

633.527(043.3)

СИГНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ ГОРМОНОВ И РЕАКЦИЯ ОТВЕТА НА СТРЕССОРЫ ПРИ ИНДУКЦИИ ПЫЛЬЦЕВОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

С.С. Беккужина¹, С.Н. Боровиков¹, И.Рахимбаев²

¹Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, пр. Женис, 62, Астана, 010011, Казахстан

²Институт биологии и биотехнологии растений, ул. Тимирязева, 42, Алматы, 050057, Казахстан

sara-bek@yandex.ru, nicsb_katu@mail.ru, rakhim_10@mail.ru

АБСТРАКТ

В статье представлен обзор мировой литературы по теоретическим и прикладным аспектам гаплоидных технологий, в частности, рассматриваются пути повышения эффективности пыльцевого эмбриогенеза. В аналитическом обзоре детально обсуждаются вопросы по выявлению роли гормональных предобработок растений-доноров в индукции спорофитного пути развития микроспор. Баланс фитогормонов является одним из ключевых механизмов переключения микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития. Кроме того, детализируются вопросы влияния различных стрессоров на перепрограммирование микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития. При обсуждении данного вопроса все используемые предобработки растений, перед введением в культуру *in vitro*, разделены на новые и старые приемы предварительной обработки.

Результатом наших экспериментальных исследований является создание эффективной биологической системы, позволяющей переключать развитие микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития на основе предобработки срезанных растений гормонами ауксинового типа действия – ИУК, 2,4-D с учетом содержания эндогенного ИУК в растениях. Разработанный способ повышает эффективность пыльцевого эмбриогенеза до 8%. Общепринятые методы предобработки заключаются в том, что гормональный фактор добавляется в индукционную среду, а в наших экспериментах предварительной обработке подвергались срезанные растения.

Ключевые слова: эмбриогенез, андрогенез, гаплоид, дигаплоиды, пыльца, регуляторы роста, стресс, микроспоры, спорофит, гаметофит, селекция.

SIGNAL FUNCTIONS OF HORMONES AND RESPONSE TO POLLEN EMBRYOGENESIS INDUCTION STRESSORS

S.S. Bekkuzhina, S.N. Borovikov, I. Rahimbaev

¹S. Seifullin Kazah Agro Technical University, 62 Victory Square, Astana, 010011, Kazakhstan

²Institute of Plant Biology and Biotechnology, 42 Timiryazevst., Almaty, 050040, Kazakhstan
sara-bek@yandex.ru, nicsb_katu@mail.ru, rakhim_10@mail.ru

АБСТРАКТ

The Article presents the world publications review on theoretical and applied aspects of haploid technologies, in particular the ways to increase pollen embryogenesis efficiency. The analytical review discusses in details the issues of donor plants hormonal pretreatment role in induction of microspore sporophytic development pattern.

Phytohormone balance is one of the key mechanisms of microspores shifting from gametophytic to sporophytic development pattern. In addition, the Article specifies the impact of various stressors on microspore reprogramming from gametophytic to sporophytic development pattern. In discussing this issue all plant pretreatments being in use are distributed into new and old pretreatment methods before *in vitro* introduction. The result of our experimental research is to create an effective biological system, that allows switching development of microspores from the gametophytic type to the sporophytic development type based on pretreatment of cut plants hormone of auxin cut type as - IAA, and 2,4-D with contents of endogenous IAA in plants. The developed method improves the efficiency of pollen embryogenesis to 8%.

Conventional methods of pretreatment are that hormonal induction factor is added to the environment, and plants cut were subjected while pre-treatment in our experiments.

Keywords: *embryogenesis, androgynies, haploid, dihaploids pollen, gormon regulation, stress, microspores, sporophyt, gametophyte, selection.*

ВВЕДЕНИЕ

Для ускорения селекционного процесса получение гомозиготных форм с помощью гаплоидных технологий является более эффективным. Особенно ценным для селекционеров и генетиков является ускоренное создание ДН-линий методами биотехнологии, а также возможность индуцирования ценных мутаций [1].

Обзор мировой литературы показывает перспективность практического использования дигаплоидных форм в селекционных программах. Например, опыт внедрения гаплоидных технологий в сочетании с методами классической селекции позволило отобрать формы, сорта и гибридные особи с ценными хозяйственными признакам [1, 2, 3].

В обзоре *Brian P. Forster* соавторами детально обсуждаются теоретические, прикладные аспекты гаплоидных технологий, подробно описываются методы индукции гаплоидов и возможности использования удвоенных гаплоидов в программах классической селекции. Кроме того, авторы акцентируют внимание на вопросах, изученных с помощью экспериментальной гаплоидии в период длительного времени, которые ограничивали широкое применение удвоенных гаплоидных линий (ДН-линий – *double haploid*) в селекции. Например, возвратное скрещивание – хорошо зарекомендовавший классический метод селекции, но требуется длительное время для того, чтобы элитная линия обладала ценными признаками. Использование маркерной селекции с удвоенными гаплоидными линиями повысило бы эффективность традиционной селекции. В вышеприведенной работе также обсуждается преимущество микроспор, как лучшей экспериментальной системы для изучения эмбриогенеза, а также для выявления эффекта стресса. Микроспоры табака развиваются *in vivo* в зрелой двуклеточной пыльце (посередине). Изолированные микроспоры могут быть культивированы *in vitro* до созревания, до формирования фертильной пыльцы на богатой среде с высокой концентрацией сахарозы (справа). Микроспоры, подверженные истощению при высокой температуре, формируют зародышевые клетки, которые развиваются в гаплоидные структуры при культивировании на богатой сахарозой среде при нормальной температуре, как показано слева на рисунке 1 [1].

Культура микроспор в получении удвоенных гаплоидов используется сегодня не только для табака, но и для рапса, перца, пшеницы, ячменя и риса.

В недалеком будущем успешное сочетание гаплоидов с обратимой мужской стерильностью может привести к значительному эффекту в улучшении растений. Это является инновационной технологией для селекции, так как имеются первые экспериментальные разработки на модельном объекте табаке [4,5].

Теоретические аспекты индукции гаплоидов детально обсуждались в ранних работах [6, 7, 8]. В настоящее время опубликованы работы, детализирующие стадии эмбриогенеза растений, в частности, о роли суспензора [9], эмбриогенез микроспор и новые взгляды на механизмы андрогенеза [10].

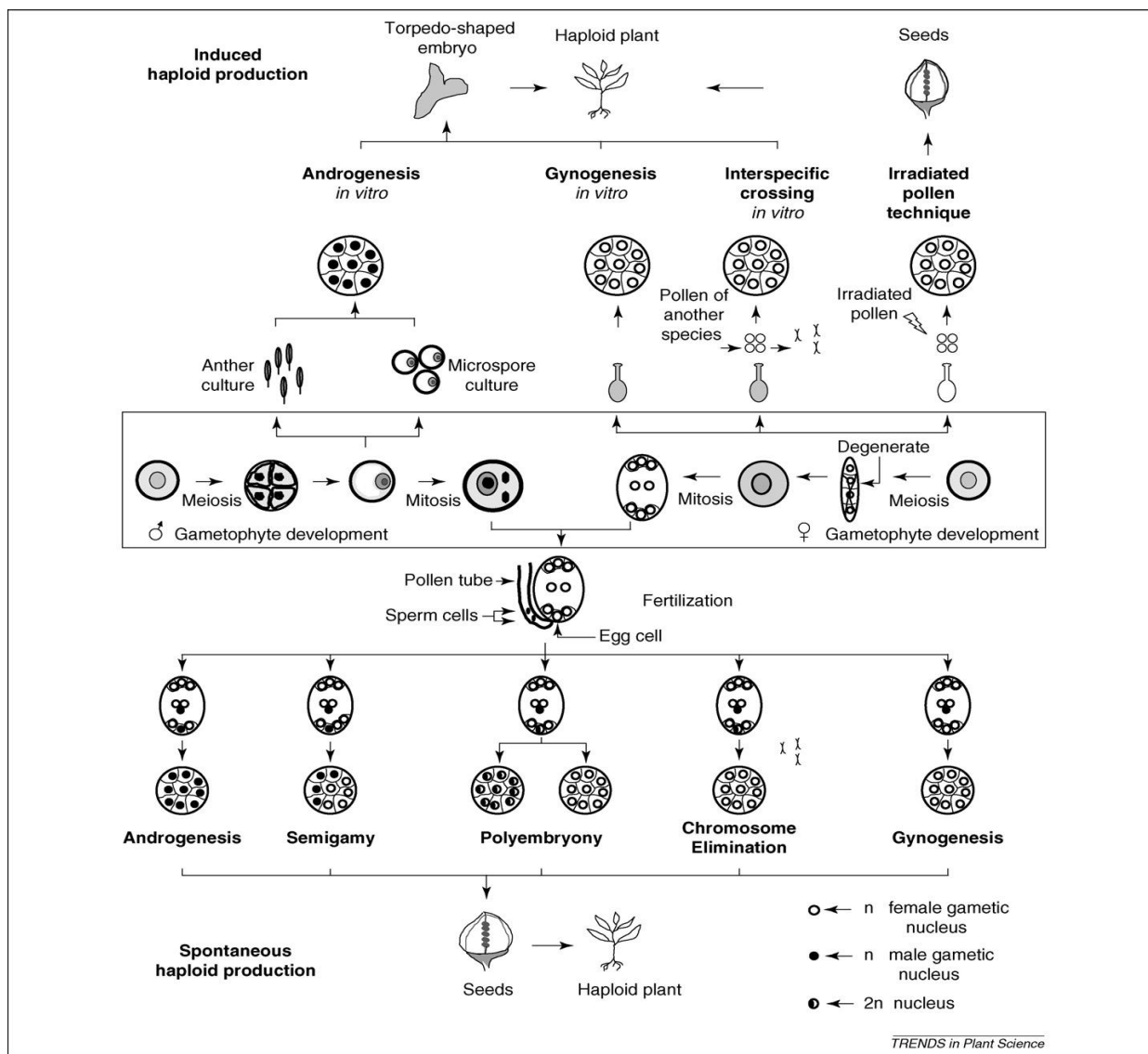


Рис. 1. Использование различных спонтанных методов и методов *in vitro* для получения ДН-линий (Forster В.Р., 2007)

Fig. 1. Use of various spontaneous and induced *in vitro* methods for DH production (Forster В.Р., 2007)

Сложность механизмов спорофитного пути развития микроспор и регуляция спорогенных клеток в условиях *in vitro* является важнейшей проблемой гаплоидных технологий. В компетенции микроспор, наряду с другими, можно выделить два основных фактора, определяющих переключение программы развития клетки с гаметофитного на спорофитный путь развития: 1) генотип растения-донора; 2) баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов.

С помощью фитогормонов осуществляется взаимодействие клеток, тканей и органов. Гормоны необходимы для запуска и реализации физиологических программ, и, в целом, процессы роста и развития растений регулируются фитогормонами. Также как *in vivo*, в условиях *in vitro* процессы жизнедеятельности изолированной клетки регулируют ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизины. В исследованиях по гормональной регуляции важным является выяснение следующих вопросов: сигнальные функции фитогормонов в осуществлении дистантных взаимодействий между клетками или органами растения; участие фитогормонов в ответных реакциях растений на стрессовые воздействия. Изучение механизмов действия фитогормонов привело к формированию

концепции о сети гормональных сигналов растений, которая позволяет компетентной клетке «выбирать» из нескольких возможных направлений конкретный путь развития и обеспечивает взаимодействие регуляторных систем различных фитогормонов [11]. Очевидно, что изучение особенностей гормональной регуляции при стрессовом воздействии, а также в процессе перепрограммирования развития клетки при индукции пыльцевого эмбриогенеза в момент инокуляции пыльника, представляет особый интерес.

Методы определения фитогормонов трудоемкие и дорогостоящие, а самое главное, по мнению Р.Г. Бутенко, сложность изучения гормональной регуляции связана с интегральным характером морфогенетических процессов и их зависимостью от многих внешних и внутренних факторов [12].

ГОРМОНАЛЬНЫЙ БАЛАНС И ИНДУКЦИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

Прошло 50 лет с того времени как *Guhai Maheshwari* впервые описали явление андрогенеза *in vitro* и сообщили об успешном получении эмбриоидов пыльцевого происхождения у *Datura*. В настоящее время накоплен богатый экспериментальный материал по изучению данного явления. Несмотря на это, изучение роли гормонального баланса в реализации этого уникального явления у покрытосеменных растений носит разрозненный характер.

Известно, что переключение программы с нормального гаметофитного на спорофитный путь развития микроспор находится в прямой зависимости от уровня эндогенных и экзогенных фитогормонов. К сожалению, эту зависимость трудно четко определить, так как данный фактор прямо коррелирует с генотипом растений. Манипуляция концентрацией гормонов является генотип-зависимым показателем, отработанные для одного генотипа культуральные условия могут быть не оптимальными для иных гибридов, сортов и линий. Фитогормоны можно использовать как стресс для переключения программы с гаметофитного на спорофитный путь развития микроспор (рис. 2).

Изучению гормонального баланса в культуре пыльников пшеницы в связи с проблемой пыльцевого эмбриогенеза *in vitro* посвящено ряд монографий и статей [13,14].



Рис. 2. Схематическое изображение гаметофитного и спорофитного пути развития микроспор (Mehran, 2006)

Fig. 2. Schematic presentation of the gametophytic and sporophytic pathways in microspores (Mehran, 2006)

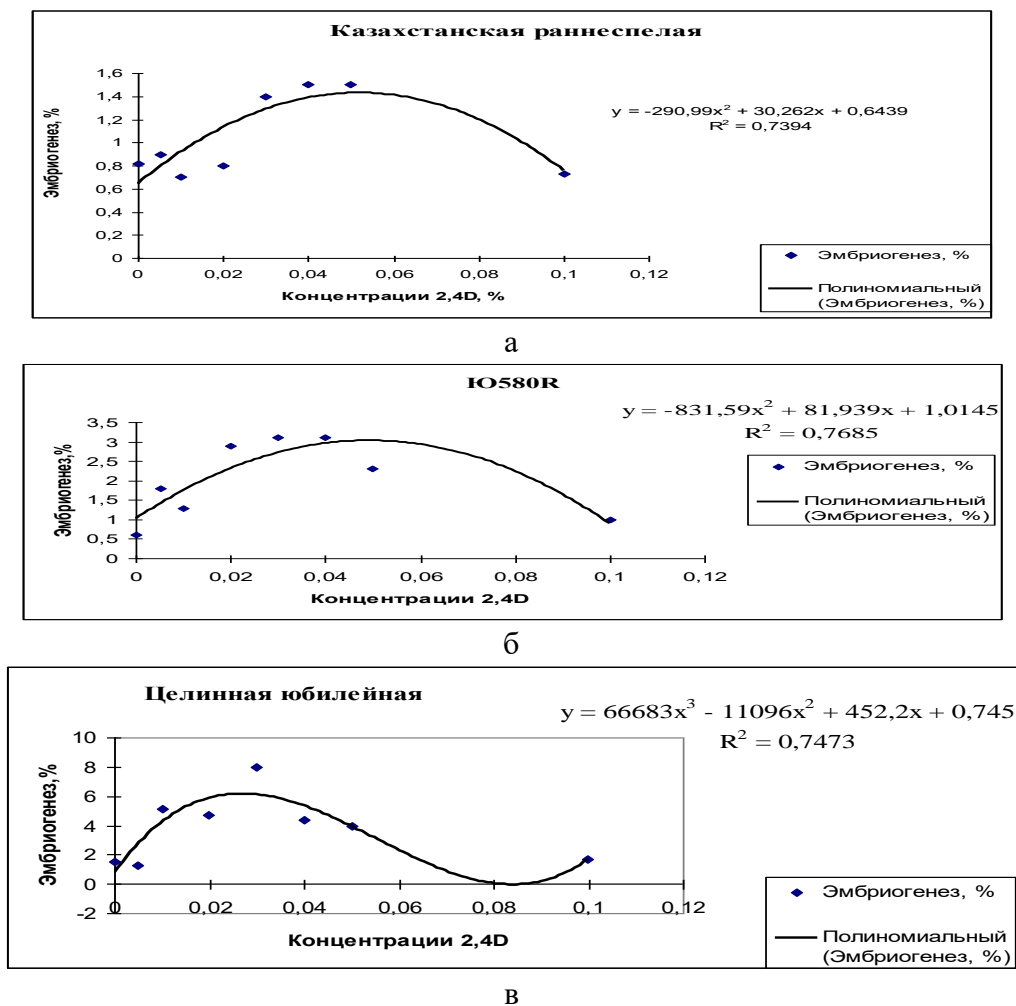
Выявлено [15], что при внесении в питательную среду низких концентраций 2,4-D способность к андрогенезу повышается у сортов, содержащих высокий уровень ИУК, а для сортов с низким содержанием эндогенной ИУК необходимо внесение в питательную среду повышенных концентраций 2,4-D. Не вызывает сомнения положение о том, что для увеличения частоты пыльцевого эмбриогенеза необходимо создавать определенный гормональный баланс. Экзогенные фитогормоны необходимо добавлять с учетом в изолированных тканях нативных гормонов в момент инокуляции пыльника.

Однако возникает вопрос: можно ли эти условия оптимизировать? Определить гормональный статус каждого генотипа очень сложно. На наш взгляд, особо важным является решение задачи по разработке «генотип-независимых» приемов, так как константные формы необходимо получать для всех перспективных генотипов и гибридов, представляющих интерес для генетиков и селекционеров.

Накоплен определенный эмпирический материал по действию экзогенного ауксина, в частности, 2,4-D, и подробно изучена ответная реакция различных генотипов на его присутствие в питательной среде. При культивировании пыльников на искусственных питательных средах без добавления ауксина у большинства видов растений андрогенез *in vitro* не индуцируется, в том числе для всех изученных генотипов пшеницы [16, 17]. Например, для некоторых растений только при совместном присутствии 2,4-D с гибберелловой кислотой в питательной среде [18] или ГК с бензидазолом получены положительные результаты.

В связи с тем, что ауксины оказывают влияние на клеточную дифференцировку, присутствие этого гормона в питательной среде является необходимым условием индукции морфогенеза. Это необходимо учитывать и при индукции пыльцевого эмбриогенеза. Кроме того, гормональный состав питательной среды является специфичным фактором, в индукции путей морфогенеза, который изучается для различных представителей видов. Например, пшеницы [19] и некоторых других растений.

В экспериментальных исследованиях при обработке срезанных растений гормонами ауксинового типа действия (2,4-D) было выявлено, что повышение концентрации гормона увеличивает частоту выхода эмбриоидов у всех изучаемых генотипов (рис. 3). Например, частота образования эмбриоидов у линии Ю580R в контроле составила 0,6%, а при обработке 0,04%-ным раствором 2,4-D этот показатель повысился до 3%, но для данной линии увеличение концентрации угнетает пыльцевой эмбриогенез. Для сорта Целинная-Юбилейная при обработке срезанных колосьев 2,4-D в концентрации 0,03% выход эмбриоидов составил 8%.



а – Казахстанская раннеспелая; б – Ю580; в – Целинная-Юбилейная

Рис. 3. Индукция пыльцевого эмбриогенеза при обработке срезуемых растений 2,4-D

а – Kazakhstan early ripe; б – Ю580; в – Tselinnaya-Yubileynaya

Fig. 3. Induction of a pollen embryogenesis in the process of the cutting-off plants 2,4-D

Для познания закономерностей гормональной регуляции процессов клеточной дифференцировки и морфогенеза *in vitro* необходимо углубленное изучение молекулярных механизмов действия фитогормонов.

Показано, что ауксин экспрессирует гены, участвующие на конечных этапах реализации ауксинового сигнала. Установлен регуляторный элемент промотора генов, экспрессия которых регулируется ауксином. В настоящее время в геноме арабидопсиса обнаружено семейство генов, состоящее из 24 генов, индуцируемых ИУК — Aih/IAA[20]. Для лучшего понимания разных ответов одного и того же гормона можно привести уникальную схему действия ауксинов в регуляции генома растений, как показано на рисунке 4[11].

Можно предположить, что ауксины регулируют сигнальную систему генов, ответственных также и за переключение программы развития микроспор с гаметофитного пути на спорофитный путь в процессе андрогенеза *in vitro*.

Выявлено, что у *Hordeum vulgare L.* добавление АБК в культуру пыльников увеличивает жизнеспособность и снижает возникновение апоптозной способности микроспор. АБК действует как ингибитор синтеза мРНК и, вполне возможно, препятствует синтезу определенных РНК, необходимых для гаметофитного развития с

помощью блокирования гаметофитного пути, и таким образом переключая на спорофитное развитие [21].



Рис. 4. Схематическое изображение регуляции экспрессии генов ауксином с участием трансфакторов ARF и Aux/IAA (Кулаева О.Н., Кузнецов В.В., 2004)

Fig. 4. The scheme of regulation of an expression of genes auxin with participation of transfactores

Обсуждая роль фитогормонов в процессе эмбриогенеза *invitro*, исследователи чаще всего говорят о содержании гормонов в индукционной среде. Для выяснения компетенции микроспор при пыльцевом эмбриогенезе необходимо детально изучить и выявить гормональный статус растений-доноров. Мы решили подойти к этой проблеме с другой стороны – определить уровень эндогенных фитогормонов и далее определять, когда, как и каким образом обрабатывать фитогормонами растения-доноры, не меняя концентрацию гормонов в индукционной среде. Исследователи давно пришли к мнению о необходимости учета уровня эндогенных фитогормонов в экспланте при культивировании, но всё остается на уровне констатации фактов.

Нами установлено, что обработка срезанных растений гормонами в некоторых вариантах увеличивает частоту выхода эмбриоидов в зависимости от концентрации и продолжительности воздействия. Однако этот эффект зависит от типа применяемых гормонов.

При индукции пыльцевого эмбриогенеза одним из пусковых сигналов спорофитного пути развития микроспор является определенное содержание эндогенной и экзогенной индолилуксусной кислоты (ИУК). Ответная реакция культуры пыльников при введении ИУК зависит от эндогенного содержания ИУК в момент инокуляции пыльника. Например, в работе Горбуновой показано [16], что экспланты с высоким содержанием эндогенных ИУК и АБК способны регулировать морфогенетические процессы в культуре пыльников пшеницы при отсутствии экзогенных гормонов. У сортов с низким содержанием ИУК без добавления экзогенного ауксина микроспоры не могут переключиться на спорофитный путь развития, причем необходимы высокие концентрации 2,4-D.

Наши результаты согласуются с литературными данными. Однако в работе нами модифицирован регламент предобработки растений: срезанные растения обрабатывают ИУК в концентрации 0,005-0,1% в течение 7-10 суток с последующим культивированием пыльников на среде, не содержащей ИУК. Эндогенный гормональный баланс фитогормонов определяли для линий, индуцированных в культуре *invitro*. Результаты исследований, представленные в таблице 1, свидетельствуют о том, что у линии ЛГВ2-92-

2 содержание ИУК составляет 37,00 нг/г сухого веса, что выше по сравнению с другими линиями.

Таблица 1. Эндогенное содержание фитогормонов в надземной части растений яровой пшеницы в фазе кущения

Table 1. The endogenous maintenance of phytohormones in elevated part of plants of a spring-sown field in a kushcheniye phase

Варианты опыта Experienceoptions	ИУК, нг/г сухого веса IAA, ng/gdryweigh t	ЦТК, мкг/г сухого веса μg/gdryweight	ГК, нг/г сухого веса GA, ng/gdryweight	АБК нг/г сухого веса ABA, ng/gdryweig ht
Ю 580R	18,50 ±1,2	2,26±0,40	44,98±2,8	290,9±2,8
ЛГВ2-92-2	37±3,1	1,17±0,2	598,58±1,3	145,5±1,2
ЛГВ3-692-3-5	18,5±1,5	3,35±1,1	364,68±3,9	872,7±1,9
ЛГВ1-92-2	17,50±2,3	1,94±0,2	69,2±2,3	436,4±2,6

После определения эндогенного содержания фитогормонов установлено, что индукция андрогенеза *invitro* находится в прямой зависимости от уровня эндогенных гормонов. Обработка ИУК повышает частоту образования эмбриоидов у линии ЛГВ2-92-2. У данной линии эмбриогенная способность в контрольном варианте составляет 5,1%, а при обработке растений 0,04%-ным раствором ИУК значительно повышается до 8%. Следовательно, можно предположить, что для индукции пыльцевого эмбриогенеза необходимо высокое содержание эндогенной индолилуксусной кислоты в момент инокуляции пыльника, и при этом дифференцированно подбирать концентрацию экзогенной ИУК.

Для тех генотипов, в которых содержится мало ИУК, необходимо использовать более высокие концентрации для обработки растений. Например, для линий ЛГВ3-692-3-5, ЛГВ1-92-2, где приблизительно одинаковое содержание ИУК, повышение концентрации экзогенного ауксина до 0,1% увеличивает частоту выхода эмбриоидов по сравнению с контролем [22]. Результаты наших экспериментальных исследований по обработке срезанных колосьев абсцизовой кислотой показали, что повышение концентрации АБК до 0,04% снижает эффективность эмбриогенеза для всех испытываемых генотипов.

Влияние физических и химических агентов на пыльцевой эмбриогенез

В настоящее время все больше расширяются виды предварительных обработок растений, используемых в качестве стрессора для перепрограммирования микроспор с нормального гаметофитного на сопрофитный путь развития.



Рис. 5. Стрессоры, широко применяемые, неактуальные и новые (Mehran, 2006)

Fig. 5. Of widely used, neglected and novel stresses

Кроме широко известных видов обработки, описываются и эффективно влияющие на частоту образования гаплоидных структур, так называемые новые виды стрессоров. Группы стрессоров, применяемые для компетенции микроспор, показаны на рисунке 5.

Предобработка пониженными температурами. Известно, что предобработка низкими температурами колосьев злаковых [23,24] и цветочных бутонов цитрусовых [25] повышает эффективность пыльцевого эмбриогенеза. Существует множество сообщений, в которых обсуждаются вопросы предобработки растений. Например, почему предобработка низкими температурами способствует повышенному выходу гаплоидных зародышей: понижает процесс деградации в тканях пыльника, защищая микроспоры от токсичных соединений, ведущих к распаду пыльников [26]; облегчает выживание большего количества эмбрионных пыльцевых зерен [27]; увеличивает частоту эндоредупликации и приводит к увеличению спонтанных дигаплоидных растений [28]. Утвердилось мнение о том, что микроспоры, в обработанных холодом пыльниках, отделяются от тапетума, приводящего в свою очередь к углеродному голоданию, как один из индукторов эмбриогенеза пшеницы [29], риса [30]. Возможно, что при холодной предобработке микроспоры адаптируются к измененным условиям метаболизма и тем самым индуцирует пыльцевой эмбриогенез.

При изучении индукции пыльцевого эмбриогенеза на уровне генов выявлено, что во время холодной обработки экспрессируют два маленьких гена белков теплового шока (HSP гены) [31]. У твердой пшеницы холодная предобработка увеличивает выход зеленых регенерантов, как предполагают *Labban* с соавторами, возможно, при этом ингибируются механизмы старения [23].

Детальный мониторинг ранних и более поздних публикаций исследователей о влиянии стрессоров на частоту выхода пыльцевого эмбриогенеза, а также о механизмах репрограммирования микроспор приводится в новых обзорах [32, 33].

В мировой практике большое внимание уделяют предобработке эксплантов различными химическими и физическими агентами, которые в зависимости от концентрации и временной экспозиции могут влиять положительно на индукцию эмбриогенеза в условиях *in vitro*. Например, обработка изолированных микроспор колхицином является эффективным для *V. narpus* [34]. Колхицин можно использовать как

деполимеризирующий агент микротрубочек, ведущий к изменениям во время деления клеток [35]. Данные об эффективности влияния на преклоение программы развития микроспор отмечены для рапса [36] и кукурузы [37]. У пшеницы обработка изолированных микроспор колхицином (до 3 мМ в течение 24-48 ч) увеличивала процентный выход фертильных регенерантов с 15% (в контроле) до 53% [38].

γ-облучение. Увеличение индукции эмбриогенеза в культуре пыльников при использовании γ-облучения отмечено для *Nicotiana, Datura uWheat*[39,40]. Однако противоречивые результаты получены на других культурах.

Гипертонический шок. Предобработка пыльников пшеницы сахарозой в концентрации 0,8 М приводила к увеличению частоты индукции эмбриогенеза [41]. Некоторые положительные результаты получены и при совместной обработке пыльников 0,8 М сахарозой с 3% активированным углем. Начало спорофитного деления было отмечено при предварительном культивировании микроспор перца в течение 4 часов на среде с обогащенной сахарозой, и затем культивирование на среде без нее [42].

Пониженное атмосферное давление. Существует мнение о повышении эффективности пыльцевого эмбриогенеза при использовании в качестве предобработки пониженного атмосферного давления. Возможно, что низкий уровень атмосферного O₂ или быстрое истощение газов в период культивирования пыльников стимулирует эмбриогенез. Положительное влияние пониженного атмосферного давления показано на табаке [21].

Факторы феминизации пола. В литературе имеются данные об использовании веществ, сдвигающих пол растения в сторону феминизации. Например, предобработки растений-доноров табака путем распыления и орошение почвы нафтилуксусной кислотой и Alar 85 увеличивали частоту пыльцевого эмбриогенеза [43]. В то время как для перца (*Capsicum annuum*L) применение гибберелловой кислоты и этрела, как факторов детерминации пола, было не эффективным[44].

В наших экспериментальных исследованиях, при использовании аконитовой и феруловой кислоты в качестве феминизирующего фактора, выявлено, что феруловая кислота не влияет на частоту эмбриогенеза. По результатам наших исследований, использование в культуре пыльников пшеницы других агентов половой детерминации также не дали положительных результатов, например, хлорэтиловая кислота, гибберелловая кислота (ГК). Наши результаты согласуются с данными литературных источников. Предобработка срезанных растений аконитовой кислотой не оказала существенного влияния на частоту эмбриогенеза. Однако эмбриониды, полученные на варианте, проявили высокий морфогенетический потенциал, в результате чего в 100% случаев из них формировались растения-регенеранты, что не было отмечено в других вариантах[45].

Среда с высоким уровнем рН. В последнее время появились работы, в которых обсуждаются преимущества использования в культуре пыльников и микроспор различных уровней рН среды для индукции эмбриогенеза. Например, у табака формирование эмбрионидов наблюдали при рН 5,0. При высоком уровне рН установлено, что активность инвертазы сильно понижается, приводя к понижению расщепления сахарозы [46] Таким образом, истощение, т.е. углеродное голодание приводит к репрограммированию и, следовательно, к переключению микроспор на спорофитный путь развития.

Стресс на тяжелые металлы. Тяжелые металлы, такие как CdCl в концентрации 0,6 М, успешно используется в качестве стрессовой обработки для индукции эмбриогенеза микроспор [47].

Обработка различными кислотами. Например, 2-гидрооксиникотиновая кислота (2-ГНК), бензотриазол (БТ), БТ-5-карбоксиловая кислота (Б-5-КК), 2,3-пиридин карбоксиловая кислота (2,3-ПКК), в частности, 2-ГНК, Б-5-КК оказались высокоэффективными[48]. Положительный эффект совместного использования

предобработки льна 1-нафтилуксусной кислотой и паклобутразола (0,1 мг/л нафтилуксусная кислота+10 мг паклобутразола) показан [49]. Возможно, что химические вещества не только запускают процесс эмбриогенеза, но и воздействуют на дальнейшую регенерацию зеленых растений в культуре пыльников и микроспор.

Таблица 2. Влияние незначимых и новых стрессов на пыльцевой эмбриогенез для разных видов растений (Mehran, 2006)

Table 2. Influence of insignificant and new stresses on a pollen embryogenesis for different types of plants

Виды растений Plant types	Стресс Stress	Стадия развития пыльника Microspore stage	Результаты Result	Способы System
Табак Tobacco	pH	Поздняя одноклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Табак Tobacco	pH	Поздняя одноклеточная, премейотическая	Многочле- точные образования	Культура пыльников
Брокколи Broccoli	Каррагенан олигосахариды+ повышенная t	Поздняя одноклеточная, ранняя двухклеточная	Симметрич- ное деление	Культура пыльников
Табак Tobacco	АБК	Ранняя двухклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Табак Tobacco	Низкое атмосферное давление	Ранняя двухклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Пшеница Wheat	Гипертоничес- кий шок	Средняя и поздняя одноклеточная	Каллус, регенерант	Культура пыльников
Табак Tobacco	Цетрифугирова- ние	Поздняя одноклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Пшеница Wheat	Индуктор- химикаты	Средняя и поздняя одноклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Пшеница Wheat	Индуктор- химикаты/ повышенная температура	Средняя и поздняя одноклеточная	Эмбриоид, регенерант	Культура пыльников
Кукуруза Maize	Индуктор- химикаты/ холод	Поздняя одноклеточная, ранняя двухклеточная	Эмбриоид/ каллус, регенерант	Культура пыльников

В обзоре *Mehran E.* с соавторами приведены все виды предварительной обработки растений и их результаты. В работе показана их эффективность на выход пыльцевых эмбриоидов, принадлежащих к различным видам растений, которые использовались в ранних работах, а также обсуждаются новые виды стрессоров для индукции пыльцевого эмбриогенеза (таблица 2). В данной таблице приводятся и авторы, которые получили результаты по обработке пыльников на разных стадиях развития [50].

В книге *Roberta H. Smith (2013)*, которая является итогом многолетних работ по культуре тканей, в частности, в 9 главе обсуждаются вопросы предобработки, которые прямо коррелируют с реакцией ответа генотипа при культивировании пыльников и микроспор (51).

Одни стрессы используются в широком диапазоне разновидностей, тогда как другие применимы только в ограниченном числе. Например, показано, что такие факторы как высокая температура и голодание самостоятельно или в комбинации друг с другом эффективны для табака (*Solanaceae*), пшеницы (*Poaceae*) и *B. napus* (*Brassicaceae*). Однако, томаты, которые находятся в том же семействе, что и табак, эти стрессовые условия не приводят к положительным результатам.

Выбор физических и химических агентов, влияющих на пыльцевой эмбриогенез, зависит от вида растений, от концентраций, времени и способов обработки. Важным моментом стрессового воздействия является то, что одни стрессоры влияют на индукцию эмбриогенеза, другие на выход растений–регенерантов. Ни один из вышеназванных агентов не является универсальным индуктором спорофитного развития микроспор. Кроме того, для разных видов одни и те же индукторы способствуют как симметричному, так и асимметричному делению микроспор.

Таким образом, до конца не выяснено, какой из перечисленных стрессоров является направляющим по переключению микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития. Кроме того, не выяснено, какие из них играют прямую, а какие косвенную роль в изменении механизмов развития репродуктивных клеток.

Итак, гаплоидные технологии являются перспективными в поиске путей по расширению генетического базиса растений на устойчивость биотическим и абиотическим стрессам. В генно-инженерных работах также применяют технологию быстрой гомозиготизации или индукции рецессивных мутации через культуру пыльников [52]. Использование удвоенных гаплоидных линий облегчает картирование ценных агрономических признаков [53]. Следующей перспективной возможностью гаплоидных технологий являются определённые преимущества селекции мужского гаметофита, который может иметь позитивный эффект на появляющуюся в результате спорофитную генерацию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время создана экспериментальная система по повышению эффективности пыльцевого эмбриогенеза и выявлена роль гормональных предобработок растений-доноров в индукции спорофитного пути развития микроспор растений. Определённый баланс фитогормонов способствует повышению компетенции микроспор, который необходим для эффективного использования гаплоидных технологий. При переключении развития микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития важным является экзогенная предобработка срезанных растений гормонами ауксинового типа действия – ИУК, 2,4-D, но с учетом содержания эндогенного ИУК в растениях. Вариабельность концентраций гормонов является генотип-зависимым показателем, и оптимизированные для одного генотипа условия культивирования не могут подходить для других гибридов, сортов и линий. Кроме того, для переключения программы развития микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития микроспор является важным фактором обработка химическими и физическими агентами, которая зависит от генетической конституции вида растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Forster B.P., Heberle-Bors E., Kasha K.J., Touraev A. *The resurgence of haploids in higher plants*// *Trends Plant Sci.* –2007, Aug. – №12(8). – P. 368-375.
2. Xu L., U. Najeeb *Haploid and Doubled Haploid Technology* // *Advances in Botanical Research.* – 2007. –Vol. 45. – P.181-216.

3. Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // *Plant Cell Rep.* – 2011. – №30(5). – P. 839-857.
4. Ribarits A. Combination of reversible male sterility and doubled haploid production by targeted inactivation of cytoplasmic glutamine synthetase in developing anthers and pollen // *Plant Biotechnol. J.* – 2007. – №5. – P. 483-494.
5. COST action 851 website.
6. Konzak C.F., Zhou H. Anther culture methods for double haploid production in wheat // *Cereal Res. Comm.* – 1991. – №19: – P. 147-164.
7. Data S., Potrykus I. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both “Indica” and “Japonica” rice (*Oryza s.*) // *Plant Science.* – 1990. – №67. – P. 83-88.
8. Hu H. In vitro induced haploids in wheat. In: Jain S.M., Sopory S.K. / R.E. Veilleux (eds) *In vitro haploid production in higher plants.* – Kluwer, Dordrecht, 1997. – P. 73-97.
9. Supena J., Winarto B., Riksen T., Dubas E., A. van Lammeren, Offringa R., Boutilier K., Custers J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning // *Journal of Experimental Botany.* – 2008. – №59(4). – P. 803.
10. Seguí-Simaro J.M., Nuez F. How transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspores-derived embryogenesis. *Physiologia plantarum/Physiol Plant.* – 2008. – Vol.134(1). – P. 1-12.
11. Кулаева О.Н. Новейшие достижения и перспективы изучения механизма действия фитогормонов в сигнальных системах целого растения // *Вестник РФФИ.* – 2004. – №2. – P. 12-26.
12. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // *Гормональная регуляция онтогенеза растений.* – М., 1984. – С. 42-54.
13. Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н. Методические рекомендации по исследованию морфогенетического потенциала пыльника яровой мягкой пшеницы // *ИБ УНЦ РАН.* – Уфа, 2001. – 39 с.
14. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // *Изв. РАН. Сер. Биол.* – 2001. – №1. – С. 31-36.
15. Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: дис ... докт. биол. наук. – М., 2000. – 378 с.
16. Chen Y., Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax *linum usitatissimum* L. anther culture // *Plant Cell Rep.* – 2002. – №21. – P. 204-207.
17. Assani A., Bakry F., Kerbellec F., Haicour R. et al. Production of haploids from anther culture of banana [*Musa balbisiana* {BB}] // *Plant Cell Rep.* – 2003. – №21. – P. 511-516.
18. Moieni A., Sarrafi A. The effects of gibberllic acid phenyleththula mine, 2,4-D and genotypes with on androgenesis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) // *Cereal res. Common.* – 1996. – Vol. 24, №2. – P. 139-145.
19. Koniczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2003. – №73. – P. 177-187.
20. Leyser O. Molecular Genetic of Auxin Signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 53. – P. 377-398.
21. Imamura J., Harada H. Stimulatory effect of reduced atmospheric pressure on pollen embryogenesis // *Naturwissenschaften.* – 1980. – №67. – P. 357-358.
22. Беккужина С.С., Калашикова Е.А. Роль ИУК в процессе андрогенеза *in vitro* яровой мягкой пшеницы // *Естественные и технические науки.* – 2010. – №5. – С. 158-162.
23. Labbani Z., Richard N., J. De Buyser, Picard E. Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pretreatment // *CR Biol.* – 2005. – №328. – P. 713-723.

24. Marciniak K., Kaczmarek T., Adamski, Surma M. The anther-culture response of triticale line tester progenies // *Cell Mol Biol Lett.* –2003. – №8. –P. 343-351.
25. Germanà M.A., Chiancone B. Improvement in Citrus clementina ort. Ex Tan. microspore derived embryoids induction and regeneration // *Plant Cell Rep.* –2003. – №22. – P. 181-187.
26. Duncan E.J., Heberle E. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana glauca* and consequently on plant let production // *Protoplasma.* – 1976. – №90. – P. 173-177.
27. Sunderland N., Roberts M. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers // *Ann Bot.* –1979. – №43. –P. 405-414.
28. Amssa M., De Buyser J., Henry Y. Origin of diploid plants obtained by in vitro culture of anthers of young wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Cr Acad Sci D Nat.* –1980. – №290. –P. 1095-1097.
29. Touraev A.A., Ilham O., Vicente E. Heberle-Bors Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies // *Plant Cell Rep.* –1996. – №15. –P. 561-565.
30. Ogawa T., Fukuoka H., Ohkawa Y. Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice // *Breed Sci.* –1994. – №44. –P. 75-77.
31. Sabehat A., Lurie S., Weiss D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries // *Plant Physiology.* – 1998. – №117. – P. 651-658.
32. Islam S.M., Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species // *Plant Sci.* – 2012. – №182. – P. 134-144.
33. Germanà M.A., Benedetta C., Padovana D., Bárányi I. et al. First stages of microspore reprogramming to embryogenesis through anther culture in *Prunus armeniaca* // *L. Plant Sci.* – 2012. – №182. – P. 134-144.
34. Zhou W.J., Hagbery P., Tang G.X. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus* // *Euphytica.* –2002. – №128. – P. 27-34.
35. Kasha K.J., Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J. (eds) *Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants // Biotechnology in Agriculture and Forestry.* –Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005. –Vol. 56. –P. 123-152.
36. Zhao J.P., Simmonds D.H., Newcomb W. Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas // *Topas Planta.* –1996. – №198. – P. 433-439.
37. Obert B., Barnabas B. Colchicine induced embryogenesis in maize // *Plant Cell Tiss Org Cult.* –2004. – №77. –P. 283-285.
38. Hansen N.J.P., Andersen S.B. In vitro chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Euphytica.* –1998. – №102. –P. 101-108.
39. Shtereva L.A., Zagorska N.A., Dimitrov B.D., Kruleva M.M., Oanh H.K. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis // *Plant Cell Rep.* –1998. – №18. –P. 312-317.
40. Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H. et al. Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture // *J Sci Food Agric.* –2014.
41. Wang J.J., Hu D.F., Wang H.M., Tang Y.L. Studies on increasing the induction frequency of pollen callus in wheat // *Hereditas (Beijing).* –1981. – №13. –P. 28-29.
42. Supena E.D., Suharsono S., Jacobsen E., Custers J.B.M. Successful development of anther-culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) // *Plant Cell Rep.* –2005. –P. 35-42.

43. Heberle-Bors E. Induction of embryogenic pollen grains in situ and subsequent in vitro pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. by treatments of the pollen donor plants with feminizing agents // *Physiol Plant.*—1983. —№59:—P. 67-72.
44. Bennett M.D., Hughes W.G. Additional mitosis in wheat pollen induced by ethrel // *Nature.*—1972. —№240. — P. 566-568.
45. Беккужина С.С. Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к засухе и *Septoria nodorum* berk.: дис. ... докт. биол. наук. — Москва, 2011.—134 с.
46. Barinova J., Clement C., Martin L., Baillieul F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snap dragon by medium pH // *Planta.* —2004. —№219. —P. 141-146.
47. Ikeda-Iwai M., Umehara M., Satoh S., Kamada H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant J.*—2003. —№34. —P. 107-114.
48. Zheng M.Y., Liu W., Weng Y., Polle E., Konzak C.F. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals// *Plant Cell Rep.* —2001. — №20. —P. 685-690.
49. Поляков А.В. Биотехнология в селекции льна. — Изд. 2. —М., 2010. —202 с.
50. Mehran E. Shariatpanahi, Ugar Bal, Ervin-Heberli-Bors and Alisher Toraev. Stresses applied for the re-programing of plant microspores towards in vitro embryogenesis // *Physiology Plantarum.* —2006. —P. 1-16.
51. Roberta H. *Haplo Plants from Anther Culture Plant Tissue Culture: Third Edition. Techniques and Smith Experiment.*— 2013. doi:10.1016/B978-0-415920-4.00009-8 <http://books.google.by/8psdGWgbkC&printsec=frontcover&hlonepage=false>.
52. Datta K., Sahoo G., Krishnan S., Ganguly M. Datta S.K. *PLoS One.*—2014. - №9(6):e100212. doi: 10.1371.
53. Perera P.I., Ordoñez C.A., Dedicova B., Ortega P.E. Reprogramming of cassava (*Manihot esculenta*) microspores towards sporophytic development *AoB Plants.*—2014. doi: 10.1093.

REFERENCES

1. Forster B.P., Heberle-Bors E, Kasha K.J, Touraev A The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 2007, Aug., no. 12(8), pp. 368-375. PMID: 17629539.
2. Xu L., Najeeb U. Haploid and Doubled Haploid Technology. *Advances in Botanical Research*, 2007, vol. 45, pp. 181-216.
3. Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.*, 2011, vol.30, no.5, pp.839-57. PMID:21431908.
4. Ribarits A. Combination of reversible male sterility and doubled haploid production by targeted inactivation of cytoplasmic glutamine synthetase in developing anthers and pollen. *Plant Biotechnol. J.*, 2007, vol. 5, pp. 483-494.
5. COST action 851 website.
6. Konzak C.F., Zhou H. Anther culture methods for double haploid production in wheat. *Cereal Res. Comm*, 1991, no. 19, pp. 147-164.
7. Data S., Potrykus I. Embryogenesis and plant regeneration from microspores of both "Indica" and "Japonica" rice (*Oryza s.*). *Plant Science*, 1990, no. 67, pp.83-88.
8. Hu H. In vitro induced haploids in wheat. In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, Kluwer, Dordrecht, 1997, pp.73-97.
9. Supena J., Winarto B., Riksen T., Dubas E., A. van Lammeren, Offringa R., Boutilier K., Custers J. Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role

for the suspensor in early embryo patterning. *J. of Experimental Botany*, 2008, no. 59(4), pp. 803. doi:10.1093/jxb/erm358.

10. Segui-Simaro J.M., Nuez F. How transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspores-derived embryogenesis. *Physiol Plant*, 2008, vol. 134, no. 1, pp. 1-12. doi:org/ 10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x.

11. Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V. *Analiticheskii obzor: novejschie dostizhenija i perspektivy izuchenija mehanizma dejstvija fitogormonov v signalnyh sistemah celogo rastenija [Analytical review: the latest achievements and prospects of studying the mechanism of plant hormones action and their participation in the signaling systems in the plant]*. Vestnik RFFI- Bulletin of RFFI, 2004, no. 2, pp. 12-26.

12. Butenko R.G. *Indukcija morfogeneza v culture tkanej rastenij Gormonalnaja regulacija ontogeneza rastenij. [Induction of morphogenesis in the plant tissue culture]. Hormonal regulation of plant ontogenesis*, 1984, pp. 42-54.

13. Batygina T.B., Kruglova N.N. *Metodicheskie rekomendacii po issledovaniju morfogeneticheskogo potenciala pylnikajarovojm jagkojpsHENICY [Methodological recommendations on research morphogenetic potential anther spring wheat]*. IB UNC RAN. Ufa, 2001, 39 p.

14. Gorbunova V.IU., Kruglova N.N., Abramov S.N. *Indukcija androgeneza in vitro u ijaravoimijagkoipshenizy; balans endogennyh i egzogennyh fitogormonov [Induction of in vitro androgenesis of spring wheat: the balance of endogenous and exogenous phytohormones]*. Izv. RAN, ser. biol. I. RAN Ser. Biol., 2001, no. 1, pp. 31-36.

15. Gorbunova V.IU. *Androgenez in vitro u ijaravoimijagkoipshenizy; Diss. dokt. biol. nauk [In vitro androgenesis of spring wheat. Dr. biol. sci. diss.]*. Moscow, 2000, 378 p.

16. Chen Y., Dribnenki P. *Effect of genotype and medium composition on flax *linum usitatissimum* L. anther culture*. *Plant Cell Rep.*, 2002, vol. 21, pp. 204-207. doi:10.1007/s00299-002-0500-x.

17. Assani A., Bakry F., Kerbellec F., Haicour R. et al. *Production of haploids from anther culture of banana [Musa balbisiana {BB}]*. *Plant Cell Rep.*, 2003, no. 21, pp. 511-516.

18. Moieni A., Sarrafi A. *The effects of gibberellic acid phenylethylamine, 2,4-D and genotypes with on androgenesis in hexaploid wheat (Triticum aestivum)* *Cereal Res. Commun.*, 1996, vol. 24, no. 2, pp. 139-145.

19. Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. *Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, no. 73, pp. 177-187. doi: 10.1023/A:1022877807237.

20. Leyser O. *Molecular Genetic of Auxin Signaling* *Annu. Rev. Plant Biol*, 2002, vol. 53, pp. 377-398. PMID:12221981.

21. Imamura J., Harada H. *Stimulatory effect of reduced atmospheric pressure on pollen embryogenesis*. *Naturwissenschaften*, 1980, no. 67, pp. 357-358. doi: 10.1007/BF01106594.

22. Bekkuzhina S.S., Kalashnikova E.A. *Rol' IAA v prozesse androgenezain vitro ijaravoimijagkoipshenizy [The role of IAA in the in vitro androgenesis of spring wheat]*. *Nature and Engineering Sciences*, 2010, no. 5, pp. 158-162.

23. Labbani Z., Richard N., J. De Buyser, Picard E. *Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pretreatment*. *CR Biol.*, 2005, no. 328, pp. 713-723. doi:10.1016/j.crv.2005.05.009.

24. Marciniak K., Kaczmarek T., Adamski, Surma M. *The anther-culture response of triticale line tester progenies*. *Cell Mol Biol Lett*, 2003, no. 8, pp. 343-351. PMID:12813569.

25. Germanà M.A., Chiancone B. *Improvement in Citrus clementina ort. Ex Tan. microspore derived embryos induction and regeneration*. *Plant Cell Rep*, 2003, no. 22, pp. 181-187. PMID:12879259.

26. Duncan E.J., Heberle E. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotianatabacum* and consequently on plant let production. *Protoplasma*, 1976, no. 90, pp. 173-177. doi.org/ 10.1007/BF01276486.
27. Sunderland N., Roberts M. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann Bot*, 1979, no. 43, pp. 405–414.
28. Amssa M., De Buysers J., Henry Y. Origin of diploid plants obtained by in vitro culture of anthers of young wheat (*Triticumaestivum* L.). *Cr AcadSci D Nat.*, 1980, no. 290, pp. 1095-1097.
29. Touraev A.A., Ilham O., Vicente E., Heberle-Bors Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.*, 1996, no. 15, pp. 561-565. doi.org/ 10.1007/BF00232453.
30. Ogawa T., Fukuoka H., Ohkawa Y. Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. *Breed Sci.*, 1994, no. 44, pp. 75-77.
31. Sabehat A., Lurie S., Weiss D. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology*, 1998, no. 117, pp. 651-658. doi.org/10.1104/pp.117.2.651.
32. Islam S.M., Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci.*, 2012, no. 182, pp. 134-144.
33. Germanà M.A., Benedetta C., Padovana D., Bárány I. et. al. First stages of microspore reprogramming to embryogenesis through anther culture in *Prunus armeniaca* L. *Plant Sci*, 2012, no. 182, pp. 134-44.
34. Zhou W.J., Hagbery P., Tang G.X. Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicines treatment of isolated microspores in spring. *Brassica napus Euphytica*, 2002, no. 128, pp. 27-34. doi.org/ 10.1023/A:1020687517888.
35. Kasha K.J., Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K.J. (eds) Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 2005, vol. 56. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 123-152. doi.org/ 10.1007/3-540-26889-8_7.
36. Zhao J.P., Simmonds D.H., Newcomb W. Induction of embryogenesis with colchicines instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. *Topas*. *Topas Planta*, 1996, no. 198, pp. 433-439. doi.org/ 10.1007/BF00620060.
37. Obert B., Barnabas B. Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2004, no. 77, pp. 283-285.
38. Hansen N.J.P., Andersen S.B. In vitro chromosome doubling with colchicines during microspore culture in wheat (*Triticumaestivum* L.). *Euphytica*, 1998, no. 102, pp. 101-108. doi.org/10.1023/A:1018348816205.
39. Shtereva L.A., Zagorska N.A., Dimitrov B.D., Kruleva M.M., Oanh H.K. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis. *Plant Cell Rep.*, 1998, no. 18, pp. 312-317. doi.org/ 10.1007/s002990050578.
40. Zhao L., Liu L., Wang J., Guo H. et. al. Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture. *J Sci Food Agric.*, 2014, Apr 11. doi: 10.1002/jsfa.6691. [Epub ahead of print].
41. Wang J.J., Hu D.F., Wang H.M., Tang Y.L. Studies on increasing the induction frequency of pollen callus in wheat. *Hereditas (Beijing)*, 1981, no. 13, pp. 28-29.
42. Supena E.D., Suharsono S., Jacobsen E., Custers J.B.M. Successful development of ashed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Rep.*, 2005, pp. 35-42. doi.org/101007/s00299-005-0028.
43. Heberle-Bors E. Induction of embryogenic pollen grains in situ and subsequent in vitro pollen embryogenesis in *Nicotianatabacum* L. by treatment of the pollen donor plants with feminizing agents. *Physiol Plant*, 1983, no. 59, pp. 67-72. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb06572.x.

44. Bennett M.D., Hughes W.G. Additional mitosis in wheat pollen induced by ethrel. *Nature*, 1972, no. 240, pp. 566-568. doi:org/10.1038/240566a0.
45. Bekkuzhina S.S. *Gaploidnye tehnologii v uskorennom sozdanii ishodnyh form i liniy jarovoj mjagkoj pshenicy, ustojchivyh k zasuhe i Septoria nodorum berk. Doct. Diss. Moscow, 2011, 134 p.*
46. Barinova J., Clement C., Martin L., Baillieul F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snap dragon by medium pH. *Planta*, 2004, no. 219, pp. 141-146. doi:org/10.1007/s00425-003-1202-5.
47. Ikeda-Iwai M., Umehara M., Satoh S., Kamada H. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.*, 2003, no. 34, pp. 107-114. PMID:12662313.
48. Zheng M.Y., Liu W., Weng Y., Polle E., Konzak C.F. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Rep*, 2001, no. 20, pp. 685-690. doi:org/10.1007/s00299-001-0393-0.
49. Polijakov A.V. *Biotehnologija v selekziilna [Biotechnology in breeding of flax]. Izdanievtoroe. Moscow, 2010, 202 p.*
50. Mehran E. Shariatpanahi, UgarBal, Ervin-Heberli-Bors and AlisherToraev. Stresses applied for the re-programing of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiology Plantarum*, 2006, pp. 1-16. doi:org/10.1111/j1399-3054.2006.00675x.
51. Roberta H. *HaploPlants from Anther Culture Plant Tissue Culture: Third Edition. Techniques and Smith Experiment*, 2013. doi:10.1016/B978-0-415920-4-00009-812.
52. Datta K., Sahoo G., Krishnan S., Ganguly M. Datta SK. *PLoS One. Genetic stability developed for β -carotene synthesis in BR29 rice line using dihaploid homozygosity. PLoS One.*, 2014, no. 9(6). doi: 10.1371.
53. Perera P.I., Ordoñez C.A., Dedicova B., Ortega PE. *Reprogramming of cassava (Manihot esculenta) microspores towards sporophytic development AoB Plants.*, 2014, no. 6. pii: plu022. doi: 10.1093/aobpla/plu022.

ТҮЙІН

Мақалада гаплоидтық технологиялардың теориялық және қолданбалы аспектілері бойынша әлемдік әдебиетке шолу берілді, атап айтқанда, тозаң эмбриогенезінің тиімділігін арттыру жолдары қарастырылады. Аналитикалық шолуда микроспоралар дамуының спорофиттік жолын индукциялауда донор-өсімдіктерді алдын ала гормональдық өңдеудің рөлін анықтау жөніндегі мәселелер толық талқыланады. Фитогормондардың тепе-теңдігі микроспораларды гаметофиттік даму жолынан спорофиттікке ауыстыруда негізгі тетіктердің бірі болып табылады. Бұдан басқа, микроспораларды гаметофиттік даму жолынан спорофиттік даму жолына қайта бағдарламалауға түрлі стрессорлар әсерінің мәселелері егжей-тегжейленеді. Бұл мәселені талқылау кезінде барлық пайдаланылатын алдын ала өңдеу өсімдіктері өсіріндіге *in vitro* енгізу алдында алдын ала өңдеудің жаңа және ескі әдістеріне бөлінген.

Біздің тәжірибелік зерттеуіміздің нәтижесі, микроспоралардың дамуын гаметофитті жолдан спорофитті жолға ауыстыру негізінде, өсімдіктерде эндогенді ИСК -тің болуына байланысты кесілген өсімдіктерді ИСК және 2,4-D ауксин гормондарымен алдын ала өңдеу арқылы, тиімді биологиялық жүйе құру болып табылады. Өзірленген тәсіл тозаң эмбриогенезінің тиімділігін 8%-ға дейін арттырады. Жалпыға бірдей алдын ала өңдеу әдістері гормондық факторды индукциялық ортаға қосуға негізделген, ал біздің тәжірибемізде алдын ала өңдеуге кесілген өсімдіктер қолданылды.

Кілтті сөздер: эмбриогенез, андрогенез, гаплоидтар, дигаплоидтер, тозаң, өсу реттеуіштері, стресс, микроспоралар, спорофит, гаметофит, сұрыптау.

