

УДК 581.134.1

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СОДЕРЖАНИЯ КРАХМАЛА В МИКРОСПОРИАЛЬНЫХ ЭМБРИОИДАХ *IN VITRO* У ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© О.А. Сельдимирова

Проведен гистохимический анализ динамики содержания крахмала в микроспориальных эмбриоидах *in vitro* пшеницы в процессе их развития от инициальных клеток до сформированных структур. Проанализирована роль крахмала на разных этапах развития микроспориальных эмбриоидов *in vitro*.

Ключевые слова: эмбриогенез *in vitro*, крахмал, яровая мягкая пшеница.

Микроспориальный эмбриогенез – формирование в культуре *in vitro* изолированных пыльников зародышеподобной биполярной структуры (эмбриоида) из инициальной клетки – сильновакуолизированной микроспоры – отличается принципиальным сходством с эмбриогенезом *in vivo* [1]. Характерная отличительная черта – аккумуляция эмбриоидами *in vitro* значительных количеств крахмала.

Это явление рассматривается как следствие влияния условий культивирования *in vitro* [2–4] или как признак аномального развития эмбриоидов *in vitro* [5]. В то же время крахмал у злаков – основная форма запасных питательных веществ, откладываемых в эндосперме и используемых для развития проростка. Таким образом, вопрос о роли аккумуляции крахмала в процессе эмбриогенеза *in vitro* остается открытым.

Цель работы заключалась в проведении гистохимического анализа динамики содержания крахмала в микроспориальных эмбриоидах пшеницы на разных этапах их развития.

Материал и методы исследования.

Объектами исследования служили микроспориальные эмбриоиды яровой мягкой пшеницы гибридной линии Фотос. Донорные растения выращивали в полевых условиях науч-

ного стационара Института биологии Уфимского научного центра РАН (Уфимский район). В работе использовали метод культуры *in vitro* изолированных пыльников [6]. Приготовление постоянных микротомных препаратов и их окрашивание для выявления крахмала проводили согласно [7]. Постоянные препараты просматривали и фотографировали на микровизоре проходящего света μ Vizo-103 (ЛОМО ФОТОНИКА, г. Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение. Развитие эмбриоидов начинается с равного деления инициальных клеток – сильновакуолизированных микроспор. Эмбриоиды вступают в фазу бластомеризации. В результате дальнейших равных делений эмбриоиды становятся многоклеточными и имеют глобулярную форму. В ходе дальнейшего развития происходит постепенное становление полярности эмбриоидов. Фаза бластомеризации заканчивается формированием в эмбриоидах апикального и базального полюсов. Далее эмбриоиды вступают в фазу органогенеза, во время которой в эмбриоидах формируются все органы, характерные для зародышей пшеницы.

Установлено, что эмбриоиды начинают аккумулировать запасной крахмал с самых первых этапов своего развития. Так, клетки двухклеточных эмбриоидов (3–4-е сут культиви-

рования *in vitro*) уже дают положительное окрашивание на крахмал.

На 10-е сут культивирования *in vitro* крахмал содержится во всех клетках эмбриоидов, состоящих к этому времени из шести–восьми клеток (рис., а).

На 15-е сут культивирования *in vitro* крахмал также обнаруживается во всех клетках глобулярных эмбриоидов, включая и специализированную ткань – протодерму, покрывающую эмбриоиды (рис., б). Количество крахмальных зерен в клетках заметно больше по сравнению с предыдущей стадией. Обращают на себя внимание и более крупные их раз-

меры. Такая же картина сохраняется и во время становления полярности эмбриоидов, на 21-е сут культивирования *in vitro* (рис., в).

Далее эмбриоиды вступают в фазу органогенеза. В это время окрашивание срезов эмбриоидов йодом дает, помимо черного, и бурое окрашивание, что свидетельствует о присутствии в тканях декстринов – продуктов гидролиза крахмала.

В начале фазы органогенеза, на 25-е сут культивирования *in vitro*, когда начинает формироваться щиток, в клетках апикальной части эмбриоидов выявляются преимущественно декстрины, тогда как в базальной части эм-

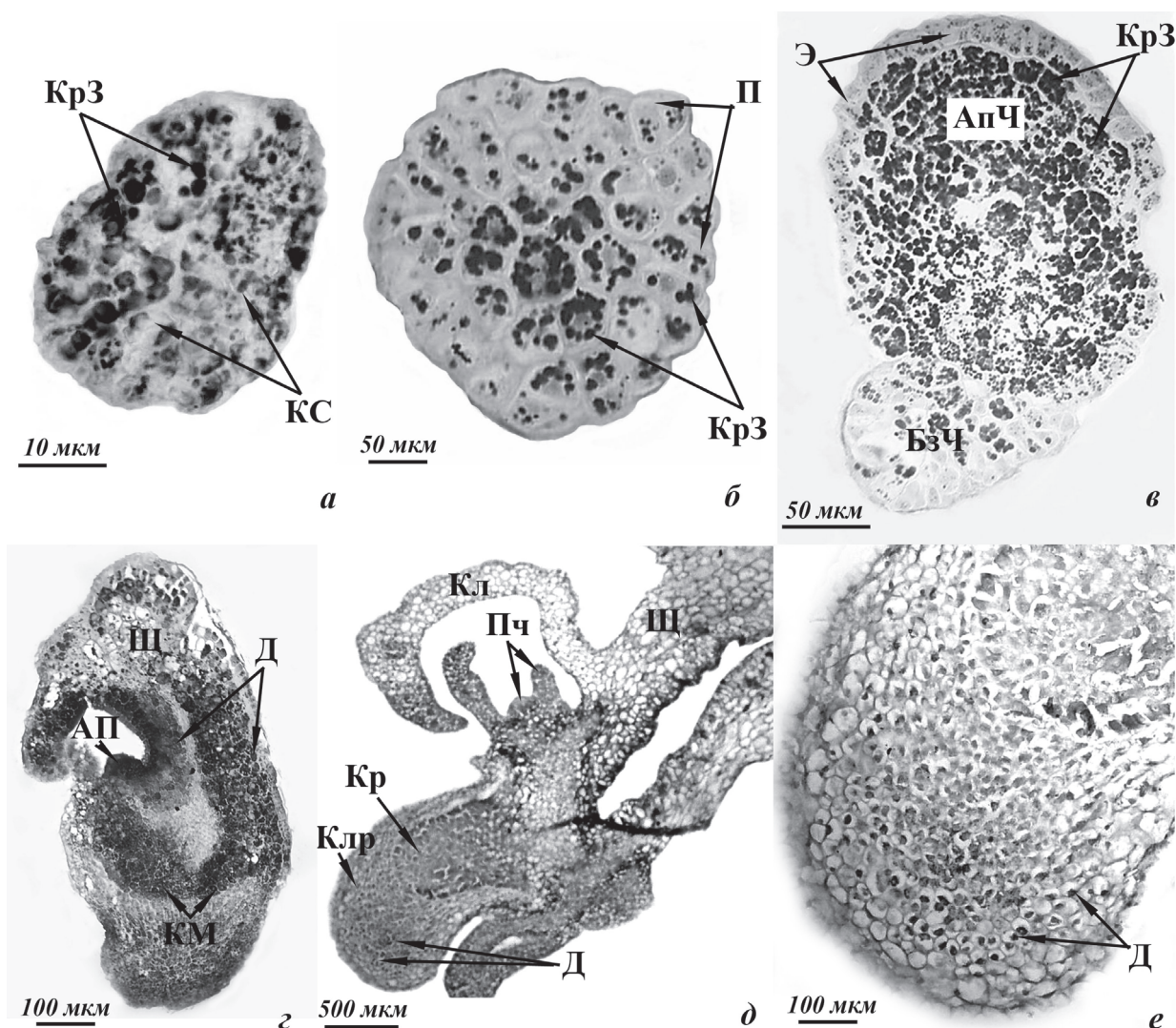


Рис. Содержание крахмала в микроспориальных эмбриоидах пшеницы. Постоянные препараты. а – 10-е; б – 15-е; в – 21-е; з – 30-е; д – 40-е сут культивирования *in vitro*; е – увеличено с д. Условные обозначения: АП – апекс побега; АпЧ – апикальная часть; БзЧ – базальная часть; Д – декстрины; Кл – coleoptиль; Клр – coleориза; КМ – корневая меристема; Кр – корень; КрЗ – крахмальные зерна; КС – клеточная стенка; П – протодерма; Пч – почка; Щ – щиток; Э – эпидермис

бриоидов выявляются остаточные количества крахмала. Это свидетельствует о том, что с началом органогенеза начинается распад крахмала в местах интенсивных клеточных делений. Несколько позднее, на 30-е сут культивирования *in vitro*, когда закладываются остальные органы эмбриоидов, реакция на крахмал при окрашивании йодом отсутствует. Преобладающее количество декстринов обнаруживается в меристематических зонах корневой меристемы, точки роста и в области щитка (рис., з).

В сформированных эмбриоидах (40-е сут культивирования *in vitro*) декстрины практически полностью исчезают. Остаточные количества декстринов обнаруживаются лишь в базальной части эмбриоидов (рис., д, е).

Таким образом, гистохимический анализ показал, что микроспориальные эмбриоиды *in vitro* аккумулируют крахмал на начальных этапах развития, во время накопления клеточной массы и формирования апикально-базальной оси. В процессе дифференциации органов эмбриоидов отмечается последующий распад этого углевода.

Некоторые авторы [3–4] объясняют интенсивное накопление крахмала в эмбриоидах условиями культивирования *in vitro*. Очень часто в состав питательных сред в качестве неотъемлемого компонента (осморегулятор и источник углерода) входит сахароза. Указанные выше авторы полагают, что избыток сахарозы может привести к усилению ее поглощения эмбриоидами и аккумуляции значительного количества крахмала в их клетках.

Как метаболит, сахароза может быть легко поглощена клетками, так как ее молекула способна без расщепления проникать через клеточные мембраны. Предполагают, что поглощение сахарозы отлично от простой диффузии и сопряжено с функционированием специфических переносчиков. Наличие активного транспорта сахарозы показано и для меристематических тканей [8]. Поглощенная сахароза может быть запасена в вакуолях или превращена в крахмал и запасена в пластидах [2].

Интересно, что зиготические зародыши *Brassica napus* L., извлеченные из семязачатка на стадии торпедо и культивируемые *in vitro* в течение двух недель на среде, содержащей сахарозу, аккумулировали крахмальные зерна таким же образом, что и микроспориальные эмбриоиды [3].

Авторы [2–4] делают вывод, что накопление крахмала в клетках эмбриоидов может быть связано с избыточной концентрацией сахарозы в питательной среде. Такая избыточность не может не оказывать воздействия на внутреннее содержимое клеток и тканевую структуру эмбриоидов.

Для устранения избыточной аккумуляции крахмала как предполагаемого результата влияния сахарозы К. Пис-Grubor с соавторами [2] предприняли попытку культивировать микроспоры *B. napus* L. на питательной среде с высоким содержанием полиэтиленгликоля в качестве осморегулятора и очень ограниченным содержанием сахарозы (0,08–0,1%) в качестве источника углерода. Было установлено, что эмбриоиды, культивируемые на питательной среде с полиэтиленгликолем, характеризовались морфологией, одинаковой с зиготическими зародышами соответствующей стадии развития. Эмбриоиды же, культивируемые на питательной среде с сахарозой, отличались от зиготических зародышей по размеру, цвету, морфологии семядолей и аккумулировали крахмал, что подтверждает зависимость этого процесса от воздействия внешних условий.

Однако при изучении соматического эмбриогенеза у двух видов ели, *Picea mariana* и *Picea glauca*, было показано, что варьирование типа углеводов и их количества в питательной среде не влияет на концентрацию эндогенного крахмала в эмбриоидах [9]. При микроразмножении хосты (*Hosta tokudama*) также было показано, что концентрация сахарозы в питательной среде не влияет на содержание крахмала в тканях [10].

В условиях *in vivo* сахароза поступает в зародыш из окружающих материнских тканей и используется наряду с другими веществами на дыхание и построение тела зародыша. Ко-

личество потребляемой сахарозы определяется созревающими семенами, представляющими собой мощные аттрагирующие центры. Состояние таких центров и определяет величину запроса семян на сахарозу, источником которой является фотосинтез. Если внешние условия не лимитируют фотосинтез, то ведущая роль в его детерминации принадлежит именно процессам новообразования и роста структур [11].

Исходя из этого, можно предположить, что аккумуляция крахмала эмбриоидами не определяется условиями культивирования *in vitro* и конкретно излишком сахарозы в среде. Скорее, она направлена на создание эмбриоидами собственных запасных фондов, которые мобилизуются в процессе их развития.

Известно, что при эмбриогенезе *in vivo* определенные точки углеводного обмена связаны с определенными этапами дифференциации эмбриональных структур. Метаболизм углеводов играет важную роль в эмбриогенезе, когда именно углеводы используются в качестве энергетического источника для клеточных делений [12]. При прорастании семян продукты расщепления крахмала быстро используются проростками на дыхание и различные синтетические процессы. Кроме того, физиологические механизмы, подготавливающие растяжение клеток при прорастании, функционируют только на фоне энергетической обеспеченности и поступления веществ из собственных запасных фондов [13–14].

Сопоставление литературных и экспериментальных данных позволяет предположить, что аккумуляция крахмала с самых первых этапов развития служит для создания энергетического ресурса, который может быть быстро востребован развивающейся структурой в надлежащий период эмбриогенеза *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбрио-

логические основы андроклинии пшеницы. М.: Наука, 2005. 99 с.

2. Ilic-Grubor K., Attree S.M., Fowke L.C. Induction of of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycole (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium // Plant Cell Rep. 1998. V.17, № 1. P. 329–333.

3. Rahman M.H. Microspore-derived embryos of *Brassica napus* L.: stress tolerance and embryo development: PhD Thesis. Calgary: University of Calgary, 1993. 220 p.

4. Yeung E.C., Rahman M.H., Thorpe T.A. Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv. Topas. I. Histodifferentiation // Intern. J. Plant Sci. 1996. V. 157, № 1. P. 27–39.

5. Canhoto J.M., Mesquita J.F., Cruz G.S. Ultrastructural changes in cotyledons of pineapple guava (*Myrtaceae*) during somatic embryogenesis // Ann Bot. 1996. V. 78, № 4. P. 513–521.

6. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. 22 с.

7. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. М.: Наука, 1979. 155 с.

8. Туркина М.В., Соколова С.В. Изучение мембранного транспорта сахарозы в растительной ткани // Физиология растений. 1972. Т. 19, №5. С. 912–919.

9. Iraqi D., Tremblay F.M. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos // Physiologia Plantarum. 2001. V. 111, №3. P. 381–388.

10. Gollagunta V., Adelberg J.W., Rieck J., Rajapakse N. Sucrose concentration in liquid media affects soluble carbohydrates, biomass and storage quality of micropropagated hosta // Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 2004. V.77, № 2. P. 125–131.

11. Полевой В.В. Физиология растений: учеб. для биол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989. 464 с.

12. Наумова Т.Н. Ультраструктурные аспекты эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 557–568.

13. Обручева Н.В., Антипова О.В. Морфология и физиология прорастания семян // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / ред. Т.Б. Батыгина. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 667–681.

14. Liu C., Xia X., Yin W., Huang L., Zhou J. Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) // Plant Cell Rep. 2006. V. 25, № 7. P. 621–628.



HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE STARCH CONTENT DYNAMICS IN MICROSPORIAL EMBRYOIDS *IN VITRO* OF SPRING WHEAT

© O.A. Seldimirova

The histochemical analysis of the starch content dynamics was conducted in wheat microsporial embryoids *in vitro* during their development from initial cells to formed structures. The role of starch in the development of microsporial embryoids *in vitro* was analysed.

Key words: embryoidogenesis *in vitro*, starch, spring wheat.