

УДК 633.111.1:581.143.6

СТРУКТУРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАНОВЛЕНИЯ СИММЕТРИИ У МИКРОСПОРИАЛЬНЫХ ЭМБРИОИДОВ ПШЕНИЦЫ: ДАнные СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

©2013 О.А. Сельдимирова¹, Г.Е. Титова², И.Р. Галин¹, Н.Н. Круглова¹

¹Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

²Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

Поступила 10.06.2013

Методом сканирующей электронной микроскопии проанализированы фенотипы эмбриоидов, формирующихся в культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы. Выявлены структурные механизмы формирования эмбриоидов и рассмотрена роль синтетического ауксина 2,4-Д в индукции их образования.

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

Морфогенез, как совокупность протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тканей и органов [1], остается одной из сложнейших проблем биологии развития растений.

При морфогенезе определяющее значение принадлежит процессам становления полярности и симметрии растительного организма, так как осевая организация тела в пространстве – существенный элемент целостности растительного организма [2, 3].

Однако реальные процессы, в том числе и структурные механизмы, лежащие в формировании осевой симметрии у высших растений, изучены недостаточно [2]. Основная причина этого – недоступность зародышей растений на самых ранних этапах их развития [4].

Удобной модельной системой для исследований в области морфогенеза растений может служить соматический эмбриогенез – формирование биполярных зародышеподобных структур – эмбриоидов в строго контролируемых условиях *in vitro* [5], в том числе при культивировании *in vitro* изолированных пыльников пшеницы [6].

При анализе структурных механизмов становления полярности и симметрии эмбриоидов *in vitro* большую помощь оказывает метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), позволяющий получить точное представление о пространственной организации изучаемого объекта и тонких деталях его строения, а также точно идентифицировать конкретный путь морфогенеза *in vitro*, реализующийся при культивировании изолированных пыльников.

Цель работы состояла в изучении микроспоридных эмбриоидов пшеницы методом СЭМ и анализе структурных механизмов становления их симметрии.

Сельдимирова Оксана Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: seldimirova@anrb.ru; Титова Галина Евгеньевна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: galina_titova@mail.ru; Галин Ильшат Рафкатович, аспирант, e-mail: gir.87@mail.ru; Круглова Наталья Николаевна, д.б.н., проф., зав. лабораторией, e-mail: kruglova@anrb.ru

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужили микроспоридные эмбриоиды, полученные при культивировании *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы сорта Жница.

Донорные растения выращивались в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН (Уфимский р-н).

Микроспоридные эмбриоиды получали с использованием метода культуры *in vitro* изолированных пыльников яровой мягкой пшеницы [7]. Образцы для сканирующей электронной микроскопии готовили согласно [8], высушивали с помощью прибора «Critical point» (Hitachi, Japan), электропроводящее покрытие создавали термическим напылением золота в вакууме с применением вакуумного универсального поста (ВУП). Объекты анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6390 (Jeol, Japan; на базе БИН РАН, г. Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В культуре *in vitro* изолированных пыльников при использовании низких концентраций 2,4-Д образуются эмбриоиды (рис. 1а), сходные по строению с зиготическим зародышем пшеницы (рис. 1б). Такие эмбриоиды характеризуются дорзовентральной симметрией и наличием всех органов, присущих зиготическому зародышу. Разнообразные формы эмбриоидов можно объяснить их развитием в отсутствие жесткой тканевой детерминации, имеющей место у зиготического зародыша *in vivo*.

При повышении концентрации 2,4-Д образуются эмбриоиды, представляющие собой сложные структуры – полиэмбриоиды – с измененным типом полярности и симметрии, что выражается в образовании в их апикальной части множественных щитков и апикальных меристем побега (от 2 до 5, рис. 2), объединенных общим корневым полюсом (иногда отмечается дифференциация двух независимых или поверхностно сросшихся апикальных меристем первичного корня).

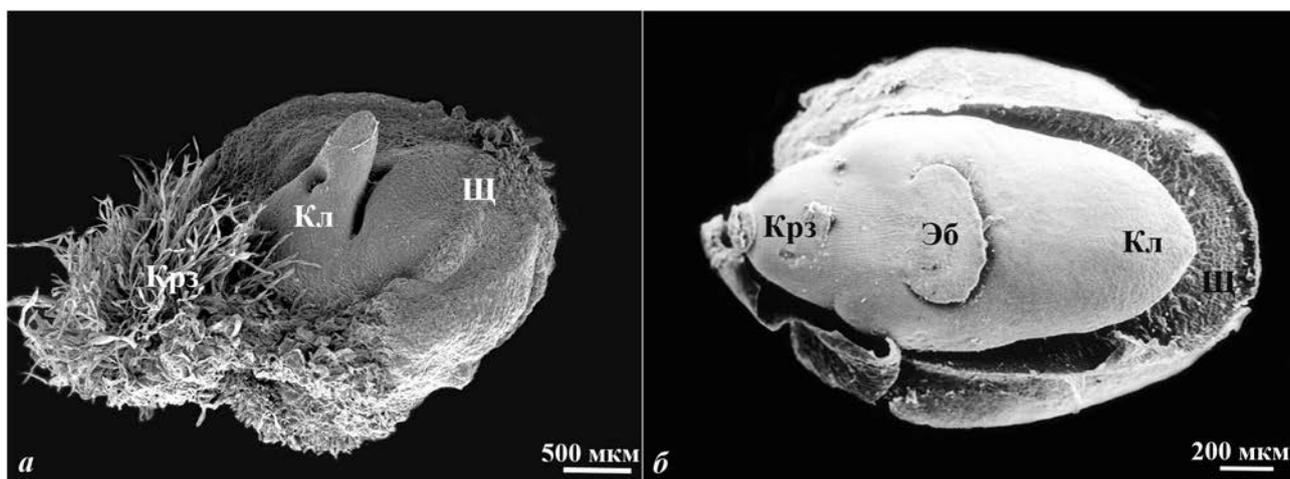


Рис. 1. Микроспориальный эмбрионд (*а*), сходный по строению с зиготическим зародышем (*б*). СЭМ. Условные обозначения: Кл – coleoptile, Крз – coleorhiza, Щ – scutellum, Эб – epiblast

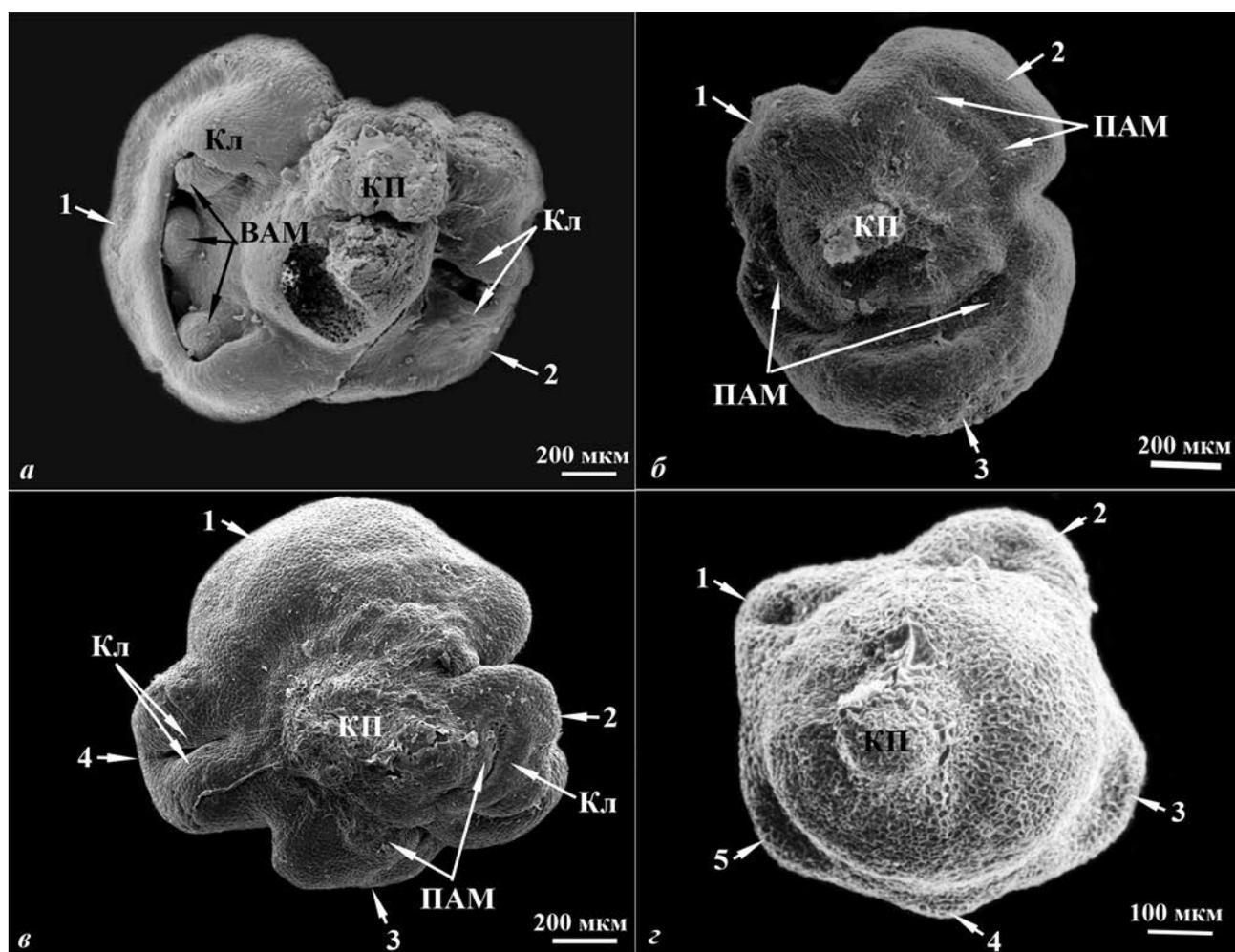


Рис. 2. Микроспориальные полиэмбрионды с множественными щитками и апикальными меристемами побега: *а* – с двумя, *б* – тремя, *в* – четырьмя, *г* – пятью щитками, соответственно. СЭМ. Условные обозначения: ВАР – вторичная апикальная меристема побега, Кл – coleoptile, КП – root pole, ПАР – primary shoot apical meristem. Прим. Цифрами обозначены отдельные щитки

Анализ полученных результатов позволяет выделить два типа полиэмбриондов с различным типом симметрии: 1) полиэмбрионды с щитками, обращенными друг к другу дорзальной стороной и расположенными, в целом, терминально по отношению к соответствующим апикальным меристемам побега (преобладающий тип) (рис. 2) и 2) полиэмбрионды с щитками, обращенными друг к другу вентральной стороной и расположенными латерально по отношению к соответствующим апикальным меристемам побега (единичные случаи) (рис. 3).

мам побега (преобладающий тип) (рис. 2) и 2) полиэмбрионды с щитками, обращенными друг к другу вентральной стороной и расположенными латерально по отношению к соответствующим апикальным меристемам побега (единичные случаи) (рис. 3).

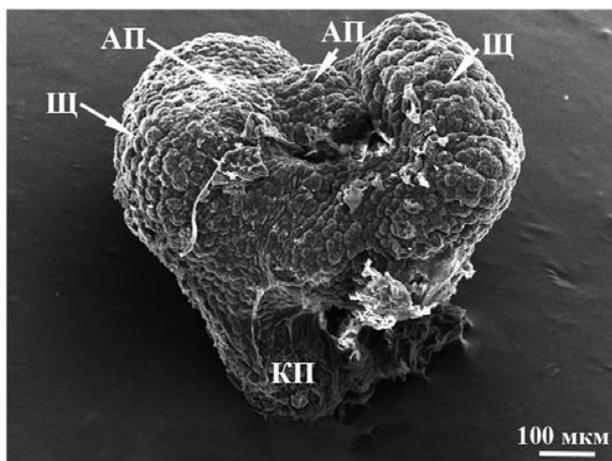


Рис. 3. Микроспориальный полиэмбрионид с щитками, обращенными друг к другу вентральной стороной. СЭМ. Условные обозначения: АП – апекс побега, КП – корневой полюс, Щ – щиток

Возможный механизм формирования таких полиэмбрионидов – кливажная полиэмбриония, состоящая в возникновении нескольких зародышей из зиготы или зародышей различного происхождения вследствие их расщепления [9].

Согласно W.R.Sharp с соавт. [10], развитие клеток (по сути меристематических) зиготических или соматических зародышей (эмбрионидов – *Авт.*) детерминировано, а сами клетки при этом интегрированы в одну целостную систему – организм.

При определенных условиях клетки зародышей и эмбрионидов могут освобождаться от организменного контроля, становиться тотипотентными, а затем детерминированными к формированию «нового» зародыша.

У голосеменных растений кливажная полиэмбриония – явление спонтанное и регулярное как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* [11].

У покрытосеменных растений процесс кливажной полиэмбрионии *in vivo* происходит довольно редко [9], но может быть индуцирован с использованием различных обработок, как правило, применением синтетических ауксинов [12–15] или ингибиторов полярного транспорта ауксинов [16] на ранних стадиях развития зародышей.

Оба типа полиэмбрионидов, полученных нами в культуре *in vitro* пыльников пшеницы, в целом идентичны фенотипам, индуцированных воздействием *in vitro* ингибиторов полярного транспорта ауксинов (N-1-нафтилфталомовая кислота, квертицин) на изолированные зиготические зародыши *Triticum aestivum* L. в глобулярной стадии и раннего перехода к органогенезу [16].

В проанализированных нами литературных источниках [12–16] не прослежен генезис таких полимерных структур. Изучение генезиса полиэмбрионидов 1-го типа с использованием метода СЭМ позволило выявить структурный механизм кливажной полиэмбрионии лежащий в основе их образования.

Такой механизм заключается в следующем: за счет увеличения размеров апикальной части первичного эмбриоида (по крайней мере, с глобулярной стадии развития) на ней вместо одной возникают множественные точки роста, часто неравноценные по объему, что приводит к различиям в размерах образующихся множественных щитков и соответствующих им апикальных меристем побега (рис. 2а–в).

Аномальное увеличение размеров первичных апикальных меристем побега (рис. 2б,в) приводит к возникновению множественных вторичных апикальных меристем (рис. 2а), образующих в дальнейшем систему фасцированных побегов.

Известно, что главную роль в становлении симметрии зародыша растений играет неомогенное распределение ауксина (градиенты ауксина); потоки ауксина, создавая позиционную информацию, действуют как мощнейший морфогенетический фактор и определяют дифференциацию органов зародыша [2, 16].

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод об общности механизма гормональной регуляции образования полимерных структур на основе процесса кливажной полиэмбрионии как зиготических зародышей [16], так и микроспориальных эмбрионидов пшеницы. Данный механизм состоит в нарушении полярного транспорта ауксинов в зародыше/эмбриоиде на глобулярной стадии развития, приводящей к изменению их симметрии и полярности: в зародыше – под действием ингибиторов полярного транспорта ауксинов, в эмбриоидах – вследствие создания в них избытка ауксинов при повышении концентрации 2,4-Д в индукционной среде.

S.Fischer и G.Neuhaus [17] установили, что в недифференцированном зиготическом зародыше пшеницы вокруг апикальной части существует кольцо клеток, 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 щитка – 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 формируются полиэмбрионы.

По мнению В.Нассиус [13], недифференцированный зародыш уже обладает «апикальным доминированием». Возможно, что при действии ростовыми веществами повреждается группа клеток, из которой позднее возникнет апекс побега и которая подавляет формирование других апексов. При этом действие клеток будущего апекса прекращается, а

клетки, которые в норме должны давать начало семядолям, дают начало новым апексам побегов.

Дальнейшая детализация данных по генезису микроспориальных полиэмбриоидов позволит внести вклад в понимание процессов морфогенеза зародыша и кливажной полиэмбрионии, а также внести уточнения в гипотезу о механизме гормональной регуляции становления полярности и симметрии в эмбриогенезе злаков и подойти к управлению этими процессами в условиях *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Медведев С.С. Механизмы формирования и физиологическая роль полярности в растениях // Физиол. раст. 2012. Т. 59. № 4. С. 543-556.
3. Theissen G., Saedler H. Molecular architects of plant body plans // Progress in botany. V. 59 / eds H.-D. Behnke, K. Esser, J.W. Kadereit, U. Lüttge, M. Runge. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. P. 227-256.
4. Raghavan V. Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. New York: Cambridge Univer. Press, 1986. 316 p.
5. Zimmerman J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants // Plant Cell. 1993. V. 5. N 10. P. 1411-1423.
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., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа, 2002. 39 с.
8. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука, 1994. 399 с.
9. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции / Под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 2000. С. 35-39.
10. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Maraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // Hort. Rev. V. 2 / eds F.G. Dennis, D.N. Maynard, M.N. Rogers. Westport, Connecticut: The AVI Publishing company, 1980. P. 268-310.
11. Gupta P.K., Durzan D.J. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos // Nat. Biotechnol. 1986. V. 4. N 7. P. 643-645.
12. Яковлев М.С., Снегурев Д.П. Влияние ростовых веществ на образование многозародышевых зерновок у пшеницы // Ботан. журн. 1954. Т. 39. № 2. С. 187-194.
13. Hacius B. Experimentally induced twinning in plants // Nature. 1955. V. 176. N 4477. P. 355-356.
14. Ferguson J.D., Mc Ewan J.M., Card K.A. Hormonally induced polyembryos in wheat // Physiol. Plant. 1979. V. 45. N 4. P. 470-474.
15. Erdelska O., Vidovencova Z. Cleavage polyembryony *in vivo* and *in vitro* // Biol. Plant. 1994. V. 36. N 3. P. 329-334.
16. Fischer C., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G. Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport // The Plant Cell. 1997. V. 9. N 10. P. 1767-1780.
17. Fischer C., Neuhaus G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots // Plant J. 1996. V. 9. N 5. P. 659-669.

STRUCTURAL MECHANISMS OF SYMMETRY ESTABLISHMENT IN MICROSPORE DERIVED EMBRYOIDS OF WHEAT: THE DATA OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

©2013 O.A. Seldimirova¹, G.E. Titova², I.R. Galin¹, N.N. Kruglova¹

¹Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

²Komarov Botanical Institute of RAS, St. Petersburg

The phenotypes of microspore derived embryooids formed in anther culture *in vitro* of spring soft wheat were analyzed by the method of scanning electronic microscopy. Structural mechanisms of embryooids formation are revealed and the role of synthetic auxin 2,4-D in their induction is considered.

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

Oksana, Seldimirova, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: seldimirova@anrb.ru; Galina Titova, Candidate of Biology, leading researcher, e-mail: galina_titova@mail.ru; Ilshat Galin, postgraduate student, e-mail: gir.87@mail.ru; Natalia Kruglova, Doctor of Biology, professor, head of laboratory, e-mail: kruglova@anrb.ru