	58,0±7,05	0

*Примечание:* К – частота каллусогенеза, %; Э – частота эмбриогенеза, %; Р – частота регенерации, %

Таким образом, сравнительный анализ морфогенетических процессов в культуре пыльников различных гибридных линий ярового ячменя показал, что способность к индукции андрогенеза имеет генотипическую специфичность. Причем отчетливо влияние генотипа проявляется на первых этапах пыльцевого эмбриогенеза, когда происходит перепрограммирование микроспор на спорофитный путь развития. На втором этапе - регенерации растений из морфогенных структур - проявляется влияние состава культуральной среды и особенно баланс экзогенных фитогормонов. Результаты данных исследований показали, что на формирование и развитие морфогенных структур в культуре

пыльников гибридных линий ячменя благоприятное влияние оказывает природная форма ауксина - индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрации 2 мг/л. При соотношении ауксина ИУК к цитокинину БАП 2:1 происходит развитие морфогенных образований у всех исследованных генотипов ячменя. Синтетический аналог ауксинового типа действия 2,4-Д ингибирует процессы эмбриогенеза и стимулирует процессы каллусообразования. Дедифференциация (т.е. каллусогенез) растительных клеток снижает эффективность гаплопродукции, поэтому предпочтительнее индуцировать процессы прямого андрогенеза, т.е. образование регенерантов посредством эмбриогенеза.

### Литература

- 1 Неттевич Э.Д., Чистякова В.Н. Результаты и перспективы использования диплоидизированных гаплоидов в селекции ячменя // Теоретические и прикладные проблемы генетики, селекции и семеноводства зерновых культур. – М., 1998. - 57 с.
- 2 Бурлуцкий В.А. О биотехнологии гаплоидных систем // Сборник статей по материалам II Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Волгоград, 2010. - С. 370.
- 3 Коньшева Е.Н. Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя // Автореф. дисс. на соиск. уч.ст.канд. биол. наук. Красноярск, 2004. - 29 с.
- 4 Сатарова Т.Н. Андрогенез и эмбриокультура у кукурузы *in vitro* // Автореф. канд. дисс. Киев, 2002. - 46 с.

- 
- 5 Май Дык Чунг, Калашникова Е.А. Гаплоидные технологии *in vitro* в селекции растений //Сборник статей по материалам III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Волгоград, 2010. – 172 с.
  - 6 Круглова Н.Н., Куксо П.А. Начальный этап индукции андроклинии // Усп. соврем. биол. – 2006. - Т. 126. - № 5. – С. 462-471.
  - 7 Беккужина С.С. Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к засухе и *Septoria nodorum Berk* // Автореф. дисс. ... д.б.н. – М. 2011. -46 с.
  - 8 Удольская Н.Л. Введение в биометрию. – Алма-Ата, 1976. – 84 с.