

УДК 581.143.6:633.111.1

## КОМПЛЕКСНЫЙ ЦИТО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ АНДРОКЛИННОГО ЭМБРИОИДОГЕНЕЗА

Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт биологии Российской академии наук, Уфа, Россия, e-mail: kruglova@anrb.ru

Приведены данные комплексного цито-физиологического анализа особенностей индукции, формирования и развития андроклинных эмбрионидов пшеницы с применением методов: культуры *in vitro* изолированных пыльников пшеницы, иммуноферментного анализа, световой и сканирующей электронной микроскопии. При культивировании *in vitro* пыльников выявлены два типа эмбрионидов – сходные по строению с зиготическими зародышами пшеницы и эмбриониды, представляющие собой полимерные структуры и характеризующиеся формированием множественных органов. Установлено, что индукция формирования каждого типа эмбрионидов определяется балансом между содержанием эндогенного ауксина ИУК в пыльнике в момент инокуляции и концентрацией экзогенного синтетического ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде. Показано, что применение комплексного подхода позволяет прогнозировать индукцию конкретного пути морфогенеза в культуре *in vitro* изолированных пыльников и тем самым оптимизировать биотехнологические исследования пшеницы.

Ключевые слова: пшеница (*Triticum aestivum* L.), андроклиния, культура пыльников *in vitro*, эмбриоидогенез.

## COMPLEX CYTO-PHYSIOLOGICAL APPROACH TO THE STUDY OF ANDROCLINIC EMBRYOIDOGENESIS

Seldimirova O.A., Kruglova N.N.

Ufa Institute of Biology of RAS, Russia, e-mail: kruglova@anrb.ru

The data of complex cyto-physiological analysis of the peculiarities of induction, formation and development of wheat androclinic embryoids using the methods: *in vitro* culture of isolated anthers of wheat, immunoenzyme assay, scanning electron and light microscopy are presented. In anther culture *in vitro* two types of embryoids were identified – embryoids similar in structure to the zygotic embryos of wheat and embryoids, representing polymeric structures and characterized by the formation of multiple organs. It is established that induction of the formation of each embryoid type is determined by balance between endogenous auxin IAA content in the anther at the time of inoculation and the concentration of exogenous synthetic auxin 2,4-D in the induction medium. It is shown that complex approach allows predicting the induction of certain morphogenesis pathway *in vitro* in anther culture, and thereby optimizing biotechnology research wheat.

Keywords: wheat (*Triticum aestivum* L.), androcliny, anther culture *in vitro*, embryoidogenesis.

Получение гаплоидов в культуре изолированных пыльников *in vitro* – общепризнанный способ коммерческой селекции экономически важных сельскохозяйственных культур, в том числе яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака [2, 6, 10]. Метод культуры *in vitro* изолированных пыльников основан на феномене андроклинии – образовании гаплоидного растения-регенеранта из клетки пыльника – микроспоры, развитие которой переключается с обычного гаметофитного пути на принципиально иной путь развития – спорофитный. При этом микроспора способна развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*: эмбриоидогенез (формирование зародышеподобных структур – эмбрионидов) и каллусогенез (формирование каллуса – гетерогенной интегрированной массы клеток, также способных развиваться по различным путям морфогенеза *in vitro*). Биотехнологически оптимальным путем получения растений-

регенерантов является эмбриоидогенез [2, 6, 10]. Это обусловлено рядом причин: во-первых, единицей репродукции является зачаток целого организма, во-вторых, одноклеточное происхождение эмбриоидов гарантирует генетическую однородность растений-регенерантов, в-третьих, в случае эмбриоидогенеза отсутствует необходимость осуществления дорогостоящей процедуры многократных пересадок на среды различного состава, как это происходит в случае каллусогенеза [2, 6, 8–10].

Несмотря на достаточную изученность андроклинного эмбриоидогенеза у различных представителей цветковых растений [6, 8–10], нерешенным остается ряд проблем. Так, не разработан способ управления путями морфогенеза в культуре *in vitro* изолированных пыльников, позволяющий целенаправленно индуцировать именно эмбриоидогенез. Кроме того, абсолютное большинство авторов констатируют пути морфогенеза только на основании внешне морфологических показателей, которые не всегда являются доказательством реализации конкретного пути морфогенеза *in vitro* [9].

**Цель** работы состояла в изучении различных аспектов андроклинного эмбриоидогенеза и применении полученных данных для разработки способа управления путями морфо.

#### **Объект и методы исследования**

Объектом исследования послужила яровая мягкая пшеница сортов Жница, Башкирская 26, Салават Юлаев, Экада 70, Скала, характеризующихся высокой отзывчивостью в культуре *in vitro*. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара Уфимского Института биологии РАН (Уфимский район).

Для достижения цели исследования применяли комплексный цито-физиологический подход с использованием методов культуры *in vitro* изолированных пыльников пшеницы [3], твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [5], световой микроскопии (СМ) [7] и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [10].

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Следует отметить, что изучение развития морфогенных структур в условиях *in vitro* сопряжено с рядом трудностей методического характера, связанных, в первую очередь, со сложностью ориентации объектов при приготовлении гистологических срезов: мелкие размеры объектов (особенно на ранних стадиях), морфологическое разнообразие объектов, отсутствие маркеров, характерных для объектов, формирующихся *in planta*. Существенную помощь в этом вопросе оказывает метод СЭМ, позволяющий получить точное представление о пространственной организации исследуемых образцов [4, 6, 10]. Последующий гистологический анализ тех же образцов дает информацию о тонких деталях их строения в динамике развития, позволяя совместить объемное поверхностное изображение объекта с его

внутренним строением.

Так, применение методического подхода совмещения данных СЭМ и СМ выявило формирование культуре *in vitro* изолированных пыльников пшеницы двух типов эмбриоидов. Первый тип эмбриоидов характеризовался значительным сходством строения и развития с зародышем пшеницы, формирующимся *in planta* (рис. 1а, з).

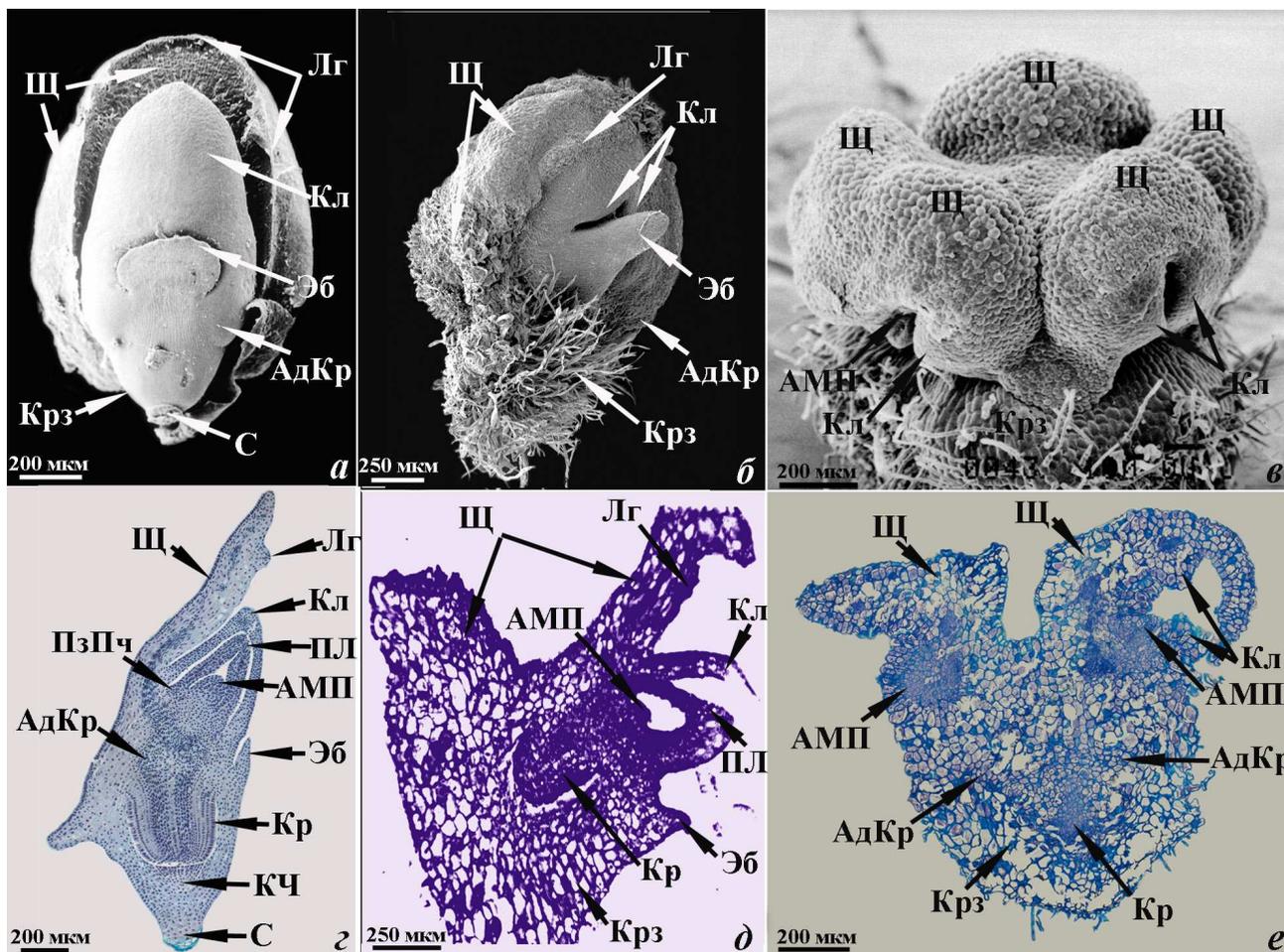


Рис. 1. Сформированные зародыш (а, з), сходный с ним по строению эмбриоид (б, д) и полиэмбриоид (в, е) у яровой мягкой пшеницы сорта Жница. а – в – СЭМ, з – е – СМ  
Условные обозначения: АдКр – адвентивный корень, АМП – апикальная меристема побега, Кл – coleoptиль, Кр – первый корень, Крз – coleориза, КЧ – корневого чехлик, Лг – лигула, ПзПч – пазушная почка, ПЛ – первый лист, С – суспензор, Щ – щиток, Эб – эпибласт.

Сопоставление данных СЭМ и СМ позволило установить, что эмбриоиды первого типа имели все органы, присущие зародышу пшеницы: единственную семядолю – щиток, вырост щитка – лигулу, дифференцированную почечку, состоящую из апикальной меристемы побега и нескольких листовых зачатков, первый зародышевый корень и зачатки адвентивных корней, coleоризу (корневое влагалище), coleoptиль, эпибласт (рис. 1б, д). Кроме того, эмбриоиды первого типа характеризовались дорзовентральной симметрией, что

является типичным для зародышей злаков признаком.

Второй тип эмбриоидов (представляющих собой полимерные зародышеподобные структуры) характеризовался измененным типом полярности и симметрии, что выражалось в образовании в их апикальной части множественных щитков и соответствующих им апикальных меристем побегов, объединенных общим корнем (рис. 1*в, е*). Следует отметить, что в литературе отсутствуют специальные термины, определяющие такие структуры. Мы предлагаем использовать применительно к этим структурам термин «полиэмбриоиды».

У таких полиэмбриоидов вместо одной исходной первичной оси (апикально-базальной) происходит формирование нескольких новых осей, радиально расположенных относительно первичной оси и объединенных одним общим корневым полюсом. При этом последовательность заложения органов в полиэмбриоидах такая же, как и у зародышей и сходных с ними по строению эмбриоидов. Таким образом, сама полимерная структура – полиэмбриоид – имеет радиальную симметрию (рис. 1*в*), но каждая из единиц, составляющих полимерную структуру, имеет дорзовентральную симметрию – терминально расположенный щиток и латерально расположенную апикальную меристему побега, объединенные общим корневым полюсом. То есть анатомически каждая из единиц, составляющих полиэмбриоид, соответствует зародышу пшеницы и сходному с ним по строению эмбриоиду (рис. 1*г–е*).

Важно отметить, что получение полиэмбриоидов и изучение их генезиса имеет несомненное теоретическое и прикладное значение. С одной стороны, данные о механизмах формирования полиэмбриоидов позволят внести вклад в решение таких фундаментальных проблем биологии, как механизмы становления полярности и симметрии в процессе эмбриогенеза растений, морфологическая природа органов зародыша однодольных растений и эволюционное становление однодольности.

Также индукцию полиэмбриоидов можно рассматривать как способ оптимизации биотехнологии клонирования ценных генотипов злаков, за счет увеличения числа побегов в результате «кущения» еще в эмбриональный период и генетической однородности составляющих полиэмбриоид единиц.

Таким образом, использование методического подхода, заключающегося в исследовании образцов методом СМ после изучения их методом СЭМ позволяет абсолютно точно идентифицировать пути морфогенеза *in vitro*.

В культуре *in vitro* изолированных пыльников яровой мягкой пшеницы микроспоры реализуют свой морфогенетический потенциал различными путями морфогенеза [2, 6, 10]. До сих пор не разработан надежный способ управления путями морфогенеза в культуре *in vitro* изолированных пыльников пшеницы.

Хорошо известно, что основной фактор индукции морфогенеза *in vitro* – введение в состав культуральной среды определенных гормонов конкретной концентрации, в частности – определяющий фактор индукции развития микроспор злаков по спорофитной программе – введение в состав индукционной питательной среды синтетического гормона ауксинового типа действия 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д).

Рядом авторов [1] предложен оригинальный методический подход, согласно которому на основании предварительной оценки содержания эндогенного ауксина индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в пыльниках перед инокуляцией их на питательную среду, все генотипы пшеницы можно разделить на высоко- и низкоауксиновые. Установлено, что низкоауксиновым генотипам пшеницы для переключения программы развития микроспор с гаметофитной на спорофитную требуется более высокая концентрация экзогенного синтетического ауксина (2,4-Д) в индукционной питательной среде, по сравнению с высокоауксиновыми генотипами [1, 6, 10].

С применением этого подхода методом твердофазного ИФА [5], повышающего точность экспериментов за счет высокой специфичности отношений антител к гормонам, определяли содержание эндогенного ауксина ИУК в пыльниках исследуемых сортов пшеницы перед инокуляцией их на индукционную питательную среду (таблица). Согласно критериям, приведенным в работе [1], сорта Скала, Башкирская 26, Экада 70 можно условно отнести к группе высокоауксиновых, сорта Жница и Салават Юлаев – низкоауксиновых сортов.

В ходе дальнейшей работы выявили влияние концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в питательной среде на частоту образования андроклинных морфогенных структур (эмбриоидов, полиэмбриоидов, каллусов) у каждого изучаемого сорта пшеницы. Для этого пыльники инокулировали *in vitro* на варианты индукционной питательной среды, различающиеся только концентрацией 2,4-Д – 0.0–2.0 мг/л, с «шагом» в 0.5 мг/л. Количественное соотношение различных андроклинных морфогенных структур у высокоауксиновых и низкоауксиновых сортов, формирующихся на разных вариантах индукционной питательной среды, отражено на рис. 2.

Экспериментально установлено, что максимальное формирование эмбриоидов у высокоауксиновых сортов Скала, Башкирская 26 и Экада 70 наблюдалось на среде, не содержащей 2,4-Д, у низкоауксиновых сортов Жница и Салават Юлаев – на среде с концентрацией 2,4-Д в 0.5 мг/л (рис. 3). По мнению ряда авторов [1], такое поведение высокоауксиновых сортов можно объяснить способностью к саморегулированию морфогенных процессов даже при отсутствии экзогенных стимуляторов.

Содержание эндогенного ауксина ИУК в пыльниках изученных сортов яровой мягкой пшеницы перед инокуляцией на индукционную питательную среду

Сорт	Содержание ИУК, нг/г сухой массы	
	2012 г.	2013 г.
Скала	329,6 ±48,2	415,8±25,4
Экада 70	327,9±32,3	345,2±9,3
Башкирская 26	282,9 ±3,9	234,7±10,5
Салават Юлаев	72,3±8,5	56,5±15,3
Жница	57,6 ±11,2	61,6±12,6

Примечание: все показатели значимы при  $P < 0,05$ .

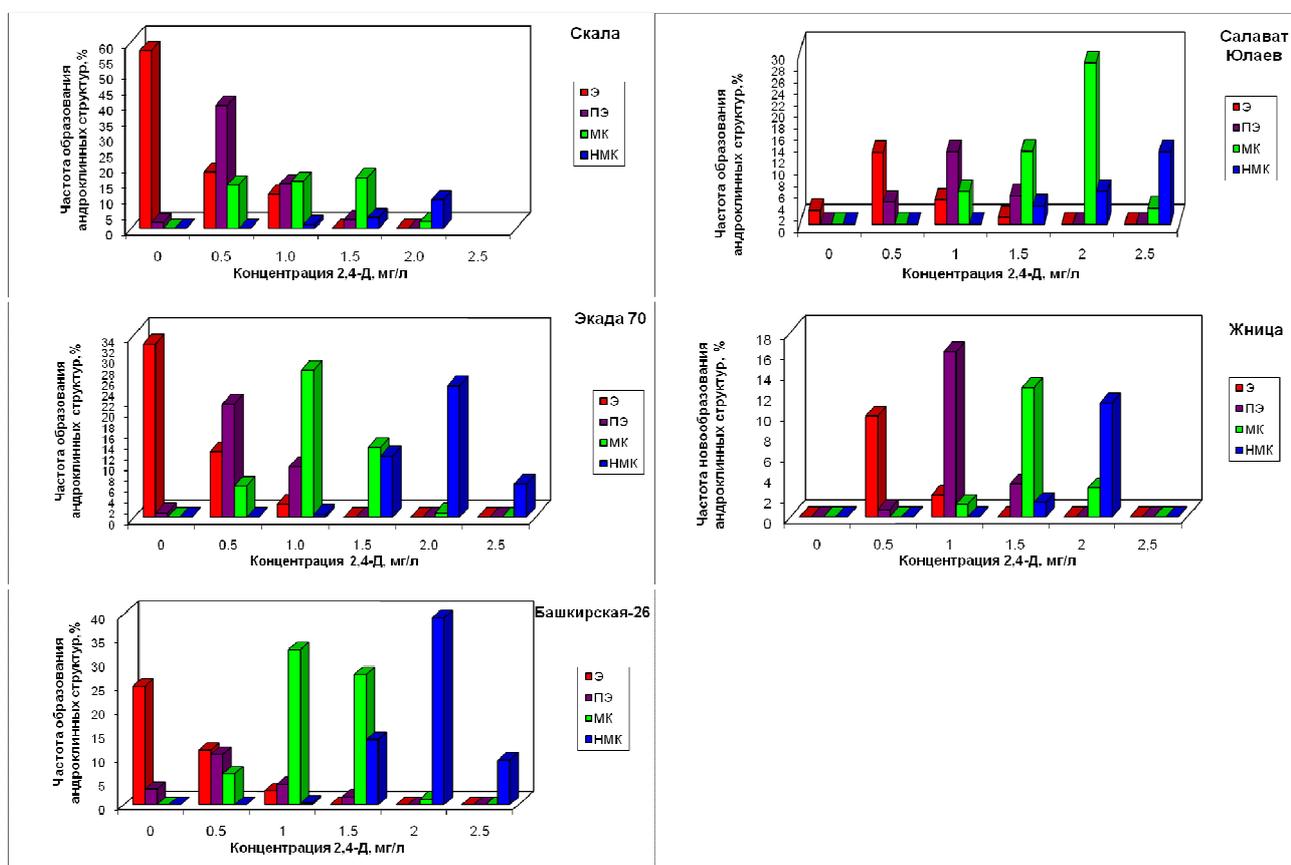


Рис. 2. Частота образования андроклиных морфогенных структур в культивируемых пыльниках изученных сортов пшеницы на индукционной питательной среде с различными концентрациями 2,4-Д. Условные обозначения: МК – морфогенные каллусы, НМК – неморфогенные каллусы, ПЭ – полиэмбриониды, Э – эмбриониды

Максимальное формирование полиэмбрионидов у высокоауксиновых сортов Скала, Башкирская 26 и Экада 70 наблюдалось на среде с более низкой концентрацией 2,4-Д в 0.5 мг/л, у низкоауксиновых сортов Жница и Салават Юлаев – на среде с более высокой

концентрацией 2,4-Д в 1.0 мг/л (рис. 3).

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что как гормональный статус пыльников, инокулируемых на индукционную питательную среду, так и концентрация экзогенного ауксина в составе индукционной питательной среды – важные факторы индукции формирования определенного типа андроклинных морфогенных структур (в данном случае, эмбриоидов и полиэмбриоидов).

Таким образом, показано, что предварительная оценка определенных физиологических показателей пыльников изучаемого генотипа яровой мягкой пшеницы (в данном случае – содержание эндогенного ауксина ИУК) необходима для того, чтобы спрогнозировать оптимальную концентрацию экзогенного ауксина 2,4-Д в составе индукционной питательной среде, необходимую для максимального получения определенного типа андроклинных эмбриоидов. Использование комплексного цитофизиологического подхода (сопоставление данных СЭМ, СМ и твердофазного ИФА) убедительно доказывает, что адекватный подбор концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде, основанный на точной идентификации содержания эндогенных ауксинов в пыльниках конкретного сорта пшеницы, позволяет управлять развитием микроспор по определенному пути морфогенеза *in vitro*, в том числе такому, как эмбриоидогенез.

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что только использование комплекса знаний (эмбриологических, физиологических и цитогистологических) позволяет решить конкретную практическую задачу – разработку способа управления сложным процессом морфогенеза *in vitro* в нужном исследователю направлении, а значит, сделать биотехнологические исследования эффективными.

### Список литературы

1. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 1. – С. 31–36.
2. Круглова Н.Н. Оптимизация биотехнологии получения растений пшеницы в культуре *in vitro* // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2012. – № 3. – С. 57–61.
3. 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.

4. Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Абрамов С.Н., Сельдимилова О.А. Андрогиенные эмбриониды и каллусы пшеницы: данные сканирующей электронной микроскопии // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 2. – С. 191–197.
5. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений. – 1986. – Т. 33. – № 6. – С. 1221–1227.
6. От микроспоры – к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимилова. – М.: Наука, 2010. – 174 с.
7. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений / Н.Н. Круглова, О.В. Егорова, О.А. Сельдимилова, Д.Ю. Зайцев, А.Е. Зинатуллина. – Уфа: Гилем, 2013. – 128 с.
8. Сельдимилова О.А., Круглова Н.Н. Особенности начальных этапов эмбриоидогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения // Известия РАН. – Серия биол. – 2013. – № 5. – С. 565–573.
9. Сельдимилова О.А., Круглова Н.Н. Андроклиный эмбриоидогенез *in vitro* злаков // Успехи сорем. биологии. – 2014. – Т. 134. – № 5. – С. 476–487.
10. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимилова. – М.: Наука, 2005. – 99 с.

**Рецензенты:**

Ибрагимов Р.И., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», г. Уфа;

Иванов И.И., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории физиологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Уфимского Института биологии Российской академии наук, г. Уфа.