

УДК 633.116.581.143.5

ФОРМИРОВАНИЕ ПОЛИЭМБРИОИДОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

О.А. СЕЛЬДИМИРОВА

*Институт биологии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, просп. Октября, 69*

Проведен анализ морфогенеза полиэмбриоидов в культуре in vitro пыльников яровой мягкой пшеницы. Выявлены структурные механизмы формирования полиэмбриоидов, рассмотрена роль синтетического ауксина 2,4-Д в индукции их образования.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., культура пыльников in vitro, полиэмбриоиды, 2,4-Д, симметрия.

В настоящее время получение гаплоидов в культуре изолированных пыльников in vitro — общепризнанный способ коммерческой селекции хлебных злаков [15, 17, 33, 35].

Известно, что формирование андроклинных гаплоидов происходит посредством эмбриоидогенеза (формирования зародышеподобных структур) или регенерации растений в каллюсной культуре. Эмбриоидогенез рассматривается как более эффективный и выгодный по сравнению с каллюсогенезом способ получения гаплоидов, поскольку он не связан с прохождением сложного и многоступенчатого процесса образования зачастую генетически неоднородного каллюса и не требует трудоемкой процедуры многократных пересадок на различные среды (обзоры [6, 7]).

Основная проблема получения гаплоидов посредством эмбриоидогенеза — низкий выход растений-регенерантов. Одним из способов ее решения является индукция образования особого типа эмбриоидов — полиэмбриоидов, для которых характерно формирование в их апикальной части множественных точек роста, что позволяет получать большее количество растений-регенерантов.

В литературе имеются только единичные упоминания о формировании полиэмбриоидов андроклинного происхождения [2, 14, 18, 25, 29] и полностью отсутствуют данные об их генезисе.

В связи с этим цель нашей работы состояла в проведении анализа морфогенеза полиэмбриоидов в культуре in vitro пыльников яровой мягкой пшеницы.

Методика

Объектом исследования была яровая мягкая пшеница сорта Жница, характеризующаяся высокой отзывчивостью в культуре in vitro изолированных пыльников.

Для получения полиэмбриоидов использовали метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы [5]. Образцы для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) готовили согласно Миронову и соавт. [11], высушивали их с помощью прибора «Critical point» (Hitachi, Япония), электронпроводящее покрытие создавали термическим напылением золота в вакууме с применением вакуумного универсального поста (ВУП). Объекты изучали с применением сканирующих электронных микроскопов марок JSM 35 и JSM-6390 («Jeol», Япония). После исследования методом СЭМ образцы выдерживали в 70 %-м этаноле, обезвоживали в серии водных растворов этанола возрастающей концентрации и помещали в гисторезину Technovit 7100 (2-hydroxyethyl-metacrylate) (Heraeus Kulzer) согласно рекомендациям производителя. Срезы изготавливали на микротоме марки НМ 325 («Microm», Германия) и окрашивали по описанию [31]. Постоянные микротомные препараты просматривали и фотографировали на микровизоре проходящего света μ Vizo-103 («ЛОМО ФОТОНИКА», г. Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение

Установлено, что для индукции формирования андроклинных полиэмбриоидов в культивируемых пыльниках пшеницы сорта Жница (низкоауксиновый генотип по классификации [3]) необходима концентрация 2,4-Д в среде Potato II 1,0 мг/л.

Для анализа формирования полиэмбриоидов мы применяли разработанную нами совместно с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии БИН РАН (г. Санкт-Петербург) методику, которая дает возможность методом СМ исследовать образцы, ранее изученные методом СЭМ. Это позволяет совмещать данные о внешнем и внутреннем строении объекта и четко идентифицировать тот или иной путь морфогенеза *in vitro*.

В ходе исследования установлено, что начальные этапы развития полиэмбриоидов соответствуют таковым эмбриоидов (развитие андроклинных эмбриоидов описано в работах [6, 12]).

Как и при формировании эмбриоидов, развитие полиэмбриоидов начинается с симметричного деления инициальных клеток — сильновакуолизованных микроспор. Дальнейшие деления приводят к формированию глобулярных многоклеточных структур. В ходе их развития происходит постепенное становление полярности и, в конечном итоге, обособление апикальных и базальных полюсов полиэмбриоидов. При этом наблюдается переход от относительно равномерного распределения клеточных делений по всему объему полиэмбриоидов к клеточным делениям преимущественно в апикальной части, вследствие чего последняя приобретает шаровидную форму и увеличивается в размере (рис. 1, а, б).

С этого момента развитие эмбриоидов и полиэмбриоидов различается. В то время как в апикальной части эмбриоидов начинаются процессы органогенеза, апикальная часть полиэмбриоидов продолжает равномерно увеличиваться в размере (см. рис. 1, в, г). Это приводит к тому, что на ней возникают множественные симметрично расположенные и равноценные меристематические очаги (см. рис. 1, г).

После формирования меристематических очагов завершается фаза бластомеризации полиэмбриоидов и начинается фаза органогенеза. Каждый из меристематических очагов дает начало щитку и апикальной

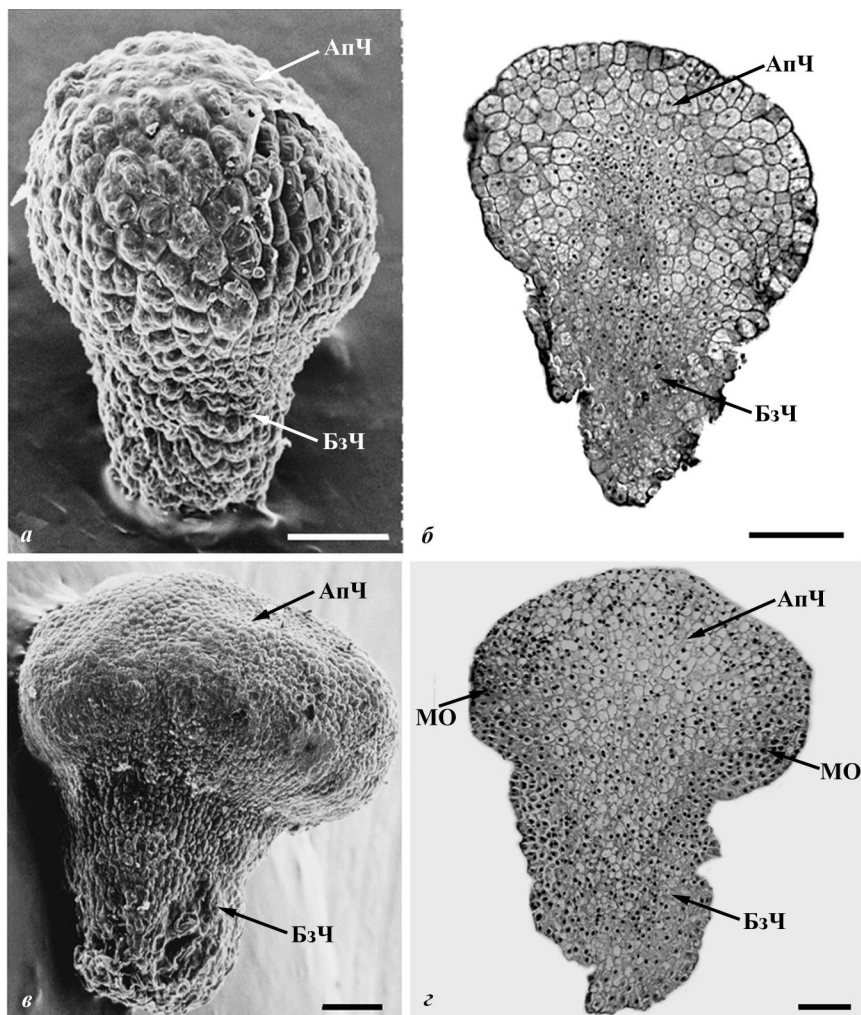


Рис. 1. Полиэмбриониды в фазе бластомеризации:

a — обособление апикальной и базальной частей полиэмбриоида (СЭМ); *б* — постоянный препарат полиэмбриоида, изображенного на рис. 1, *a*; *в* — формирование в апикальной части полиэмбриоида меристематических очагов (СЭМ); *г* — постоянный препарат с полиэмбриоида, изображенного на рис. 1, *в*; АпЧ — апикальная часть; БзЧ — базальная часть; МО — меристематический очаг (масштаб — 100 мкм)

меристеме побега. Как правило, в полиэмбриоидах закладывается от 3 до 5 щитков (рис. 2, *a, б*). При этом все щитки частично сросшиеся в основании, тогда как каждая апикальная меристема — самостоятельная и окружена собственным колеоптилем.

В целом процесс заложения и формирования органов в полиэмбриоидах характеризуется той же последовательностью, что и в зиготических зародышах и эмбриоидах. Переход к органогенезу в эмбриоидах начинается с заложения щитков и апексов побега (см. рис. 2, *a*), затем последовательно закладываются колеоптиль, примордии первых листьев и меристемы зародышевого корня (см. рис. 2, *в—д*). Следует отметить, что несмотря на формирование множественных апикальных меристем побега, как правило, формируется только один корень (см. рис. 2, *г, д*). Достаточно часто наблюдаются случаи кливажа, когда формируются два полиэмбриоида, объединенные своими корневыми полюсами (см. рис. 2, *в*).

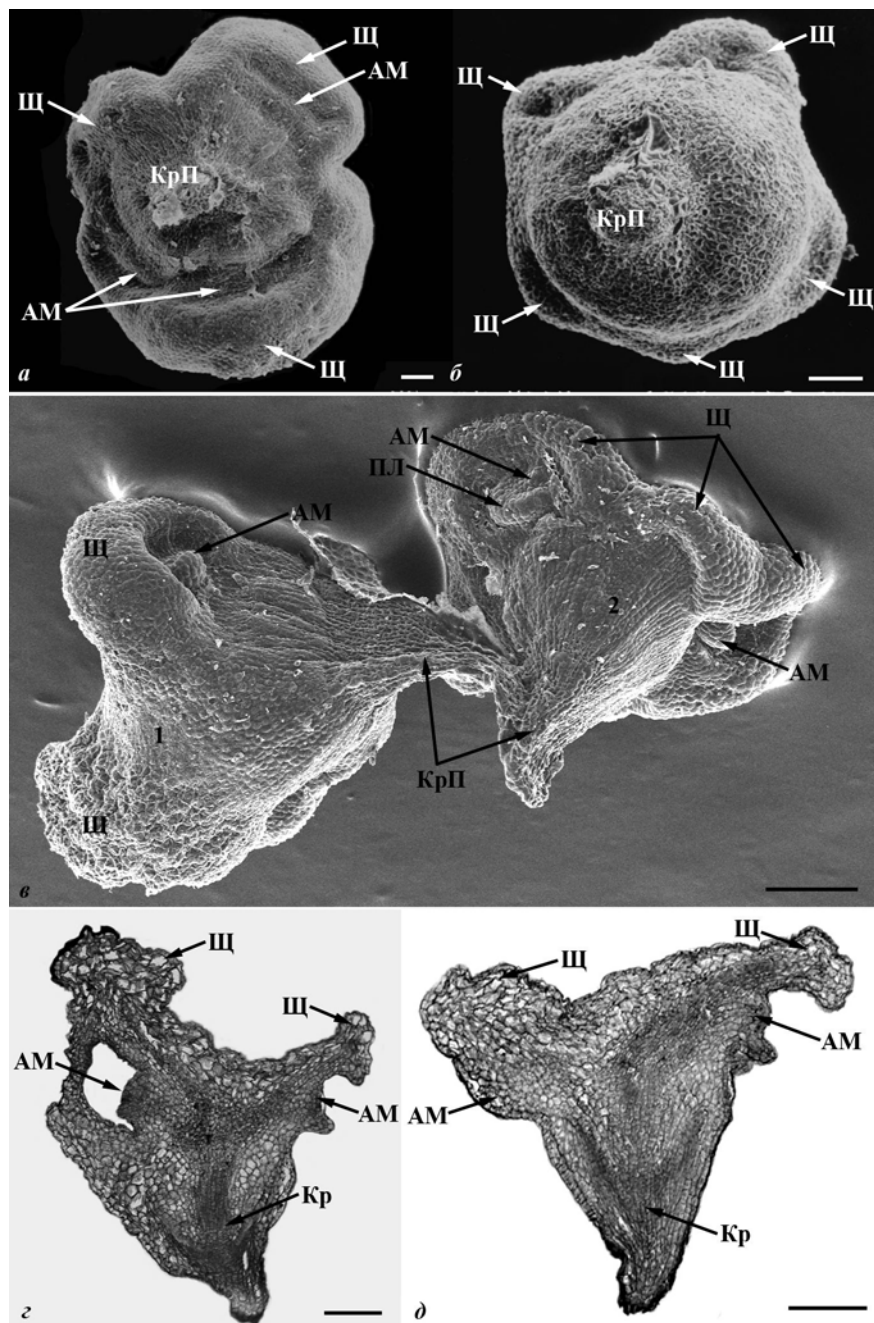


Рис. 2. Полиэмбриониды в фазе органогенеза:

a, б — формирование в апикальной части полиэмбриоида соответственно 3 и 5 щитков (СЭМ); *в* — формирование органов в кливажном полиэмбриоиде (СЭМ); *г* — постоянный препарат с полиэмбриоида 1, изображенного на рис. 2, *в*; *д* — постоянный препарат с полиэмбриоида 2, изображенного на рис. 2, *в*; АМ — апикальная меристема побега; Кр — корень, КрП — корневой полюс; ПЛ — первый лист; Щ — щиток (масштаб: *a, б* — 100 мкм, *в–д* — 200 мкм)

Сформированные полиэмбриониды (рис. 3, *a*) имеют все органы, присущие зиготическим зародышам пшеницы. В ряде случаев развитие органов происходит с некоторыми отклонениями. В частности, значительное увеличение размеров множественных щитков, как правило, со-

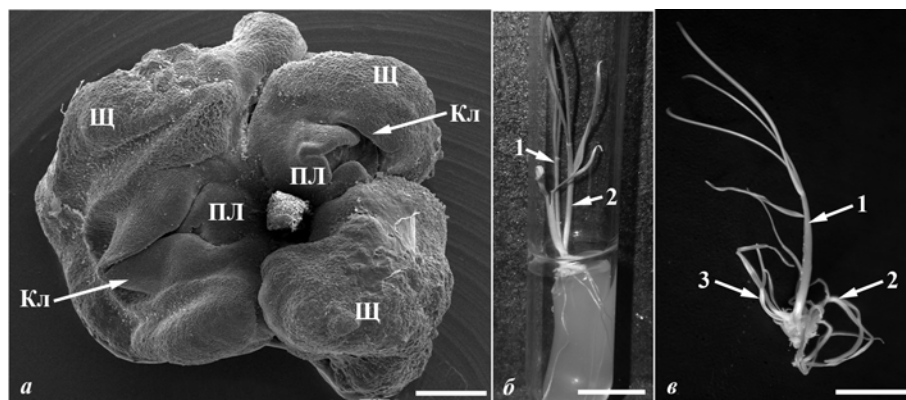


Рис. 3. Прорастание полиэмбриоидов:

a — прорастающий полиэмбриоид (СЭМ); *б* — проросток полиэмбриоида *in vitro* (прижизненная съемка); *в* — проросток полиэмбриоида перед высаживанием в почву (прижизненная съемка); Кл — колеоптиль; Пл — первый лист; Ш — шиток; 1–3 — побеги, возникшие из разных апикальных меристем побега (масштаб: *a* — 500 мкм; *б*, *в* — 1 см)

проводится формированием незамкнутой структуры колеоптиля и отсутствием эпибласта (см. рис. 2, *a*, *в*; 3, *a*), в то время как увеличение размеров исходных апикальных меристем побега (см. рис. 2, *a*) приводит к возникновению множественных (до 5) вторичных апикальных меристем, часто образующих систему фасцированных побегов.

Однако, несмотря на такие аномалии строения, сформированные полиэмбриоиды способны к прорастанию и формированию гаплоидных растений-регенерантов (см. рис. 3, *б*, *в*). Кроме того, на примере кукурузы показано, что в потомстве растений-регенерантов такие аномалии не проявляются [4].

Возможный физиологический механизм формирования полиэмбриоидов может быть следующим. Известно, что основной фактор индукции андроклинии у злаков — введение в состав питательной среды синтетического гормона ауксинового типа действия 2,4-Д (обзор [8]). Кроме того, известно, что ауксины — обязательные участники координации морфогенеза, оказывающие влияние на деление, рост и дифференциацию клеток — процессов, которые лежат в основе морфогенеза [1, 10]. Считается, что негомогенное распределение ауксина (градиенты ауксина) играет главную роль в становлении симметрии зародыша; потоки ауксина, создавая позиционную информацию, действуют как мощнейший морфогенетический фактор и определяют дифференциацию органов зародыша [10, 16, 23, 24, 27].

Ранее было показано, что индукция формирования эмбриоидов, по строению подобных зиготическим зародышам пшеницы, происходит при внесении в индукционную питательную среду самых низких концентраций 2,4-Д, способных вызвать индукцию морфогенеза *in vitro* в культивируемых пыльниках пшеницы [6] (для сорта Жница она составляет 0,5 мг/л). Некоторые авторы считают, что низкие уровни экзогенных ауксинов делают возможным формирование полярного градиента эндогенных ауксинов. Это, в свою очередь, является необходимым условием для нормальной дифференциации эмбриоидов [28, 32, 34].

Повышение концентрации 2,4-Д в индукционной питательной среде приводит к формированию полиэмбриоидов. Предполагается, что в культуре *in vitro* 2,4-Д диффундирует по градиенту концентрации из пи-

тательной среды в культивируемые эксплантаты через плазмалемму [1], так как ауксины представляют собой слабые липофильные кислоты, которые диссоциируют в водных растворах. Это означает, что со снижением рН раствора увеличивается доля недиссоциированных молекул ауксина. Обычно рН цитоплазмы значительно превышает рН внеклеточного раствора. В этих условиях недиссоциированные молекулы ауксина диффундируют сквозь плазмалемму внутрь клеток и диссоциируют там, в соответствии с рН цитоплазмы, поддерживая тем самым градиент концентраций и поток нейтральных молекул в цитоплазму. Вследствие низкой проницаемости диссоциированных молекул ауксинов они накапливаются в клетке [1, 30]. Возможно, что повышение концентрации 2,4-Д в среде ведет к ее накоплению в клетках андроклинных структур и, следовательно, к нарушению полярного градиента эндогенного ауксина.

Косвенное подтверждение этого предположения содержится в работах по получению полиэмбрионов обработкой зиготических зародышей 2,4-Д или ингибиторами полярного транспорта ауксина [13, 20—22, 24, 26].

Фишер и Неухаус [23] выявили, что в недифференцированном зиготическом зародыше пшеницы место возникновения апекса побега не детерминировано строго, но существует кольцо клеток вокруг апикальной части зародыша, компетентных к формированию меристемы побега. В условиях *in vivo* ауксин из базальной части зародыша транспортируется полярно в двух направлениях: к месту дифференциации апекса побега и к месту дифференциации шитка и недоступен для других групп клеток зародыша. Однако при нарушении транспорта ауксин может накапливаться в клетках, в которых обычно его содержание низко. Авторы предположили, что эти клетки могут быть уже морфогенетически компетентными к дифференциации органов, либо же им для этого требуется импульс в виде потока ауксина. В результате формируются дополнительные меристемы побега и полиэмбрионы.

По мнению Хацис [26], недифференцированный зародыш уже обладает «апикальным доминированием». При действии ростовыми веществами, вероятно, повреждается группа клеток, из которой позднее возникает апекс побега и которая подавляет формирование других апексов. При этом функционирование клеток будущего апекса тормозится, а клетки, которые в норме должны давать начало семядолям, дают начало новым апексам.

По-видимому, андроклинные полиэмбриониды формируются в результате накопления 2,4-Д в многоклеточных структурах (глобулярных эмбриоидах) и диффузного распределения ее избыточного количества. Однако это предположение требует доказательств, в частности, методами иммулокализации фитогормонов.

В целом изучение генезиса полиэмбрионидов обоих типов имеет несомненное практическое значение, поскольку позволяет уточнить гипотезу о механизме гормональной регуляции становления полярности и симметрии в эмбриогенезе злаковых и подойти к управлению этими процессами в условиях *in vitro* с целью создания форм с новыми признаками. Вместе с тем оно позволит внести вклад в решение таких важных фундаментальных проблем, как морфологическая природа органов зародыша однодольных растений и эволюционное становление однодольности.

Автор выражает искреннюю благодарность заведующей лабораторией экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН профессору Н.Н. Кругловой за всестороннюю помощь

при выполнении исследования и канд. биол. наук Г.Е. Титовой (Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург) за помощь, оказанную при выполнении работы и обсуждении результатов.

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

1. Гамбург Г.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. — Новосибирск: Наука (СО), 1990. — 243 с.
2. Горбунова В.Ю. Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях in vitro. — Уфа: ИБ УНЦ РАН, 1993. — 104 с.
3. 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. Биология. — 2001. — № 1. — С. 31—36.
4. Долгих Ю.И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования на примере кукурузы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Москва, 2005. — 45 с.
5. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. — Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. — 39 с.
6. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. — М.: Наука, 2005. — 101 с.
7. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Батыгина Т.Б. Эмбриогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи соврем. биологии. — 1995. — **115**, № 6. — С. 692—705.
8. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Куксо П.А. Морфогенез в культуре изолированных пыльников: роль фитогормонов // Там же. — 1999. — **119**, № 6. — С. 567—577.
9. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю. Цитофизиологические особенности различных типов андроклинических каллюсов пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2007. — **39**, № 1. — С. 42—50.
10. Медведев С.С. Физиологические основы полярности растений. — СПб.: Кольна, 1996. — 159 с.
11. Мионов Н.В., Комиссарчик В.Л., Соколов А.Д. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. — М.: Наука, 1996. — 243 с.
12. Сельдимирова О.А., Абрамов С.Н., Круглова Н.Н. Развитие микроспоридных эмбрионов в культуре in vitro пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 4. — С. 320—326.
13. Яковлев М.С., Снегирев Д.П. Влияние ростовых веществ на образование многозародышевых зерновок у пшеницы // Ботан. журн. — 1954. — **39**, № 2. — С. 187—194.
14. Aullinger I.E., Peter S.O., Schmid J.E., Stamp P. Gametic embryos of maize as a target for biolistic transformation: comparison to immature zygotic embryos // Plant Cell Rep. — 2003. — **21**, N 6. — P. 585—591.
15. Barnabas B., Szakacs E., Karsai I., Bedo Z. In vitro androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application // Euphytica. — 2001. — **119**, N 1—2. — P. 211—216.
16. Cooke T.J., Racusen R.H., Cohen J.D. The role of auxin in plant embryogenesis // Plant Cell. — 1993. — **5**, N 11. — P. 1494—1495.
17. Current trends in the embryology of angiosperms / Eds. S.S. Bhojwani, W.Y. Soh. — Dordrecht, Berlin, London: Kluwer Acad. Publ., 2001. — 533 p.
18. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauhar P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // J. Hered. — 2001. — **92**, N 1. — P. 56—64.
19. Erdelska O., Sykorova B. Somatic embryogenesis of maize hybrids: histological analysis // Biol. Plant. — 1997. — **39**, N 3. — P. 431—436.
20. Erdelska O., Vidovencova Z. Cleavage polyembryony in vivo and in vitro // Ibid. — 1994. — **36**, N 3. — P. 329—334.
21. Ferguson J.D., Mc Ewan J.M. The chemical induction of supernumerary shoots in the developing embryos of wheat // Physiol. Plant. — 1970. — **23**, N 1. — P. 18—28.
22. Ferguson J.D., Mc Ewan J.M., Card K.A. Hormonally induced polyembryos in wheat // Ibid. — 1979. — **45**, N 4. — P. 470—474.

23. *Fischer C., Neuhaus G.* Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots // *Plant J.* — 1996. — **9**, N 5. — P. 659—669.
24. *Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G.* Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport // *Plant Cell.* — 1997. — **9**, N 10. — P. 1767—1780.
25. *Guzman M., Arias J.F.Z.* Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants // *Plant Sci.* — 2000. — **151**, N 2. — P. 107—114.
26. *Haccius B.* Experimentally induced twinning in plants // *Nature.* — 1955. — **176**, N 4477. — P. 355—356.
27. *Jenik P.D., Barton M.K.* Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis // *Development.* — 2005. — **132**, N 16. — P. 3577—3585.
28. *Jimenez V.M., Bangerth F.* Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot // *Physiol. plant.* — 2001. — **111**, N 3. — P. 389—395.
29. *Konieczny R., Czaplinski A.Z., Golczyk H., Przywara L.* Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 2. — P. 177—187.
30. *Lomax T.L., Muday G.K., Rubery P.H.* Auxin transport // *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology* / Ed. P.J. Davies. — Dordrecht, Berlin, London: Kluwer Acad. Publ., 1995. — P. 509—530.
31. *Lynn J.A.* Rapid toluidine blue staining of Epon-embedded and mounted «adjacent» sections // *Amer. J. Clin. Path.* — 1965. — **44**, N 1. — P. 57—58.
32. *Michalczyk L., Cooke T.J., Cohen J.D.* Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis // *Phytochemistry.* — 1992. — **31**, N 4. — P. 1097—1103.
33. *Plant biotechnology and molecular markers* / Eds. S. Srivastava, A. Narula, S. Srivastava. — New Delhi: Anamaya Publ., 2004. — 325 p.
34. *Schiavone F.M., Cooke T.J.* Unusual patterns of somatic embryogenesis in domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors // *Cell Differ.* — 1987. — **21**, N 1. — P. 53—62.
35. *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**, N 2. — P. 523—530.

Получено 22.04.2009

ФОРМУВАННЯ ПОЛІЕМБРІОЇДІВ У КУЛЬТУРІ IN VITRO ПИЛЯКІВ ПШЕНИЦІ

О.О. Сельдимирова

Інститут біології Уфимського наукового центру Російської академії наук, Уфа

Проаналізовано морфогенез поліембріоїдів у культурі in vitro пиляків ярої м'якої пшениці. Виявлено структурні механізми формування поліембріоїдів, розглянуто роль синтетичного ауксину 2,4-Д в індукуванні їх утворення.

FORMATION OF POLYEMBRYOIDS IN WHEAT ANTHHER CULTURE IN VITRO

O.A. Seldimirova

Institute of Biology of Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Sciences
69 pr. Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia

The analysis of morphogenesis of polyembryoids in anther culture in vitro of spring wheat was conducted. The structural mechanisms of polyembryoid formation have been revealed. The role of synthetic auxin 2,4-D in induction of polyembryoid formation is discussed.

Key words: *Triticum aestivum* L., anther culture in vitro, polyembryoids, 2,4-D, symmetry.