

К ВОПРОСУ О ФОРМИРОВАНИИ ПОЛИЭМБРИОИДОВ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2011 О.А. Сельдмирова, И.Р. Галин

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 04.04.2011

Методами световой и сканирующей электронной микроскопии получены данные, подтверждающие одноклеточное происхождение полиэмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы.

Ключевые слова: морфогенез, культура *in vitro*, пыльник, полиэмбриоид, пшеница.

Метод культуры *in vitro* изолированных пыльников основан на использовании феномена андроклинии (или, в другой терминологии, андрогенеза *in vitro*). Андроклиния рассматривается как нетрадиционная система размножения растений, имеющая свои параллели и аналогии с другими системами размножения [2-4, 6, 10, 11, 13].

Феномен андроклинии состоит в переключении развития инициальных клеток пыльника в условиях *in vitro* с обычной гаметофитной программы, ведущей к образованию пыльцевого зерна, на спорофитную программу, ведущую к образованию гаплоидного растения-регенеранта. При этом инициальные клетки реализуют свой морфогенетический потенциал различными путями морфогенеза [1, 7, 8, 10].

Установлено, что к образованию растений-регенерантов ведут два пути морфогенеза – эмбриодогенез (формирование эмбриоида – bipolarной зародышеподобной структуры непосредственно из инициальной клетки пыльника (прямой эмбриодогенез) или из клетки каллуса (непрямой эмбриодогенез)) и гемморизогенез (сопряженное формирование в каллусе почек и корней) [7, 8, 10, 13].

Биотехнологически оптимальным путем регенерации растений считается прямой эмбриодогенез, так как он не связан со сложным многоступенчатым процессом морфогенеза через каллус, требующим трудоемкой процедуры пересадок, и предполагает работу с генетически однородным материалом [3, 5, 10, 12].

Основная проблема получения гаплоидов посредством эмбриодогенеза в культуре *in vitro* изолированных пыльников – низкий выход растений-регенерантов. Один из способов решения этой проблемы – индукция образования особого типа эмбриоидов, для которых характерно формирование в их апикальной части множественных точек роста. Как полагают Cistue *et al.* [16], что получение таких эмбриоидов позволит увеличить количество растений-регенерантов.

Однако возникает вопрос о происхождении таких эмбриоидов – формируются ли они каждый из

отдельных инициальных клеток пыльника или же образуются в результате слияния нескольких эмбриоидов, сходных по строению с зиготическими зародышами. Этот вопрос имеет принципиальное значение. Действительно, если такие эмбриоиды имеют одноклеточное происхождение, то все полученные растения-регенеранты будут представлять собой клоны. Если же такие эмбриоиды формируются в результате слияния нескольких эмбриоидов, подобных зиготическим зародышам, особенно на ранних этапах развития, возникает риск получения химерных растений-регенерантов.

В литературных источниках имеются только единичные упоминания о формировании такого типа эмбриоидов андроклинного происхождения [3, 14-18, 21, 22] и полностью отсутствуют данные об их генезисе. В то же время изучение генезиса полиэмбриоидов имеет несомненное практическое значение, поскольку при условии одноклеточного происхождения полиэмбриоидов предоставляется возможность значительно увеличить количество дигаплоидных растений-регенерантов, являющихся клонами исходных родительских форм, обладающих хозяйственно-ценными признаками.

Следует отметить, что термин, касающийся названия таких эмбриоидов, отсутствует. Некоторые авторы называют их зародышеподобными структурами [18;19,20], другие – эмбриоидами или каллусами [17]. Мы предлагаем называть эмбриоиды такого типа полиэмбриоидами.

Целью исследования был вопрос о происхождении полиэмбриоидов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужил сорт яровой мягкой пшеницы Жница, характеризующийся высокой частотой образования *in vitro* андроклинных структур и интенсивно использующийся в селекционной практике Башкирского НИИ СХ РСХН. Морфологические и цито-гистологические особенности формирования полиэмбриоидов изучали методами световой (СМ) (μ Vizo-103, ЛОМО ФОТОНИКА, г. Санкт-Петербург) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (JSM 35, Jeol, Japan и JSM-6390, Jeol, Japan, на базе БИН РАН, г. Санкт-Петербург).

Следует отметить, что изучение развития микроспоридных эмбриоидов в условиях *in vitro* со-

Сельдмирова Оксана Александровна, канд. биол. наук,
e-mail: seldimirova@anrb.ru; Галин Ильшат Рафкатович,
e-mail: gir.87@mail.ru

пряжено с рядом трудностей методического характера, связанных, в первую очередь, со сложностью ориентации объектов при приготовлении срезов из-за их мелких размеров (особенно на ранних стадиях), частых отклонений в форме, а также отсутствия маркеров типа рубчика семени, имеющих у зиготического зародыша. Существенную помощь в этом вопросе оказывает метод сканирующей электронной микроскопии, еще недостаточно широко используемый в исследованиях такого рода, но позволяющий получить точное представление о пространственной организации эмбриоидов в динамике их развития.

Последующий цито-гистологический анализ тех же эмбриоидов дает информацию о тонких деталях их строения в динамике развития, позволяя совместить объемное поверхностное изображение объекта с его внутренним строением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее [9, 13] было установлено, что инициальная клетка андроклинии – сильновакуолизованная микроспора. В результате воздействия низкими положительными температурами *in situ* сильновакуолизованные микроспоры отрываются от стенки пыльника, теряют свою полярную организацию и приобретают типичную «звездчатую» структуру. На 3-е сут от момента инокуляции пыльников на индукционную среду *in vitro* в таких деполаризованных микроспорах отмечены равные (симметричные) митотические деления с образованием сначала двух равных ядер, а затем двух равных клеток.

Согласно полученным нами данным, на 9-е сут от начала культивирования *in vitro* в результате дальнейших равных делений обеих образовавшихся клеток формируются четырехклеточный (рис. 1), а на 11-е сут – многоклеточный полиэмбриоид (рис. 2).

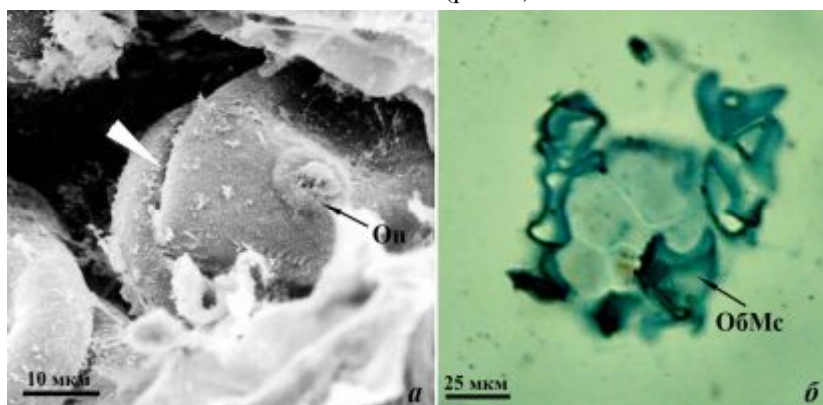


Рис. 1. Четырехклеточный полиэмбриоид (9-е сут культивирования пыльников *in vitro*). а – СЭМ; б – СМ, постоянный препарат. Условные обозначения: Оп – оперкулум, ОбМс – оболочка микроспоры

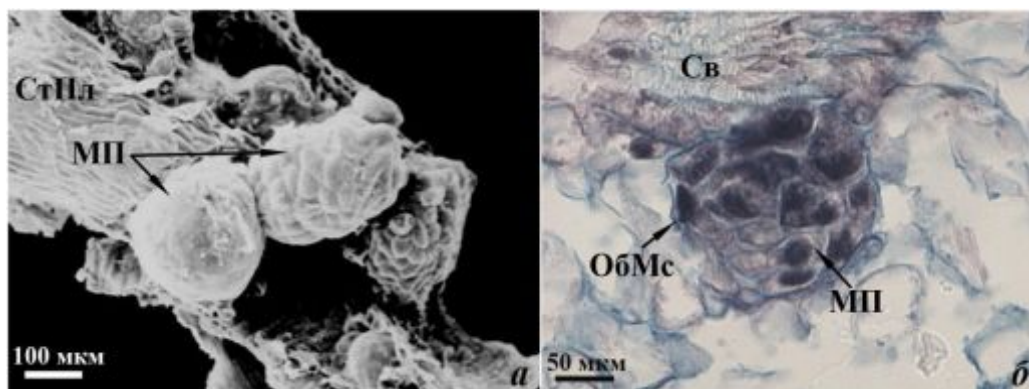


Рис. 2. Многоклеточный полиэмбриоид (11-е сут культивирования пыльников *in vitro*). а – СЭМ; б – СМ, постоянный препарат. Условные обозначения: МП – многоклеточный полиэмбриоид, ОбМс – оболочка микроспоры, Св – связник, СтПл – стенка пыльника.

Все клетки полиэмбриоида на начальных этапах развития сходны по размерам и структуре (рис. 1б, 2б), а сам полиэмбриоид имеет глобулярную форму (рис. 1а, 2а).

Снаружи полиэмбриоиды окружены общей утолщенной оболочкой, наружная часть которой представляет собой оболочку микроспоры (рис. 1, 2).

В дальнейшем интенсивный рост полиэмбриоидов приводит к растяжению и механическому разрыву сначала оболочки микроспоры, а затем и стенки гнезда пыльника. На 21-24 сут культивирования *in vitro* полиэмбриоид появляется на поверхности пыльника.

Проведенный нами детальный анализ морфогенеза полиэмбриоидов в динамике развития позволил установить, что эти структуры, так же как и

эмбриониды, сходные по строению с зиготическими зародышами, имеют одноклеточное происхождение.

Такой вывод основан на следующих данных. Инициальными клетками и в том, и в другом случае являются сильновакуолизированные микроспоры. Дальнейшие деления приводят к формированию глобулярных многоклеточных структур. На начальных этапах развития такие многоклеточные структуры окружены единой оболочкой материнской микроспоры. Одноклеточное происхождение полиэмбрионидов также подтверждается развитием их сосудистой системы, которая с самого начала развивается как единое целое, объединяя все органы развивающегося полиэмбриоида, что было бы невозможным в случае формирования полиэмбрионидов как результата срастания нескольких эмбрионидов.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Г.Е. Титовой (БИН РАН) за методическую помощь при работе со сканирующим микроскопом.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-97045) и поддержана программой «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4, лидер Школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина, БИН РАН, Санкт-Петербург).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro* (эмбрионидогенез у покрытосеменных) // Ботан. журн. 1978. Т. 63. № 1. С. 87-111.
2. Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 48 с.
3. Горбунова В.Ю. Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях *in vitro*. Уфа, 1993. 101 с.
4. Круглова Н.Н. Унификация терминологии при разработке инновационной биотехнологии андроклинической гаплоидии *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 476-486.
5. Круглова Н.Н. Инновационная биотехнология андроклинической гаплоидии яровой мягкой пшеницы // Аграрная Россия. 2009. № 1. С. 34-39.
6. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2002. 48 с.
7. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю. Каллусогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117. Вып. 1. С. 83-94.
8. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Батыгина Т.Б. Эмбрионидогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи современной биологии. 1995. Т. 115. Вып. 6. С. 692-705.
9. Круглова Н.Н., Куксо П.А. Инициальная клетка андроклинии // Физиология и биохимия культурных растений. 2006. Т. 38. № 3. С. 279-291.
10. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдмирова. М.: Наука, 2010. 175 с.
11. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 1983. 24 с.
12. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. М.: Наука, 1976. С. 5-14.
13. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдмирова. М.: Наука, 2005. 99 с.
14. Aulinger 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 Repts. 2003. V. 21. № 6. P. 123-129.
15. Brisibe E.A., Gajdosova A., Olesen A., Andersen S.B. Cyto-differentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat // J. Exp. Bot. 2000. V. 51. № 343. P. 365-370.
16. Cistue L., Soriano M., Castillo A.M. et al. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. № 6. P. 193-199.
17. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauhar P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // J. Hered. 2001. V. 92. № 1. P. 461-467.
18. Guzman M., Zapata-Arias F.J. Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ra-tooned plants // Plant Sci. 2000. V. 151. № 2. P. 771-777.
19. Hänsch K.-T., Seyring M., Schütze K. Histologische Analyse der somatischen Embryogenese bei Pflingstrosen. <http://www.pflanzen-biotechnologie.de/veranstaltungen/workshop-gentechnik-und-somatische-embryogenese/abstracts>
20. Heß D. Biotechnologie der Pflanzen. Stuttgart, 1992. 432 S.
21. Konieczny R., Czapllicki A.Z., Goleczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 2003. V. 73. № 2. P. 861-867.
22. Wei Z., Qiang F., Xigang D., Manzhu B. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. acephala) and the importance of genotype to embryo regeneration // Sci. Hort. 2008. V. 117. № 1. P. 542-547.

ABOUT THE QUESTION ON FORMATION OF POLYEMBRYOIDS IN WHEAT ANTHER CULTURE *IN VITRO*

© 2011 O.A. Seldimirova, I.R. Galin

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

By the methods of light and scanning electron microscopy the data confirm the one-cellular origin of polyembryoids in wheat anther culture *in vitro* were obtained.

Key words: *morphogenesis, culture in vitro, polyembryoid, wheat.*