

03.02.00 – ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 58.085

Статья поступила в редакцию 12.10.2017

ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ПАРТЕНОГЕНЕЗА *IN VITRO* В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЁННЫХ ЗАВЯЗЕЙ КУКУРУЗЫ ЛИНИИ АТ-1

© 2017

Алаторцева Татьяна Алексеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики
Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
(г. Саратов, Российская Федерация)

Аннотация. Линия кукурузы АТ-1 характеризуется наследственной предрасположенностью к партеногенезу. Целью исследования являлось изучение особенностей развития партеногенетического зародыша в культуре неопыленных завязей *in vitro*. Неопылённые завязи эксплантировали через 1, 3, 5, 7, 10, 15 суток после появления пестичных нитей из початка. Питательная среда включала минеральные компоненты MS, витамины, сахарозу (9,0%), 2,4-Д (2,0 мг/л), агар-агар. Была изучена структура мегагаметофитов в момент инокуляции завязей и на 3, 7, 14, 21, 28 сутки культивирования. Первые деления неоплодотворенных яйцеклеток наблюдали на 5–7 день с момента появления на початках рылец, независимо от того, находились ли все это время завязи на материнском растении или были инокулированы на питательную среду. В некоторых культивируемых завязях было зарегистрировано образование автономного ценоцитного эндосперма. Аномальный эндосperm, образовавшийся без оплодотворения центральной клетки, препятствовал нормальному развитию зародыша. Как правило, завязи с зародышем и эндоспермом дегенерировали. В отсутствии эндосперма морфогенез партеногенетических зародышей *in vitro* осуществлялся по одному из двух направлений: 1) развитие растений путем прямого эмбриогенеза; 2) образование на поверхности глобулярных проэмбрио многочисленных эмбриоидов, способных к регенерации растений. Второе направление превалировало. Культура неопыленных завязей партеногенетических форм может быть перспективным методом массового производства гаплоидных регенерантов не только у кукурузы, но и у других видов сельскохозяйственных растений.

Ключевые слова: кукуруза; партеногенез; культура неоплодотворенных завязей; *in vitro*; *in vivo*; эксплант; мегагаметофит; зародышевый мешок; проэмбрио; автономный эндосperm; яйцеклетка; центральная клетка; эндоспермогенез; эмбриогенез; эмбриоиды; гаплоидия; растения-регенеранты; морфогенез.

Введение

В настоящее время культура изолированных органов и тканей растений *in vitro* является одним из популярных способов производства гаплоидов, которые необходимы для ускоренного создания гомозиготных линий и выведения на их основе новых сортов и гибридов. Гаплоиды с материнским геномом для многих видов были получены при культивировании *in vitro* завязей и семязачатков [1; 2]. Однако для кукурузы этот метод все еще остается недостаточно разработанным. Успешных результатов удавалось достичь лишь в единичных случаях [3–6]. Эффективность культивирования может зависеть от целого ряда факторов. В многочисленных исследованиях показана определяющая роль генотипа донорных растений, типа экспланта и состава питательных сред на процессы регенерации [1]. Несомненно, это далеко не полный список.

Целью настоящей работы являлось определение факторов, влияющих на партеногенетическое развитие зародышей в стерильной культуре неопыленных завязей кукурузы линии АТ-1.

Материалы и методика исследований

Данная линия была получена в Отделе генетики и репродуктивной биологии УНЦ «Ботанический сад СГУ» (г. Саратов). Она характеризуется наследственной предрасположенностью к матроклинной гаплоидии. В неоплодотворенных зародышевых мешках

яйцеклетки могут автономно делиться и давать начало гаплоидным глобулярным проэмбрио. Количество таких яйцеклеток возрастает при увеличении сроков задержки опыления. При этом их дальнейшее развитие *in vivo* невозможно без полноценного эндосперма, который формируется только после оплодотворения центральной клетки. Эмбриологическое развитие у линии АТ-1 в некоторой степени сходно с псевдогамным апомиксисом [7].

Растения-доноры выращивали по правилам селекционной работы (делянки 4 ряда по 15–20 растений) в условиях открытого грунта на экспериментальном поле ФГБНУ РосНИИСК «РОССОРГО». Початки до появления рылец закрывали пергаментными изоляторами. В культуру вводили неопылённые завязи определенного «возраста». За «возраст завязи» принимали длительность задержки опыления с момента вымётывания рылец. Всего было апробировано 6 вариантов сроков задержки опыления: 1, 3, 5, 7, 10 и 15 суток. После удаления обёрточных листьев и пестичных нитей соцветия обрабатывали последовательно дезинфицирующими растворами: 70% этанолом (10 сек.), водным раствором (50 мг/л) натриевой соли этилмеркуртиосалициловой кислоты (7 мин.) с последующей трёхкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Использовали завязи только из средней части початка приблизительно одного размера. Питательная среда включала минеральные компоненты MS [8], витамины, агар-

агар, сахарозу (9,0%), 2,4-Д (2,0 мг/л) при уровне pH 5,8–6,1. В каждом варианте по 20–30 завязей фиксировали в ацеталголе (1:3) темпорально: непосредственно перед инокуляцией и спустя 3, 7, 14, 21, 28 суток. Цитозембриологическое исследование проводили на препаратах зародышевых мешков, выделенных из семязачатков методом ферментативной мацерации [9], а также на постоянных микротомных препаратах [10; 11], которые анализировали с помощью микроскопа «Axiostar Plus» (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что до начала культивирования завязи с задержкой опыления 1–3 суток содержали зрелые зародышевые мешки типичного строения с яйцеклеткой, двумя синергидами, центральной клеткой с двумя полярными ядрами и антиподальным комплексом из 20 и более клеток. В 5–15-суточных завязях встречались зародышевые мешки с делящимися яйцеклетками или проэмбрио. Анализ культивируемых завязей показал, что суммарный «возраст» завязей, который включает время задержки опыления до эксплантации и период культивирования, является фактором, определяющим вероятность партеногенетического развития зародышей. В некоторых зародышевых мешках присутствовали два проэмбрио. Причиной их появления могло быть формирование в зародышевом мешке дополнительных яйцеклеток, яйцеклеткоподобных синергид или независимые деления в дериватах яйцеклетки [12].

В женских гаметофитах полярные ядра оставались неслитыми вплоть до достижения завязями суммарного возраста 5–7 суток. При этом зародышевые мешки могли содержать как интактную яйцеклетку, так и 2–60 клеточный зародыш. На 7–8 сутки происходило слияние полярных ядер, а на более поздних сроках уже обнаруживались пролиферативные процессы в центральной клетке, которые приводили к образованию ценоцитов. В редких случаях отмечали фрагменты многоклеточного эндосперма. Результатом асинхронности инициации яйцеклетки и центральной клетки к автономному развитию являлось формирование трёх типов зародышевых мешков: 1) с зародышем и эндоспермом; 2) с проэмбрио и без эндосперма; 3) с эндоспермом, но без зародыша. Как ни парадоксально, но развитие эндосперма в культивируемых завязях приводило к гибели зародыша. Скорее всего, неполноценный эндосперм не только не мог служить для зародыша источником питания, но и, обволакивая его, препятствовал использованию зародышем искусственной питательной среды.

При отсутствии эндосперма процесс эмбриогенеза мог идти по одному из двух направлений: 1) зародыш прорастал и давал начало гаплоидному растению; 2) на поверхности проэмбрио формировались многочисленные эмбриониды, дающие начало гаплоидным растениям-регенерантам. Прямое прорастание зародышей происходило очень редко и, как правило, заканчивалось на стадии появления зародышевого корешка и колеоптиля. Формирование эмбрионидов наблюдали только на многоклеточных проэмбрио, которые культивировались на питательной среде не менее 7 суток. В завязях, инокулированных в «возрасте» 1–3 суток, такие зародыши формировались только через 3–4 недели культивирования, а в

15-суточных завязях – через 1 неделю (рис. 1). Таким образом, фактором определяющим способность зародышей к образованию эмбрионидов, является их суммарный возраст.

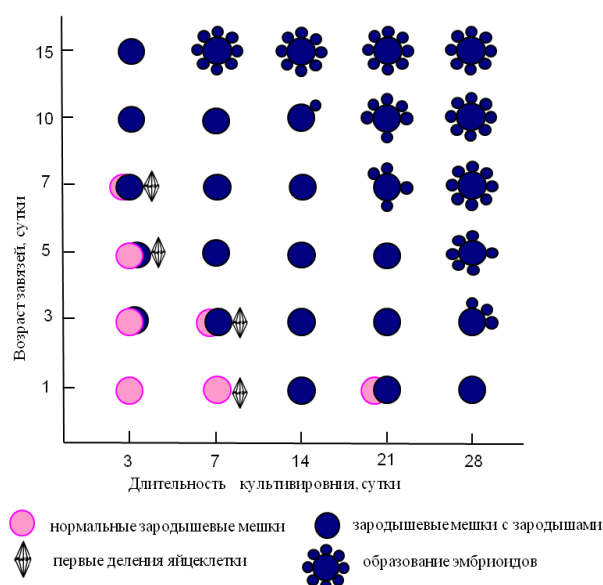


Рисунок 1 – Сроки возникновения эмбриональных структур в завязях кукурузы линии АТ-1 *in vitro*

Процесс возникновения эмбрионидов имеет сходство с соматическим эмбриоидогенезом, характерным для культуры зиготических зародышей. У кукурузы эмбриониды могут возникать либо из клеток каллуса, производного от поверхностных тканей зиготических зародышей [13–18], либо непосредственно из эпидермальных и субэпидермальных клеток щитка [19]. Несмотря на существование большого числа версий об инициалах эмбрионидов [20], вопрос их происхождения для каждого случая остаётся открытым. Нами установлено, что в субэпидермальном слое партеногенетического зародыша выделяются клетки, которые делятся периклинально, образуя комплекс. Сначала он разрастается в виде бугорка на поверхности проэмбрио (рис. 2: а), а затем отделяется от него перетяжкой (рис. 2: б).

Если клеток-инициалей появляется множество, то и при их синхронном делении возникает одновременно и множество эмбрионидов. Находясь здесь же, на поверхности материнского зародыша, эмбриониды либо прорастают, либо отпочковывают эмбриониды новых порядков. Эмбриоидогенная масса в этом случае, увеличиваясь в объёме, нередко выходила из-под лопнувшего перикарпа. Периодическая по мере необходимости пересадка эмбриоидогенных комплексов (ЭГК) на свежую питательную среду MS, содержащую 2,0% сахарозы и 2,0 мг/л 2,4-Д, позволяла поддерживать длительное время культуру регенерационноспособных эмбриоидогенных штаммов.

В ткани разросшегося зародыша было отмечено также заложение почек с элементами проводящей системы (рис. 3), но регенерации путём геммогенеза при этом не наблюдалось.

Представляет интерес тот факт, что партеногенетически возникший зародыш и в случае прямого эмбриогенеза, и эмбриоидогенеза реализовывал программу развития в сокращённом варианте: останавливался на глобулярной стадии. Его дальнейшее развитие отличалось от развития гибридных диплоид-

ных зародышей кукурузы *in vivo*. Отмечалась даже некая параллель между онтогенезом зародыша в системе завязи *in vitro* и зародыша без эндосперма у паразитных растений. Партеногенетический зародыш в условиях экзогенного питания *in vitro* претер-

певал структурные преобразования, соответствующие его условиям питания. Так, возникший при прямом эмбриогенезе зародышевый корешок несколько видоизменялся, утолщаясь и покрываясь каллусом, подобно корням растений-паразитов [21].

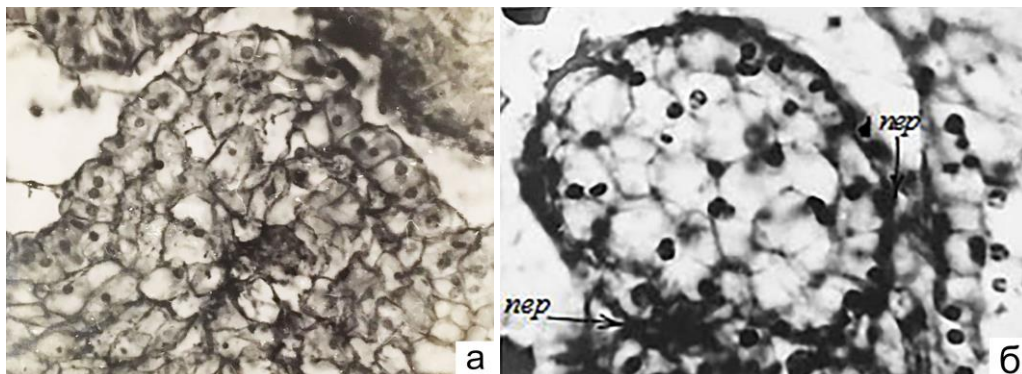


Рисунок 2 – Разные стадии формирования эмбриоидов на партеногенетическом зародыше линии кукурузы АТ-1 *in vitro*: а – стадия «бугорка»; б – появление перегородки (пер), начало обособления от ткани материнского зародыша



Рисунок 3 – Заложение почки в ткани партеногенетического проэмбрио

Такая дивергенция в развитии проэмбрио может быть объяснена большой пластичностью поведения его клеток, наличием в зародыше различных морфогенетических потенциалов.

Известно, что путь морфогенеза, реализованный в экстремальных условиях для того или иного вида растений, определяется его физиологическими, генетическими характеристиками и условиями выращивания [22]. Важную роль в этом играют и фитогормоны. Мы полагаем, что присутствие в среде ауксина 2,4-Д провоцировало активное образование эмбриоидов и блокировало формирование растений путём прямого эмбриогенеза. Уже на исходной среде эмбриоиды могли прорасти, давая начало растениям-регенерантам. Более интенсивное прорастание эмбриоидов и укоренение регенерантов происходило, если эмбриоиды переносили на свежую питательную среду, содержащую не 2,4-Д, а β-индолилуксусную кислоту (ИУК) и кинетин в равных количествах (по 1 мг/л).

Вывод

Определяющими факторами, способствующими реализации наследственной предрасположенности линии кукурузы АТ-1 к партеногенезу в культуре неопылённых завязей, являются: 1) суммарный «возраст» завязи (способность партеногенетических проэмбрио к эмбриогенезу может проявляться при

эксплантации завязей в возрасте от трёх и до 15 суток, при этом в более старых завязях эмбриогенез начинается в более ранний период культивирования *in vitro*); 2) отсутствие эндосперма в культивируемых зародышевых мешках, так как по причине своей аномальности он препятствует развитию зародыша.

Использование метода культуры неопылённых завязей для линии кукурузы АТ-1 очень перспективно, так как позволяет в короткие сроки получить в массовом количестве гаплоидные растения-регенеранты. Большое преимущество данной линии состоит в наличии у неё наследственной тенденции к партеногенезу. Это даёт основание полагать, что культура неопылённых завязей партеногенетических форм может быть перспективным методом массового производства гаплоидных регенерантов и у других видов сельскохозяйственных растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Павлова М.К. Культура неоплодотворенных завязей и семяпочек: возможности и перспективы // Сельскохозяйственная биология. 1987. № 1. С. 27–31.
2. Бугара А.М., Русина Л.В. Культура неоплодотворенных завязей и семяпочек как способ получения гаплоидных растений // Физиология и биохимия культурных растений. 1988. Т. 20, № 5. С. 419–430.
3. Truong-Andre I., Demarly Y. Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant // Z. Pflanzenzüchtg. 1984. № 92. P. 309–320.
4. Ao G.M., Zhao S.X., Li G.H. Induction of haploid plantlets from unpollinated maize ovaries in ovaries *in vitro* // Acta Genetica Sinica. 1982. Vol. 9, № 4. P. 281–283.
5. Alatorseva T.A., Tyrnov V.S. Reproducing of haploid and diploid maize forms *in vitro* // Maize Genet. Coop News. Lett. 2001. № 75. P. 55–56.
6. Tang F., Tao Y., Zhao T.Y., Wang G. *In vitro* production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*) // Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 2006. Vol. 84, Iss. 2. P. 233–237.
7. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272, № 3. С. 722–723.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Т. 15, № 3. С. 473–497.
9. Куприянов П.Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка // Выявление апомиктичных форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. С. 155–163.
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1970. 255 с.
11. Камелина О.Н., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов // *Бот. журн.* 1992. Т. 77, № 4. С. 93–96.
12. Алаторцева Т.А., Апанасова Н.В., Лобанова Л.П. Явление полиэмбрионии *in vivo* и *in vitro* у апомиктической линии кукурузы // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер.: Химия. Биология. Экология.* 2017. Т. 17, вып. 4. С. 398–405.
13. Куо С.-с., Лу В.-л. Изучение морфологии и цитологии эмбрионидов, полученных в культуре каллуса кукурузы // *Чжиу сюэ-бай. Acta. Bot. Sin.* 1984. Vol. 26, № 1. Р. 19–23.
14. Lupotto E. *In vitro* culture of isolated somatic embryos of maize (*Zea mays* L.) // *Maydica.* 1986. Vol. 31, № 2. Р. 197–201.
15. Vasil V., Vasil I.K. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. // *Plant. Physiol.* 1986. Vol. 124, № 5. Р. 399–408.
16. Wang A.S. Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos // *Plant. Cell Reports.* 1987. № 6. Р. 360–362.
17. Lupotto E., Lusardi M.C. Secondary somatic embryogenesis from regenerating plantlets of the inbred line B79 of maize (*Zea mays* L.). Switch from type 1 to type 2 callus and effect on the regenerative potential // *Maydica.* 1988. Vol. 33, № 3. Р. 167–177.
18. Van Lammeren A.A.M. Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D // *Acta. Bot. Neerl.* 1988. Vol. 37, № 1. Р. 49–61.
19. McCain J.W., Hodges T.K. Anatomy of somatic embryos from maize embryo cultures // *Bot. Gaz.* 1986. Vol. 147, № 4. Р. 453–456.
20. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // *Физиол. и биохим. культ. растений.* 2009. Т. 41, № 6. С. 495–508.
21. Терехин Э.С. Паразитные цветковые растения: эволюция онтогенез и образ жизни. Л.: Изд-во «Наука», 1977. 220 с.
22. Батыгина Т.Б., Бутенко Р.Г. Морфогенетический потенциал зародышей покрытосеменных растений (на примере рода *Paeonia* сем. *Raeoniaceae*) // *Бот. журн.* 1981. Т. 66, № 11. С. 1532–1548.

PECULIARITIES OF *IN VITRO* PARTHENOGENESIS OF UNPOLLINATED MAIZE OVARIES

© 2017

Alatortseva Tatyana Alekseevna, candidate of biological sciences, associate professor of Chair of Genetics
Saratov State University (Saratov, Russian Federation)

Abstract. The maize line AT-1 is characterized by a hereditary predisposition to parthenogenesis. The aim of this investigation is to study parthenogenetic embryo development in the culture of unpollinated ovaries *in vitro*. The unpollinated ovaries were explanted in 1, 3, 5, 7, 10, 15 days after the appearance of stigmas from ears. The nutrient medium included mineral components of MS, vitamins, sucrose (9,0%), 2,4-D (2,0 mg/l), agar-agar. The structure of megagametophytes at the time of inoculation of the ovaries and on the 3rd, 7th, 14th, 21th, 28th day of cultivation was studied. The first divisions of unfertilized egg cells were observed on the 5th–7th day after appearance of stigmas from ears, independently from whether all this time the ovaries were on the mother plant or they were inoculated into the nutrient medium. The formation of the autonomous abnormal endosperm in some cultivated ovaries was detected. The abnormal endosperm disturbed normal development of the proembryo. As a rule, the ovaries with embryo and endosperm degenerated. In the absence of endosperm, the morphogenesis of parthenogenetic proembryos was carried out in one of two directions *in vitro*: 1) development of plants by direct embryogenesis; 2) regeneration of plants from numerous embryoids, raised on the surface of globular proembryos. The second direction was prevailed. The culture of unpollinated ovaries can be a promising method of mass haploid regenerants not only in maize, but also in other types of agricultural plants.

Keywords: maize; parthenogenesis; culture of unpollinated ovaries; *in vitro*; *in vivo*; explant; megagametophyte; embryo sac; proembryo; autonomous endosperm; egg cell; central cell; endospermogenesis; embryogenesis; embryoids; haploidy; regenerative plants; morphogenesis.

УДК 582.32

Статья поступила в редакцию 26.09.2017

МОХООБРАЗНЫЕ КРАСНОСАМАРСКОГО ЛЕСНОГО МАССИВА

© 2017

Богданова Яна Андреевна, аспирант кафедры экологии, ботаники и охраны природы
Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва (г. Самара,
Российская Федерация)

Аннотация. В ходе многолетних (с 2010 по 2012 и с 2015 по 2017 гг.) исследований мохообразных из основных типов растительных сообществ Красносамарского лесного массива (Самарская область) был выявлен 51 вид из 2 отделов (Marchantiophyta и Bryophyta), 4 классов (Haplomitriopsida, Jungermannopsida, Polytrichopsida, Bryopsida), 11 порядков, 28 семейств и 39 родов. Ведущие семейства (Pylaisiaceae, Brachytheciaceae, Samarский научный вестник. 2017. Т. 6, № 4 (21)