Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):86-94
DOI 10.18699/VJ19.466

Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов

Т.И. Дьячук ✉, О.В. Хомякова, В.Н. Акинина, И.А. Кибкало, А.В. Поминов

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия
✉ e-mail: cell_selection@list.ru

Гаметический эмбриогенез является одной из форм тотипотентности растительной клетки, при которой клетки мужского или женского гаметофитов проявляют способность формировать эмбриоиды (спорофит). Регенерация гаплоидных растений из эмбриоидов и последующее удвоение числа хромосом приводят к получению удвоенных гаплоидов, или DH-линий. Технологии производства удвоенных гаплоидов дают возможность одноступенчатого создания гомозигот из гетерозиготных растений. Разработка эффективных гаплоидных протоколов имеет большое значение для селекции, их применение сокращает время и затраты для создания новых сортов. Микроспоровый или пыльцевой эмбриогенез используется более широко в сравнении с другими методами получения гаплоидных растений. В значительной степени это связано с большим количеством мужских гаметофитов в пределах одного пыльника по сравнению с единичными гаметофитами в зародышевом мешке. Переключение культивируемых *in vitro* микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития, как правило, индуцируется различными стрессами, применяемыми на донорные растения, соцветия, изолированные пыльники или микроспоры в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. Физические и химические предобработки (холодовой и тепловой шок, углеводное голодание, колхицин, бутанол) действуют как триггеры, индуцирующие спорофитный путь развития, и предотвращают гаметофитное развитие микроспор. Накопленные литературные данные позволяют предположить, что холодовой шок влияет фактически как антистрессовый фактор, смягчающий действие реального стресса, вызванного голоданием изолированных от растения пыльников или микроспор. Под воздействием стрессов сильновакуолизированная поляризованная микроспора трансформируется в деполяризованную и дедифференцированную клетку, что является обязательным условием для репрограммирования ее развития в спорофит (эмбриоид). В настоящем обзоре мы обобщили данные о роли различных стрессов в индукции микроспорового эмбриогенеза и некоторые возможные механизмы их действия на клеточном и молекулярном уровне. Выявление новых стрессов и способов их воздействий, повышающих потенциал микроспорового эмбриогенеза, позволит создать эффективные протоколы получения DH-линий для их использования в селекции экономически ценных видов растений.

Ключевые слова: гаплоиды; удвоенные гаплоиды; гомозиготность; культура пыльников и микроспор; микроспоровый эмбриогенез; стрессы.

Для цитирования: Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А., Поминов А.В. Микроспоровый эмбриогенез *in vitro* – роль стрессов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466

Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses

T.I. Djatchouk ✉, O.V. Khomyakova, V.N. Akinina, I.A. Kibkalo, A.V. Pominov

Agricultural Research Institute of South-East Region, Saratov, Russia
✉ e-mail: cell_selection@list.ru

Gametic embryogenesis is one form of totipotency of plant cells, in which either male or female gametes are induced to form embryoids (sporophytes). Regeneration of haploid plants from embryoids and subsequent chromosome duplication result in doubled haploids and DH-lines. The production of haploids and doubled haploids (DHs) through gametic embryogenesis allows a single-stage development of complete homozygous lines from heterozygous plants. The development of effective haploid protocols to produce homozygous plants has a significant impact on plant breeding, shorting the time and costs required to establish new cultivars. There are several available methods to obtain haploids and DHs-lines, of which anther or isolated microspore culture *in vitro* are the most effective. Microspore embryogenesis is more commonly applied. This is in part because more male gametophytes are contained in a single anther compared to the single female gametophyte per embryo sac. Microspore embryogenesis is regarded as one of the most striking examples of plant cell totipotency. The switch of cultured microspores from gametophytic to sporophytic mode of development has been induced by stress treatments of various kinds applied to donor plants, inflorescences, buds, anthers or isolated microspores both *in vivo* and *in vitro*. Physical or chemical pretreatments (cold and heat shock,

© Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А., Поминов А.В., 2019

sugar starvation, colchicine, n-butanol, gametocydes) act as a trigger for inducing the sporophytic pathway, preventing the gametophytic pathway development of microspore. The recent investigations have revealed that cold pretreatment during microspore reprogramming acts rather as an anti-stress factor alleviating the real stress caused by nutrient starvation of anthers or microspores isolated from donor plants. Under stress pretreatment a vacuolated and polarized microspore transformed into a depolarized and dedifferentiated cell, which is an obligatory condition for reprogramming their development. We summarize data concerning the role of various stresses in the induction of microspore embryogenesis and possible mechanisms of their action at cellular and molecular levels. Identification of new stresses allows creating efficient protocols of doubled haploid production for end-user application in the breeding of many important crops.
Key words: haploids; doubled haploids; homozygosity; anther and microspore culture; microspore embryogenesis; stresses.

For citation: Djatchouk T.I., Khomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Pominov A.V. Microspore embryogenesis *in vitro*: the role of stresses. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(1):86-94. DOI 10.18699/VJ19.466 (in Russian)

Введение

Получение гаплоидных растений в культуре *in vitro* мужских и женских генеративных структур – одно из востребованных направлений современной биотехнологии. Дальнейшее удвоение числа хромосом гаплоидов приводит к созданию гомозиготных DH-линий. Главным их преимуществом является использование в селекции для сокращения семи-восьми половых генераций, необходимых для стабилизации гибридного генотипа. Разработаны технологии производства гаплоидов у экономически значимых видов – пшеницы, ячменя, тритикале, риса, рапса (Wędzony, 2003; Pauk et al., 2009; Weyen, 2009; Игнатова, 2011; Шмыкова и др., 2015). С их использованием создано около 300 сортов экономически значимых сельскохозяйственных культур, 150 из которых принадлежат представителям семейства Poaceae. Число сортов, выведенных с применением гаплоидных биотехнологий, постоянно увеличивается (Dunwell, 2010). В ряде регионов мира DH-сорта становятся доминирующими. Например, в Европе 50 % возделываемых сортов ячменя получены с привлечением гаплоидных биотехнологий, тогда как в Канаде три из пяти сортов пшеницы с наибольшими площадями – это DH-сорта (Germana, 2011).

Среди существующих различных методов продукции гаплоидных растений наибольшее практическое применение имеет культура пыльников и ее разновидность – культура изолированных микроспор. В отличие от гаметофитного, спорофитный путь развития характеризуется формированием эмбриоподобных структур (псевдозародышей) из микроспор, приводящим к формированию гаплоидных растений. Этот феномен, известный как андрогенез *in vitro* (гаплоидный эмбриогенез, микроспоровый эмбриогенез, андроклиния), возникает, когда пыльники растений, изолированные на определенной стадии развития, культивируются на относительно простых средах с гормональными добавками или без них (Круглова и др., 2005; Clement et al., 2005; Segui-Simarro, 2010; Germana, 2011; Шмыкова и др., 2015).

Микроспоровый или пыльцевой эмбриогенез является одним из наиболее ярких примеров тотипотентности растительной клетки (Reynold, 1997; Cistué, Kasha, 2005; Segui-Simarro, 2010). Первые сообщения об индукции спорофитного развития микроспор появились во второй половине XX века (Guha, Maheshwari, 1964). Успешная индукция микроспорового эмбриогенеза установлена более чем у 250 видов растений (Maluszynski et al., 2003).

Тем не менее до сих пор существуют ограничивающие факторы, сдерживающие широкое применение гаплоидных биотехнологий. Главные из них – генотипическая зависимость и низкая частота регенерации растений. Для многих видов злаков важнейшей проблемой гаплопродукции в культуре пыльников *in vitro* остается высокая доля альбиносных регенерантов (Soriano et al., 2008; Игнатова, 2011; Germana, 2011). Названные проблемы сдерживают разработку эффективных протоколов производства гаплоидных растений и удвоенных гаплоидов, сокращающих сроки и затраты на создание сортов по сравнению с традиционной селекцией.

Универсальных технологий получения гаплоидных растений в культуре *in vitro* пыльников (микроспор) для разных видов не существует, однако основные их этапы остаются неизменными. Они включают: выращивание и отбор донорных растений, предобработку соцветий или пыльников различными стрессовыми факторами, вычленение пыльников (микроспор) и их культивирование в условиях *in vitro*, индуцирование эмбриогенеза, регенерацию растений, удвоение числа хромосом растений-регенерантов. На отзывчивость пыльников при культивировании *in vitro* влияют многочисленные эндогенные и экзогенные факторы: условия выращивания донорных растений, генотип, способы и продолжительность предобработок соцветий или пыльников, стадия развития пыльника, состав питательных сред (Smykal, 2000; Круглова и др., 2005; Wędzony et al., 2009; Игнатова, 2011; Germana, 2011).

Важной ступенью в повышении эффективности эмбриогенной (эмбриоидогенной, по (Круглова и др., 2005)) отзывчивости культивируемых пыльников является понимание механизмов индукции спорофитного развития микроспор *in vitro*. Открытие того, что стресс – это генеральный сигнал, ответственный за смену генетической программы развития микроспор и их переход на спорофитный путь развития, позволило унифицировать модель индукции микроспорового эмбриогенеза и оптимизировать многие технологии получения гаплоидных растений (Touraev et al., 1996a, 1999; Devaux, Pickering, 2005; Żur et al., 2008; Wędzony et al., 2009). По сравнению со стрес-

сом, для спорофитного развития микроспор *in vitro* даже применение гормонов может быть менее критичным, что подтверждает тот факт, что эндогенный баланс гормонов является необходимым условием для микроспорового эмбриогенеза *in vitro* (Aionesei et al., 2005).

Характеристика микроспор как инициальных клеток спорофитного развития

Успешная индукция микроспорового эмбриогенеза *in vitro* зависит от правильной оценки состояния развития мужского гаметофита донорного растения. Морфогенетическая компетентность микроспор проявляется только на определенной стадии их развития. Для большинства видов оптимальной для смены программы развития с гаметофитной на спорофитную обозначается стадия, близкая к первому пыльцевому митозу (Babbar et al., 2004). Критической стадией развития пыльника для индукции морфогенеза *in vitro* по спорофитному пути считается стадия вакуолизированной микроспоры (Clement et al., 2005; Germana, 2011) или сильно вакуолизированной микроспоры (Круглова и др., 2005, 2017). По мнению A. Touraev с соавт. (1996a), продолжительность «эмбриогенного окна» может быть более широкой: оно начинается с фазы G1 микроспоры и продолжается до фазы G1 двухклеточного пыльцевого зерна. Точное «окно» компетенции микроспоры зависит от вида и генотипа донорного растения.

Динамизм микроспоры на стадии отбора определяет ее способность переключаться на спорофитную программу развития. Большинство спорофитно-специфических генных продуктов элиминируют к началу мейоза, а гаметно-специфические гены транскрибируются только после первого пыльцевого митоза, что свидетельствует о нестабильном статусе микроспоры на этой стадии (Segui-Simarro, 2010). После первого пыльцевого митоза гаметофитная программа становится необратимой – происходит формирование пыльцевого зерна (Scott et al., 1991). У некоторых видов растений *in situ* обнаружена фракция аномальных пыльцевых зерен, характеризующихся мелким размером и слабой окрашиваемостью ацетокармином. Такие пыльцевые зерна (P-pollen) могут подвергаться дополнительным делениям *in vivo*, и их последующее гаметофитное развитие тормозится. Этот феномен обозначен как пыльцевой диморфизм, он был изучен у табака, ячменя, пшеницы, ржи (Belogradova et al., 2009). Аномальные пыльцевые зерна, сформированные *in situ*, компетентны к эмбриогенезу *in vitro*, а их частота зависит от генотипа и условий выращивания растений (Heberle-Bors, Reinert, 1981).

Способность к переключению программы развития определяется особенностью структурной организации сильно вакуолизированной микроспоры, прежде всего ее хорошо выраженной полярностью. Четко выраженная полярность проявляется не только во внутреннем, но и во внешнем строении: определенном положении вакуоли (со стороны наружного полюса, обращенного к тапетуму) и ядра (со стороны внутреннего полюса, супротивно поре прорастания). Полярность отражается также в закономерном распределении цитоплазмы, ее органелл и включений и обусловлена целым комплексом факторов, в первую очередь положением микроспоры по отношению к тканям стенки пыльника и созданием ими градиента питательных веществ (Babbar et al., 2004; Круглова и др., 2005, 2017).

По ряду признаков (наличие крупного ядра, хорошо развитой центральной вакуоли и апикально-базальной организации клетки) сильно вакуолизированная микроспора сходна с яйцеклеткой, дающей начало зиготическому зародышу при половом размножении, а также клеткам зародышевого мешка, нуцеллуса и интегументов, формирующим зародыш при апомиксисе. Это дает основание предполагать, что структура всех инициальных клеток нового индивида является универсальной при различных способах репродукции в естественных условиях и в культуре *in vitro* (Batygina, 2011).

Инициальная клетка андрогенеза *in vitro* должна рассматриваться как спорогенная клетка в критической стадии развития. Главным критерием критической стадии развития спорогенной клетки является ее чувствительность к действию экстремальных факторов, определяющая переход к морфогенезу. При этом инициальная клетка должна обладать всеми характеристиками меристематической клетки (Zoriniants et al., 2005; Круглова и др., 2017). Способность сильно вакуолизированной микроспоры переключаться с гаметофитного на спорофитный путь развития позволяет рассматривать ее и как стволовую клетку. Эмбриогенная (морфогенная – термин предложен Кругловой и др. (2005)) микроспора имеет и такие свойства стволовой клетки, как тоти- и плюрипотентность, т. е. способность формировать различные типы тканей и органов, а также новый организм на основе различных путей морфогенеза *in vitro* (Batygina, 2011).

Индукция спорофитного развития при воздействии стрессами

Термин стресс (от англ. *stress* – напряжение) был предложен канадским ученым-физиологом Гансом Селье в 1936 г. для описания реакции организма на любое сильное неблагоприятное воздействие. По мнению F. Bonet с соавт. (1998), микроспоровый эмбриогенез является важным адаптационным механизмом растений, который обнаруживается только в определенных условиях как следствие стрессовых воздействий.

Переключение микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития индуцируется различными стрессами, применяемыми *in vivo* и *in vitro* (Touraev et al., 1996b; Zoriniants et al., 2005; Germana, 2011). Независимо от применяемого стресса, формирование эмбриогенных микроспор сопровождается следующими общими событиями: 1) увеличение объема микроспор; 2) прохождение через репликацию ДНК с задержкой клеточного цикла; 3) аутофагия цитоплазмы; 4) преобразование цитоскелета, приводящего к перемещению ядра из периферического в центральное положение; 5) формирование новой клеточной стенки; 6) компактизация хроматина; 7) изменения экспрессии генов (Aionesei et al., 2005).

Изменения в экспрессии генов могут быть сведены в три принципиальные группы: клеточная отзывчивость на стресс; супрессия гаметофитной программы и экспрессия

спорофитного развития (Pauls et al., 2006). Большое число генов, белков и метаболитов идентифицированы как прямые или косвенные триггеры в каждой из этих стадий. Морфологические, физиологические и молекулярные изменения в микроспорах, развивающихся по спорофитному пути, характерны для всех эукариотических клеток во время стрессового воздействия. Это дает основание предполагать наличие общих реакций в отзывчивости растений на стрессы (Zoriniants et al., 2005).

Первый структурный сигнал индукции спорофитного развития микроспор – дедифференциация цитоплазмы. Этот процесс включает снижение числа органелл, жировых телец, крахмальных зерен и рибосом. Ядро перемещается от периферии к центру микроспоры. Одновременно вакуоль фрагментируется цитоплазматическими лучами. Отмечается менее плотная цитоплазма, отсутствие накопления крахмальных зерен, характерное для созревающих генеративных клеток. В результате формируется так называемая звездчатая структура, состоящая из цитоплазматических тяжей, соединяющих перинуклеарную и субкортикальную область цитоплазмы. Подобная морфология была отмечена на ранних стадиях культивирования микроспор тритикале (Dubas et al., 2010), риса (Raina, Irfan, 1998), пшеницы (Touraev et al., 1996b; Indrianto et al., 2001; Cistué, Kasha, 2005), табака (Touraev et al., 1996a) и других видов растений и рассматривается как начальная ступень эмбриогенного развития. Таким образом, сильно вакуолизированная и поляризованная микроспора трансформируется в деполяризованную и дедифференцированную клетку. Переход на альтернативный путь развития становится необратимым (Touraev et al., 1996a, b; Segui-Simarro, 2010; Germana, 2011).

Наиболее ранним структурным маркером, предсказывающим изменение симметрии делящейся микроспоры, служит появление препрофазной ленты микротрубочек (ППВ). ППВ – кортикальное кольцо микротрубочек, которое образуется в медиальной области микроспоры через несколько часов после применения стрессового воздействия. При нормальном развитии пыльцы ППВ не формируется. Так как ППВ диктует плоскость будущего деления и участвует в стабилизации клеточной стенки, предполагается, что реорганизация микротрубочек – это ключевое событие в изменении программы развития микроспоры (Zhao et al., 1996; Cistué, Kasha, 2005; Dubas et al., 2010). Культивирование пыльников *Brassica napus* на питательной среде, содержащей колхицин, привело к увеличению числа равных делений в микроспорах, что, по мнению авторов (Zhao et al., 1996), подтверждает роль цитоскелета в их спорофитном развитии. Симметричное деление микроспоры является маркером ее эмбриогенного развития (Smykal, 2000; Круглова и др., 2005; Soriano et al., 2013). Блокирование синтеза крахмала как маркера созревания пыльцы и элиминация резервов крахмала – ключевое событие в этом процессе, которое служит надежным маркером спорофитного развития микроспоры (Clement et al., 2005).

Таким образом, стрессы не только необратимо блокируют гаметофитную программу развития микроспор, но и переключают их развитие на спорофитный путь. Открытие того, что стресс служит генеральным сигналом спорофитного развития микроспор, позволило разработать универсальную модель индукции микроспорового эмбриогенеза (Touraev et al., 1996a), включающую три основных этапа:

- необратимое блокирование гаметофитной программы развития при применении стрессовых воздействий. Это необходимое, но не единственное условие для последующего развития эмбриоидов;
- формирование популяции эмбриогенных микроспор за счет изменений на молекулярном уровне;
- реализация спорофитной программы развития на питательной среде, содержащей углеводы (сахарозу).

Пути развития эмбриоидов

В результате различных стрессовых воздействий значительная доля микроспор погибает. Незначительная их часть следует по гаметофитному пути развития с формированием коротких или длинных пыльцевых трубок (Touraev et al., 1996a). Эмбриогенные клетки (микроспоры и двухклеточные пыльцевые зерна) подвергаются делениям по различным сценариям (Aionesei et al., 2005; Soriano et al., 2013).

Деления вегетативной клетки двухклеточного пыльцевого зерна. Роль вегетативной клетки установлена в формировании эмбриоидов табака, пшеницы, риса, кукурузы, см. обзоры (Aionesei et al., 2005; Clement et al., 2005; Germana, 2011).

Симметричное деление микроспоры. Такой путь приводит к образованию двух идентичных клеток в отличие от нормального асимметричного деления, предшествующего образованию пыльцевого зерна. Согласно (Clement et al., 2005), главным сигналом симметричного деления является стресс, и такому сценарию следуют «звездчатые» микроспоры. В этом случае микроспора ведет себя себя как зигота, и различные стадии развития эмбриоида сходны с таковыми у зиготического зародыша. Спорофитные структуры, сформированные за счет равного деления микроспоры, обнаружены у *Brassica napus* (Telmer et al., 1993), пшеницы (Indrianto et al., 2001; Круглова и др., 2005; Cistué, Kasha, 2005), табака (Eady et al., 1995).

Деление как вегетативной, так и генеративной клеток. Эмбриоид, как правило, развивается за счет делений вегетативной клетки. Редкий случай участия генеративной клетки в формировании эмбриоидов был описан для белены черной *Hyoscyamus niger*. Вегетативная клетка либо не делится совсем, либо делится несколько раз с возникновением суспензора (Raghavan, 1976).

Доминирование одного пути развития эмбриоида над другим может происходить даже у одного вида в зависимости от типа и продолжительности стресса, стадии развития пыльника и других факторов (Wędzony et al., 2009; Germana, 2011).

Разные стадии формирования эмбриоидов, их сходства и различия с половыми зародышами приведены в публикациях (Круглова и др., 2005; Clement et al., 2005; Segui-Simarro, 2010; Soriano et al., 2013). Критическая стадия в развитии эмбриоидов – разрыв экзины. Именно в этот период обозначаются различия между генотипами, обусловленные количественной выраженностью дегенерации эмбриоидов (de Buyser, Henry, 1986).

Применяемые стрессовые воздействия

Для изменения спорофитной и гаметофитной детерминации возможны стрессовые воздействия на донорные растения *in vivo*, при этом время воздействия может быть различным: кратковременным (на один этап развития растения) или длительным. В значительной степени это зависит от фактора воздействия, а также от вида растения. Применяется и локальное воздействие *in vitro* на пыльник или соцветие, на изолированный спорофитный комплекс. Независимо от способа воздействия, этим снимается детерминация нормального хода микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна (Круглова и др., 2005; Aionesei et al., 2005). В обзоре (Shariatpanahi et al., 2006a) стрессы поделены на три категории: широко используемые, ничтожные и новые. К широко применяемым стрессам относят температурный шок, углеводное голодание и воздействие колхицином.

Холодовой шок

Наибольшее распространение в опытах по производству гаплоидов у различных видов получила обработка донорных растений пониженными положительными температурами (ППТ) (2–4 °С) в течение 2–7 дней, а иногда и 3–4 недель (Игнатова, 2011; Tian et al., 2015; и др.). Фактически воздействие ППТ стало рутинной процедурой гаплопродукции во многих лабораториях мира. Воздействие пониженными положительными температурами применялось для создания гаплоидов ячменя (Oleszczuk et al., 2006), пшеницы (Игнатова, 2011), риса (Tian et al., 2015), тритикале (Wędzony, 2003), рапса (Gu et al., 2004), клементина (Chiancone, Germana, 2016). При пониженных температурах выдерживаются побеги, соцветия и изолированные пыльники, введенные в культуру (Aionesei et al., 2005; Zoriniants et al., 2005; Germana, 2011). Частота формирования эмбриоидов существенно повышается. Холодовой стресс часто применяют в комбинации с осмотическим стрессом или голоданием (углеводным или азотным) (Touraev et al., 1996b, 1999).

Однако влияние ППТ на культивируемые пыльники или микроспоры не всегда однозначно. В опытах с двумя широко возделываемыми в Греции сортами пшеницы Acheloos и Vergina и их гибридами было показано, что холодовые предобработки не являются необходимыми для гаплопродукции в культуре пыльников, основную роль играют генотип донорного растения и температура культивирования пыльников (Xynias et al., 2001).

Изучение эффекта холодового воздействия на отзывчивость культивируемых пыльников тритикале показало, что спорофитное развитие микроспор происходит и в пыльниках свежеубранных колосьев, причем у некоторых генотипов с большей частотой по сравнению с пыльниками, подвергающимися воздействию этого стресса (Дьячук и др., 2010). Инициация спорофитного развития микроспор без стрессовых воздействий была достигнута в культуре пыльников ячменя и пшеницы (Ohnoutková et al., 2000; Shariatpanahi et al., 2006b). Эти эксперименты свидетельствуют о том, что изоляция соцветий и пыльников от донорного растения, а также условия культивирования *in vitro* сами по себе могут выступать в качестве стрессов, которые без применения любых других стрессов могут перепрограммировать дальнейшее развитие микроспор в условиях *in vitro* (Shariatpanahi et al., 2006b).

У злаков микроспоры физически прикреплены к тапетуму посредством орбикул (Круглова и др., 2005). Тапетальные клетки, окружающие микроспоры, играют важную регуляторную роль в развитии пыльцы. При воздействии ППТ микроспоры отстают от тапетума и свободно выпадают в полость гнезда пыльника, в связи с чем блокируется поступление питательных веществ и наступает голодание микроспор. Стрессом в такой ситуации являются не ППТ, а голодание микроспор, которое репрограммирует их развитие (Sunderland, Hu, 1982). Гаметофитное развитие микроспор в условиях голодания блокируется необратимо (Touraev et al., 1996a).

По мнению Sv. Zoriniants с соавт. (2005), ППТ действуют не как стресс, а как «антистресс». Предобработка холодом влияет как закаливающий фактор и индуцирует целый комплекс цитологических и физиологических изменений, которые активируют систему клеточной защиты от других стрессов (Żur et al., 2008). В культуре пыльников тритикале после воздействия ППТ были обнаружены различные белки, причастные к компетенции микроспор, отзывчивости на стресс и индукцию микроспорового эмбриогенеза. Увеличилось количество белков, типичных для защиты от окислительного стресса, шаперонов и др. Функциональная классификация обнаруженных белков показала, что большую их часть составляют белки метаболизма (47 %), стрессовые (28 %) и запасные (9 %) белки (Krzewska et al., 2017).

Выявлено повышенное содержание эндогенных аминокислот в пыльниках табака (Krogaard, Andersen, 1983) и риса (Xie et al., 1997), что связано с увеличением биосинтеза ферментов в микроспорах и изменением генетической программы их развития *in vitro*.

Высокотемпературный стресс *in vitro*

Эффективным триггером для переключения микроспор на спорофитный путь развития является тепловой шок. Повышенные температуры культивирования пыльников пшеницы (до 32–34 °С в течение четырех дней) приводят к возрастанию продуктивности микроспорового эмбриогенеза (Touraev et al., 1996b). Кратковременные воздействия высокотемпературным стрессом – наиболее эффективный прием индукции микроспорового эмбриогенеза у видов рода *Brassica* L. (Custers et al., 1994; Шмыкова и др., 2015). Положительная роль применения повышенных температур установлена и в сочетании с другими стрессовыми факторами, например голоданием (Touraev et al., 1996a).

Тепловой шок вызывает различный спектр изменений в клетке, в частности индукцию синтеза белков теплового шока (HSPs), особенно HSP70, которые блокируют программу пыльцевой дифференциации. Чем больше температурные различия между условиями выращивания донорных растений *in vivo* и условиями культивирования *in vitro*, тем «строже» сигнал HSPs. При температурах ниже 25 °С HSPs не образуются – температуры слишком низкие для проявления отзывчивости на стресс. Таким образом, синтез HSPs может служить молекулярным маркером реакции микроспор на стресс и их способности инициировать андрогенез *in vitro* (Smykal, Pechan, 2000).

HSPs действуют как молекулярные шапероны. Активация синтеза HSPs защищает микроспоры от апоптоза, вызываемого высокими температурами. Блокируя апоптоз, HSPs могут способствовать выживанию клеток с «перепрограммированным» геномом и переключению микроспор на спорофитный путь развития. Синтез HSPs препятствует синтезу белков, необходимых для дальнейшей дифференциации микроспор в пыльцу (Zoriniants et al., 2005). Сравнение паттернов фосфорилированных белков в эмбриогенных и неэмбриогенных микроспорах *Brassica napus* L. показало более высокий уровень фосфорилирования HSP70 в эмбриогенных микроспорах. Изменения в синтезе, транслокации и фосфорилировании этого белка связаны с переключением микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития (Cordewener et al., 1994).

Углеводное голодание

Углеводное голодание представляет собой эффективный прием индуцирования микроспорового эмбриогенеза. Примечательно, что этот вид стресса может быть применен не только для изолированных микроспор, но и для изолированных пыльников, соцветий или целого растения (Heberle-Bors, 1989). Углеводный статус растения служит одним из наиболее значимых факторов, определяющих развитие микроспор и формирование фертильной пыльцы *in vivo* (Corbesier et al., 1998). Голодание вызывает различные клеточные преобразования *in vitro*: задержку роста клетки, быстрое потребление клеточных углеводов, деградацию липидов и жиров, накопление свободных аминокислот, снижение гликолитической активности ферментов (Zoriniants et al., 2005). Морфологические и физиологические изменения микроспоры при углеводном голодании типичны для аутофагных клеток *in vivo* – наблюдается дедифференциация пластид, деградация ламеллярной структуры, исчезновение крахмала, появление большой вакуоли (Garrido et al., 1995). Дополнительный стресс (высокие и низкие температуры), а также продолжительность голодания блокируют гаметофитное развитие и способствуют эмбриогенному развитию микроспор (Touraev et al., 1996a).

Положительный эффект при замене сахарозы на мальтозу в культуре пыльников пшеницы связан с замедленным гидролизом мальтозы, что вызывает стресс голодания и индукцию микроспорового эмбриогенеза (Indrianto et al., 1999; Redha, Talaat, 2008). Вид применяемого стресса голодания повлиял на число и соотношение альбиносных и зеленых растений ячменя, их фертильность. Наибольшее число зеленых растений было получено при применении маннитола (0.3 М) при температуре 32 °С в течение 24 ч (Oleszczuk et al., 2006).

При углеводном голодании наблюдаются количественные и качественные изменения в активности протеинкиназ *in vitro*. Вероятно, протеинкиназы вовлекаются в трансдукцию сигнала, вызванного эффектом голодания, и влияют на экспрессию генов и регуляцию клеточного цикла (Garrido et al., 1995). Голодание вызывает экспрессию генов HSPs *in vitro*, что подтверждает роль молекулярных шаперонов в клеточном перепрограммировании (Wang et al., 1999; Varnier et al., 2009).

Важную роль в адаптации к стрессам играет абсцизовая кислота (АБК). В культивируемых пыльниках ячменя, подвергнутых голоданию и осмотическому стрессу, содержание АБК увеличилось в два раза и коррелировало с жизнеспособностью микроспор. Накопление АБК может рассматриваться как сигнальный фактор переключения развития микроспор на альтернативный путь развития (Wang et al., 2000). Предполагается, что защитная функция АБК возникла в результате стабилизации клеточных мембран и инициации защиты к окислительному стрессу (Prasad et al., 1994; Wang et al., 2000; Żur et al., 2008).

Колхицин

Колхицин как агент, индуцирующий спорофитное развитие микроспор, успешно применялся в культуре пыльников и изолированных микроспор тритордеум (Barceló et al., 1994), пшеницы (Redha, Talaat, 2008), кукурузы (Saisington et al., 1996), тритикале (Arzany, Darvey, 2001), рапса (Mohammadi et al., 2012). Использование колхицина в составе индукционной питательной среды для культивирования пыльников пшеницы в концентрации 0.02 и 0.04 % в течение нескольких первых часов культивирования вызвало изменения симметрии деления за счет супрессии формирования микротрубочек, что привело к увеличению частоты симметрично делящихся микроспор (Barnabás et al., 1991). В культуре пыльников кукурузы наибольший успех в индукции эмбриогенного развития микроспор достигнут в случае комбинированного применения пониженных положительных температур (на донорный материал) и колхицина в сочетании с TIBA в качестве регулятора роста в составе питательной среды (Obert, Barnabás, 2004). Эффект воздействия колхицина на формирование эмбриоидов и зеленых растений зависит от генотипа (Redha, Talaat, 2008).

Колхицин связывает α- и β-гетеродимеры тубулина, их дальнейшее присоединение к микротрубочкам ингибируется, что вызывает деполимеризацию и перемещение ядра от периферии к центру микроспоры. Реорганизация цитоскелета приводит к потере асимметрии микроспоры и блокированию гаметофитного развития (Zhao et al., 1996; Babbar et al., 2004; Aionesei et al., 2005; Clement et al., 2005). Показана связь микротрубочек с циклин-зависимыми киназами (cdc2), которые участвуют в смене фаз клеточного цикла (Weingartner et al., 2001). Уровень накопления белка cdc2 связан с пролиферативной активностью клеток (John et al., 1990). Предполагается, что ингибирование формирования веретена деления колхицином может влиять на биосинтез белка cdc2 в микроспорах и их переключение на спорофитный путь развития (Zoriniants et al., 2005).

n-Бутанол

Бутиловый спирт (n-бутанол) – представитель одноатомных спиртов. Применение n-бутанола в составе питательной среды в концентрации 0.1–0.2 % в течение 5 ч у двух сортов мягкой пшеницы Pavon и Caramba привело к увеличению выхода эмбриоидов. В сравнимых экспериментах число зеленых растений на 100 пыльников увеличилось со 121 до 300 у сорта Pavon и с 46 до 90 у сорта Caramba. Выход удвоенных гаплоидов был увеличен в два раза в сравнении с контролем (Soriano et al., 2008).

Позднее положительный эффект n-бутанола в составе питательных сред в сходных концентрациях был подтвержден в культуре пыльников мягкой пшеницы (Broughton, 2011), кукурузы (Földesiné et al., 2011; Fábián et al., 2015) и ячменя (Castillo et al., 2014). В культуре пыльников кукурузы совместная обработка n-бутанолом и пониженными температурами увеличила частоту отзывчивых пыльников у слабо отзывчивых генотипов. При комбинировании этих обработок выход эмбриоидов составил 20.9 % по сравнению с 0.5 % в контроле (Fábián et al., 2015).

Применение n-бутанола в комбинации с маннитолом привело к увеличению эмбриоидов и зеленых растений в культуре пыльников слабо отзывчивых сортов ячменя. У сортов Astoria и Majestic число полученных эмбриоидов увеличилось в два раза, а число зеленых растений – в три раза (Castillo et al., 2014). Однако позитивный эффект n-бутанола в культуре пыльников слабо отзывчивых сортов ячменя был ниже, чем у слабо отзывчивых сортов пшеницы, у которой выход зеленых растений был увеличен в 14–27 раз (Broughton, 2011). У обоих видов эффект n-бутанола был выше у низко отзывчивых сортов. Показан аддитивный эффект маннитола и n-бутанола на микроспоровый эмбриогенез ячменя (Castillo et al., 2014).

Положительный эффект n-бутанола приписывают его способности разрушать кортикальные микротрубочки. Микротрубочки поддерживают поляризованный статус цитоплазмы, поэтому их разрушение нарушает полярность микроспор и приводит к их симметричному делению. Изменения в симметрии первого деления могут влиять на экспрессию генов и модифицировать путь развития дочерних клеток. Важным структурным изменением клетки, вызываемым n-бутанолом, является формирование аномальной клеточной стенки (Fábián et al., 2015).

Заключение

Для внедрения DH-технологий в селекционный процесс требуются воспроизводимые и недорогие технологии производства гаплоидных растений. Несмотря на то, что достигнуты значительные успехи в получении гаплоидов на основе микроспорового эмбриогенеза *in vitro* у многих видов (ячмень, рапс, пшеница и др.), другие виды и даже различные генотипы одного вида остаются «трудноотзывчивыми». Выявление новых стрессов и способов их воздействий, повышающих потенциал микроспорового эмбриогенеза, позволит создать эффективные генотипнезависимые протоколы генерирования DH-линий для их использования в селекции экономически ценных видов.

Список литературы / References

Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Дугина Т.В. Цитология спорофитно развивающихся микроспор в культуре пыльников тритикале без холодового воздействия. С.-х. биология. 2010;5:61-65.
[Dyatchouk T.I., Khomyakova O.V., Dugina T.V. Cytology of sporophytic microspore development in triticale anther culture without cold pretreatment. Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2010;5:61-65. (in Russian)]

Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*. Одесса: Астропринт, 2011.
[Ignatova S.A. Cell Technologies in Plant Industry, Genetics, and Breeding of Cultivated Plants: Tasks, Opportunities, and Development of *in vitro* Systems. Odessa: Astroprint Publ., 2011. (in Russian)]

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. Отв. ред. И.И. Шамров. М.: Наука, 2005.
[Shamrov I.I. (Ed.) / Kruglova N.N., Batygina T.B., Gorbunova V.Yu. Embryological Bases of Wheat Androclinesis. Moscow: Nauka Publ., 2005. (in Russian)]

Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зинатуллина А.Е. Морфогенная микроспора как инициальная клетка андрогенеза *in vitro*: обзор проблемы. Научный результат. Физиология. 2017;3(1): 3-7. DOI 10.18413/2409-0298-2017-3-1-3-7.
[Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E. Morphogenic microspore as an initial cell of androgenesis *in vitro*: Review of the problem. Nauchnyy Rezultat. Fizioligiya = Scientific Result. Physiology. 2017;3(1):3-7. DOI 10.18413/2409-0298-2017-3-1-3-7. (in Russian)]

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Супрунова Т.П. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):111-120. DOI 10.18699/VJ15.014.
[Shmykova N.A., Shumilina D.V., Suprunova T.P. Doubled haploid production in *Brassica* L. seeds. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1): 111-120. DOI 10.18699/VJ15.014. (in Russian)]

Aionesei T., Touraev A., Heberle-Bors E. Pathways to Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:11-34.

Arzany A., Darvey N.L. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: microspore pretreatment and haploid plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica. 2001;122:235-241.

Babbar S.B., Kumari N., Mishra J.K. *In vitro* Androgenesis: Events Preceding its Cytological Manifestation. In: Shrivastava P.S., Narula A., Shrivastava Sh. (Eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. New Dehli, India: Anamya Publishers, 2004;1-17.

Barceló P., Cabrera A., Hagel C., Lörz H. Production of doubled haploid plants from tritordeum anther culture. Theor. Appl. Genet. 1994; 87:741-745.

Barnabás B., Pfhahler P.L., Kovács G. Direct effect of colchicine on microspore embryogenesis to produce dihaploid plants in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 1991;81:675-678.

Batygina T.B. Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants. Stem Cell. Res. J. 2011;3(1-2):45-120.

Belogradova K., Lewicka I., Heberle-Bors E., Touraev A. An Overview on Tobacco Doubled Haploids. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Buisness Media, 2009;75-85.

Bonet F.J., Azhaid L., Olmedilla A. Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? Protoplasma. 1998;202:115-121.

Broughton S. The application of n-butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Crop Pasture Sci. 2011;62:813-822.

Castillo A.M., Nielsen N.H., Jensen A., Vallés M.P. Effect of n-butanol on barley microspore embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2014;117:411-418.

Chiancone B., Germana M.A. Microspore Embryogenesis through Anther Culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. In: Germana M.A., Lambardi M. (Eds.). In Vitro Embryogenesis in Higher Plants (Methods in Molecular Biology). Springer Science + Business Media New York, 2016;1359:475-487.

Cistué L., Kasha K.J. Gametic Embryogenesis in Triticum: a Study of Some Critical Factors in Haploid (Microspore) Embryogenesis. In: Mujib A., Samaj J. (Eds.). Somatic Embryogenesis. Published online: 6 October 2005. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2005;321-342. DOI 10.1007/7089-031.

Clement C., Sangwan R.S., Sangwan-Norell B. Microspore Embryo Induction and Development in Higher Plants: Cytological and Ultrastructural Aspects. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;51-72.

Corbesier L., Lejeune P., Bernier G. The role of carbohydrate in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between wild type and starch-less mutant. Planta. 1998;206:131-137.

Cordewener J., Busink R., Traas J.A., Custers J.B.M., van Campagne M.M. Induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. is accompanied by specific changes in protein synthesis. Planta. 1994;195:50-56.

Custers J.B.M., Cordewener J.H.G., Nolen Y., Dons H.J.M., van Campagne M.M. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep. 1994;13:267-271.

de Buyser J., Henry Y. Wheat Production of Haploids, Performance of Doubled Haploids and Yield Trials. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 2. Crops I. New York; Heidelberg: Springer Verlag, 1986;73-78.

Devaux P., Pickering R. Haploids in the improvement of Poaceae. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:215-242.

Dubas E., Wedzony M., Petrovska B., Salaj J., Zur I. Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of Triticale (×*Triticosecale* Wittm.). Acta Biologica Cracoviensia. Ser. Botanica. 2010;52:73-86.

Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotech. J. 2010;8:377-424.

Eady C., Lindsey K., Twell D. The significance of microspore division and division symmetry of vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. Plant Cell. 1995;7:65-74.

Fábián A., Földesiné Füredi P.K., Ambrus H., Jäger K., Szabó L., Barnabás B. Effect of *n*-butanol and cold pretreatment on the cytoskeleton and ultrastructure of maize microspores when cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2015;123:257-271.

Földesiné Füredi P.K., Ambrus H., Barnabás B. The effect of n-butanol and 2-aminoethanol on the *in vitro* androgenesis of maize. Acta Biol. Szeged. 2011;55:77-78.

Garrido D., Vicente O., Heberle-Borse E., Rodriquez-Garcia M. Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. Protoplasma. 1995;186: 220-230.

Germana M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2011;104:283-300.

Gu H.H., Hagberg P., Zhou W.J. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Growth Reg. 2004;42:137-143.

Guha S.S., Maheshwari S.C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature. 1964;204:497-498.

Heberle-Bors E. Isolated pollen in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex Plant Reprod. 1989;2:1-10.

Heberle-Bors E., Reinert J. Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. Protoplasma. 1981;109:249-255.

Indrianto A., Barinova I., Touraev A., Heberle-Bors E. Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in embryo. Planta. 2001;212: 163-174.

Indrianto A., Heberle-Bors E., Touraev A. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Sci. 1999;143:17-23.

John P.C., Sek F.J., Carmichael J.P., McCurdy D.W. p34cdc2 homologue level, cell division, phytohormone responsiveness and cell differentiation in wheat leaves. J. Cell Sci. 1990;97:627-630.

Krogaard H., Andersen A.S. Free amino acids of *Nicotiana alata* anthers during development *in vivo*. Plant Physiol. 1983;57:527-531.

Krzewska M., Gołębiowska-Pikania G., Dubas E., Gawin M., Żur I. Identification of proteins related to microspore embryogenesis responsiveness in anther culture of winter triticale (×*Triticosecale* Wittm.). Euphytica. 2017;213:192. DOI 10.1007/s10681-017-1978-1.

Maluszynski M.K., Kasha K.J., Szarejko I. Published Doubled Haploid Production in Plant Species. In: Maluszynski M.K., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Dordrecht: Springer, 2003;309-335.

Mohammadi P.P., Moieni A., Ebrahimi A., Javidfar F. Doubled haploid plants following treatment on microspore derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 2012; 108:251-256. DOI 10.1007/s 11240-011-0036-2.

Obert B., Barnabás B. Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2004;77:283-285.

Ohnoutková L., Novotný J., Müllerova E., Vagera J., Kućera L. Is a cold pretreatment really needed for induction of *in vitro* androgenesis in barley and wheat? In: Bohanec B. (Ed.). Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells. Final Meeting. Bled, Slovenia, 1–5 July 2000. Luxembourg, 2000;33-37.

Oleszczuk S., Sowa S., Zimmy J. Androgenetic response to preculture stress in microspore cultures of barley. Protoplasma. 2006;228: 95-100.

Pauk J., Jancsó M., Simon-Kiss I. Rice doubled haploids and breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media, 2009;189-197.

Pauls K.P., Chan J., Woronuk G., Schulze D., Brazolot J. When microspores decide to become embryos – cellular and molecular changes. Can. J. Bot. 2006;84:668-678.

Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Steward R.C. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell. 1994;6:65-74.

Raghavan V. Role of the generative cell in androgenesis in henbane. Science. 1976;191:388-389.

Raina S.K., Irfan S.T. High frequency embryogenesis and plantlet regeneration from isolared microspore of indica rice. Plant Cell Rep. 1998;17:957-962.

Redha A., Talaat A. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008;92:141-146. DOI 10.1007/s11240-007-9315-3.

Reynold T.L. Pollen embryogenesis. Plant Mol. Biol. 1997;33:1-10.

Saisington S., Schmid J.E., Stamp P., Bűter B. Colchicine-mediated chromosome doubling during anther culture of maize (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet. 1996;92:1017-1023.

Scott R., Dagless E., Hodge R., Wyatt P., Soutlemi I., Draper J. Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 1991;17:195-207.

Segui-Simarro J.M. Androgenesis revisited. Bot. Rev. 2010;76:377-404. DOI 10.1007/s12229-010-9056-6.

Shariatpanahi M.E., Bal U., Heberle-Bors E., Touraev A. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiol. Plant. 2006a;127:519-534.

Shariatpanahi M.E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E., Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Rep. 2006b;25:1294-1299. DOI 10.1007/s00299-006-0205-7.

Smykal P. Pollen embryogenesis: the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development, current status and future prospects. Biol. Plant. 2000;43:481-489.

Smykal P., Pechan P.M. Stress as assessed by the appearance of smHSPs transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. Physiol. Plant. 2000;110:135-143.

Soriano M., Cistue L., Castillo A.M. Enhanced induction of microspore embryogenesis after *n*-butanol treatment in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Plant Cell Rep. 2008;27:805-811.

Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis establishment of embryo identity and pattern in culture. Plant Reprod. 2013; 26:181-196. DOI 10.1007/s00497-013-0226-7.

Sunderland N., Hu Z.H. Shed pollen culture in *Hordeum vulgare*. J. Exp. Bot. 1982;136:1086-1095.

Telmer C.A., Newcomb W., Simmonds D.H. Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division *in vivo* and *in vitro*. Protoplasma. 1993;172:154-165.

Tian Q.Q., Lu C.M., Li X., Fang X.W. Low temperature treatments of rice (*Oryza sativa* L.) anthers changes polysaccharide and protein composition of the anther walls and increases pollen fertility and callus induction. Plant Cell Tissue Organ Cult. 2015;120:89-98. DOI 10.1007/s11240-014-0582-5.

Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberle-Bors E. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. Sex Plant Rep. 1996b; 9:209-215.

Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress a major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. Planta. 1996a;200:144-152.

Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends Plant Sci. 1999;2(8):297-302.

Varnier A.L., Jacquard C., Clement C. Programmed Cell Death and Microspore Embryogenesis. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media, 2009;147-153.

Wang M., Hoeekstra S., Bergen S., Lamers G.E.M., Oppedijk B.J., de Preister W., Schilperoori R.A. Apoptosis in developing anthers and role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. Plant Mol. Biol. 1999;39:489-501.

Wang M., Van Bergen S., Van Duijn B. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. Plant Physiol. 2000;124:523-530.

Wędzony M. Protocol for Anther Culture in Hexaploid Triticale (×*Triticosecale* Wittm.). In: Maluszynski M.K., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (Eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual. Dordrecht: Springer, 2003;123-128.

Wędzony M., Forster B.P., Żur I., Golemiec E., Szechyńska-Hebda M., Dubas E., Gotębiowska G. Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media, 2009;1-33.

Weingartner M., Binarova P., Drykova D., Schweighofer A., David A., Heberle-Bors E., Dooman J. Dynamic recruitment of cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. Plant Cell. 2001;13: 1929-1943.

Weyen J. Barley and Wheat Doubled Haploids in Breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (Eds.). Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science + Business Media, 2009; 179-187.

Xie J.H., Gao M.W., Liang Z.O., Shu O.Y., Cheng X.Y. The effect of cool pretreatment on the isolated microspore culture and free amino acid change of anthers in *Japonica* rice (*Orisa sativa* L.). J. Plant Physiol. 1997;151:79-82. DOI 10.1016/S0176-1617(97)80040-5.

Xynias I.M., Zamani I.A., Goul-Vavidinoudi E. Effect of cold pretreatment and incubation temperature on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. Cereal Res. Commun. 2001;29(3):331-338.

Zhao J.-P., Simmonds D.H., Newscomb W. Induction of embryogenesis with colchicines instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. Planta. 1996;198:433-439.

Zoriniants Sv., Tashpulatov A., Heberle-Bors E., Touraev A. The Role of Stress in the Induction of Haploid Microspore Embryogenesis. In: Palmer C.E., Keller W.A., Kasha K. (Eds.). Haploids in Crop Improvement II (Ser. Biotechnology in Agricultural and Forestry). Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2005;56:35-51.

Żur I., Dubas E., Golemiec E., Szechyńska-Hebda M., Janowiak F., Wędzony M. Stress-induced changes important for effective androgenic induction in isolated microspore culture of triticale (×*Triticosecale* Wittm.). Plant Cell Tissue Organ Cult. 2008;94:319-328. DOI 10.1007/s11240-008-9360-6.

ORCID ID

T.I. Djatchouk orcid.org/0000-0001-7420-0521
O.V. Khomyakova orcid.org/0000-0002-5218-6076
V.N. Akinina orcid.org/0000-0003-3661-9246
I.A. Kibkalo orcid.org/0000-0002-8870-121X
A.V. Pominov orcid.org/0000-0003-1033-9713

Acknowledgements. The authors are grateful to Prof. V.A. Krupnov, Dr. Sci. (Biol.), Honored Scientist, for valuable advice in writing the manuscript.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received February 26, 2018. Revised October 8, 2018. Accepted November 15, 2018.