

**ОСОБЕННОСТИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У АПОМИКТИЧНОГО
Poa pratensis L.**

© 2007 г. О. И. Юдакова, Т. Н. Шакина

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012 Саратов, ул. Астраханская, д. 83

E-mail: biofac @ sgu.ru

Поступила в редакцию 27.05.05 г.
Окончательный вариант получен 15.05.06 г.

Изучены ранние стадии формирования зародыша у апомиктичного мятлика лугового *Poa pratensis* L. Установлено, что при переходе на партеногенез, по крайней мере на начальных этапах эмбриогенеза, сохраняется алгоритм развития полового зародыша. Это может быть обусловлено существованием единой для амфимиксиса и апомиксиса системы генетического контроля эмбриогенеза. Выявлена асинхронность эмбриологических процессов как в пределах соцветия (неодновременное созревание семязачатков), так и в пределах одного семязачатка и даже одного гаметофита (разное время индукции к развитию апоархеспорических инициалей и яйцеклеток). Эта особенность эмбриологии псевдогамных апомиктов позволяет им одновременно производить и половое, и апомиктичное потомство.

Ключевые слова: апомиксис, псевдогамия, партеногенез, эмбриогенез, мятлики.

Эмбриологическая картина партеногенеза у растений была описана около ста лет назад (Strassburger, 1905; Rosenberg, 1907). Одним из основных объектов изучения закономерностей данного явления долгие годы был и до сих пор остается мятлик, в особенности *Poa pratensis* L. (Müntzing, 1933; Kiellander, 1941; Akerberg, 1943; Gustafsson, 1946, 1947a, b; Nielsen, 1946a, b, 1974; Nygren, 1950, 1951; Gustafsson, Gadd, 1965; Жиров, 1969; Кордюм, 1970; Батыгина, Фрейберг, 1979; Naumova et al., 1992, 1993; Кутлунина, Мальцев, 1994; Шишкинская и др., 1994; Кутлунина, 2001; Albertini et al., 2002). Однако до сих пор автономное развитие зародыша скрывает в себе много тайн. К числу вопросов, на которые нет убедительных ответов, можно отнести следующие: 1) на какой стадии (дифференцировки, специализации и др.) женская гамета выбирает апомиктичный путь развития; 2) имеет ли партеногенетический зародыш свой алгоритм морфогенеза; 3) в какой степени соответствуют развитие партеногенетического и полового зародышей.

С использованием ускоренных методов цитоэмбриологического анализа мы изучили ранние этапы эмбриогенеза у псевдогамного апомикта *Poa pratensis* L. Особое внимание уделяли ориентации клеточных стенок и последовательности первых делений проэмбрио.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом исследования служила факультативно апомиктичная популяция *Poa pratensis* L., произрастающая на территории г. Саратова. Фиксацию соцветий проводили ацетоалкоголем (3:1) темпорально: на ранних стадиях развития цветка, когда в пыльниках присутствовали микроспоры и двухклеточная пыльца; в фазе раскрытия цветка и через 1, 2, 3 сут от начала цветения. Для выделения целых зародышевых мешков использовали методику ферментативной мацерации завязей с последующей диссекцией семязачатков (Куприянов, 1978). На классических микротомных препаратах определить взаимное расположение клеточных перегородок в зародышах можно, только сопоставляя картины деления в трансверсальном, дорсовентральном и билатеральном сечениях. Использованная нами методика выделения целых зародышевых мешков позволила изучить структуру каждого зародыша одновременно в нескольких плоскостях. В ходе исследования из 440 семязачатков было выделено 532 зародышевых мешка. Ранние стадии эмбриогенеза отмечены в 249 мегагаметофитах, часть из которых содержала по два зародыша. Всего проанализирован 261 зародыш.

Фотографии сделаны с помощью цифровой камеры-окуляра DCM35 ("SCOPETEK", Китай).

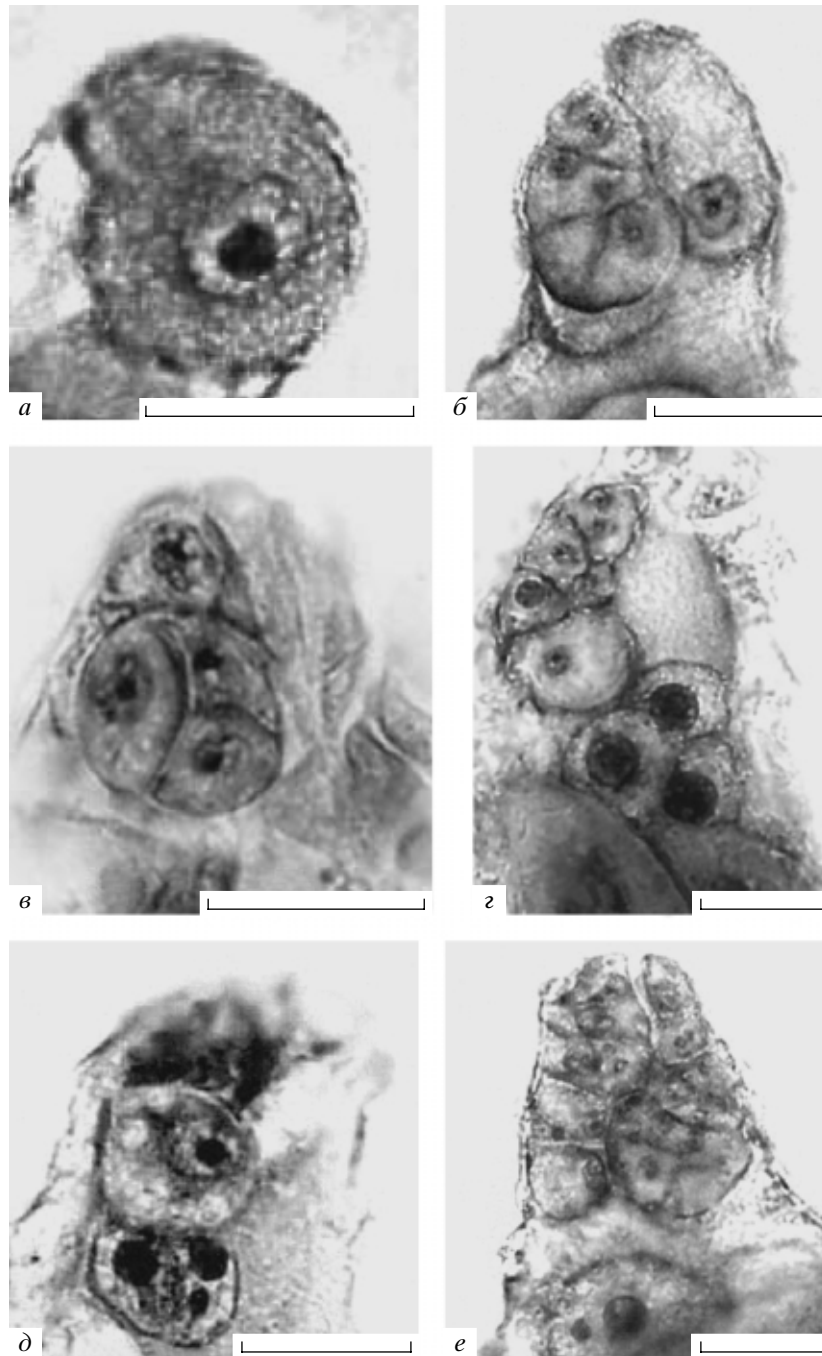


Рис. 1. Автономный эмбриогенез у *Poa pratensis*: *a* – активизированная к партеногенетическому развитию яйцеклетка; *б* – пятиклеточный проэмбрио и интактная яйцеклетка; *в, г* – партеногенетические проэмбрио с неправильным заложением клеточных перегородок; *д* – дегенерация базальной клетки в двухклеточном проэмбрио; *е* – два автономных зародыша. Масштаб: 0.02 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ материала показал, что основным способом воспроизведения изученной популяции является факультативный апомиксис на базе апоархеспории¹,

¹ Мы используем термин, предложенный Хохловым (1967), который, на наш взгляд, более точно отражает сущность данного явления, хотя в зарубежной и отечественной литературе чаще употребляют термин “апоспория”.

при которой нередуцированные зародышевые мешки развиваются из соматических клеток семязачатка. Число мегagamетофитов в разных семязачатках варьирует от 1 до 5 и более. Наряду с образованием нередуцированных зародышевых мешков возможно параллельное формирование эуспорических (редуцированных) гаметофитов. И те и другие имеют типичное для злаков строение.

Партеногенетическое развитие зародыша (рис. 1) начинается, как правило, в бутоне за 1 сут до начала цветения, тогда как образование эндосперма происходит только после оплодотворения центральной клетки примерно через 1 сут после опыления, т.е. имеет место псевдогамия.

Активизация яйцеклетки к делению сопровождается изменением ее морфологии: клетка приобретает более округлую форму, исчезает микропиллярная вакуоль, ядро занимает центральное положение (рис. 1, а). Как это свойственно клеткам, находящимся на стадии профазы митоза, в ядре становятся видимыми нити хроматина.

В соцветии семязачатки развиваются асинхронно. В связи с этим к началу цветения в некоторых зародышевых мешках все еще присутствуют неподелившиеся яйцеклетки. При формировании в одном семязачатке нескольких мегагаметофитов к моменту опыления они также могут находиться на разных стадиях развития. Так, в разгар цветения в части семязачатков (6.4%) рядом с зародышевым мешком, в котором протекает автономный эмбриогенез, располагается мегагаметофит с интактной яйцеклеткой, а в единичных случаях – двух- или четырехъядерный зародышевый мешок.

Более того, даже в пределах одного мегагаметофита эмбриологические процессы не всегда синхронизированы. В случае образования в зародышевом мешке вместо синергид дополнительных яйцеклеток последние могут одновременно приступить к партеногенетическому развитию. Об этом свидетельствует наличие в мегагаметофите двух или трех проэмбрио, отличающихся друг от друга размером и числом составляющих их клеток, а также присутствие рядом с зародышами интактных яйцеклеток (рис. 1, б).

Таким образом, вследствие асинхронности различных процессов, протекающих в генеративной сфере, к началу цветения в соцветии остается небольшая часть женских гамет, которая способна в случае оплодотворения сформировать зиготический (половой) зародыш (рис. 2). Сочетание разных способов репродукции возможно не только в пределах одного растения, но и внутри одного семязачатка. Мы наблюдали ситуацию, когда в двух соседних зародышевых мешках одного семязачатка реализовались разные варианты развития как зародыша, так и эндосперма. В зародышевом мешке, где к моменту проникновения пыльцевой трубки уже присутствовал партеногенетический проэмбрио, оба спермия приняли участие в оплодотворении центральной клетки (рис. 3). Полярные ядра здесь были слившимися. В другом зародышевом мешке имело место двойное оплодотворение: была отчетливо видна зрелая зигота и спермий в одном из неслившихся полярных ядер.

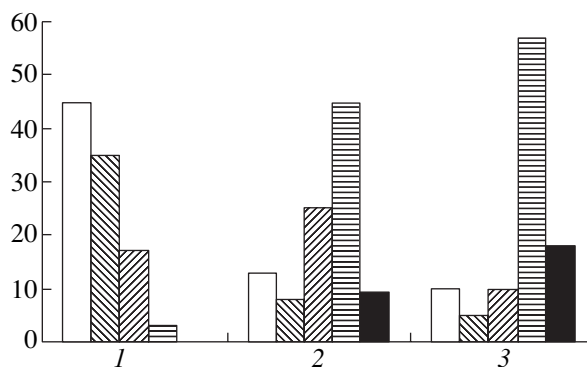


Рис. 2. Соотношение зародышевых мешков с разными стадиями партеногенетического развития в одном соцветии *Poa pratensis*.

По оси абсцисс: 1 – зрелые бутоны; 2, 3 – через 1 и 2 сут после начала цветения соответственно. По оси ординат – количество зародышевых мешков, %.

Стадии развития: (□) – яйцеклетки; проэмбрио: (▨) – 2–8-клеточные, (▩) – 9–16-клеточные, (▧) – 17–32-клеточные, (■) – >32 клеток.

Ряд фактов указывает и на возможность одновременного формирования партеногенетического и зиготического зародышей внутри одного мегагаметофита. Как отмечалось ранее, к моменту опыления в некоторых зародышевых мешках (2.2%) рядом с автономным проэмбрио располагались интактные дополнительные яйцеклетки. Через 1 сут от начала цветения мы наблюдали случаи контакта спермиев с подобными яйцеклетками.

Асинхронность эмбриологических процессов (разное время созревания семязачатков и начала митоза) является, на наш взгляд, одним из механизмов, позволяющих популяции одновременно производить и половое, и апомиктичное потомство. Сочетание разных способов воспроизведения дает возможность, с одной стороны, сохранять исходные генотипы материнских растений, а с другой, за счет рекомбинации и оплодотворения создавать новые генетические комбинации. Огромный адаптивный потенциал факультативных апомиктов многие исследователи связывают именно с их способностью использовать преимущества разных способов репродукции (Петров, 1979, 1988; Грант, 1984).

Развитие зиготических зародышей у злаков осуществляется согласно особому, присущему только данной таксономической группе, типу Graminad. Он характеризуется заложением наклонных (“косых”) перегородок по отношению к продольной оси зародыша. В результате уже на самых ранних стадиях развития проэмбрио имеет дорсовентральное строение (Батыгина, 1997). Проведенное исследование показало, что ранние

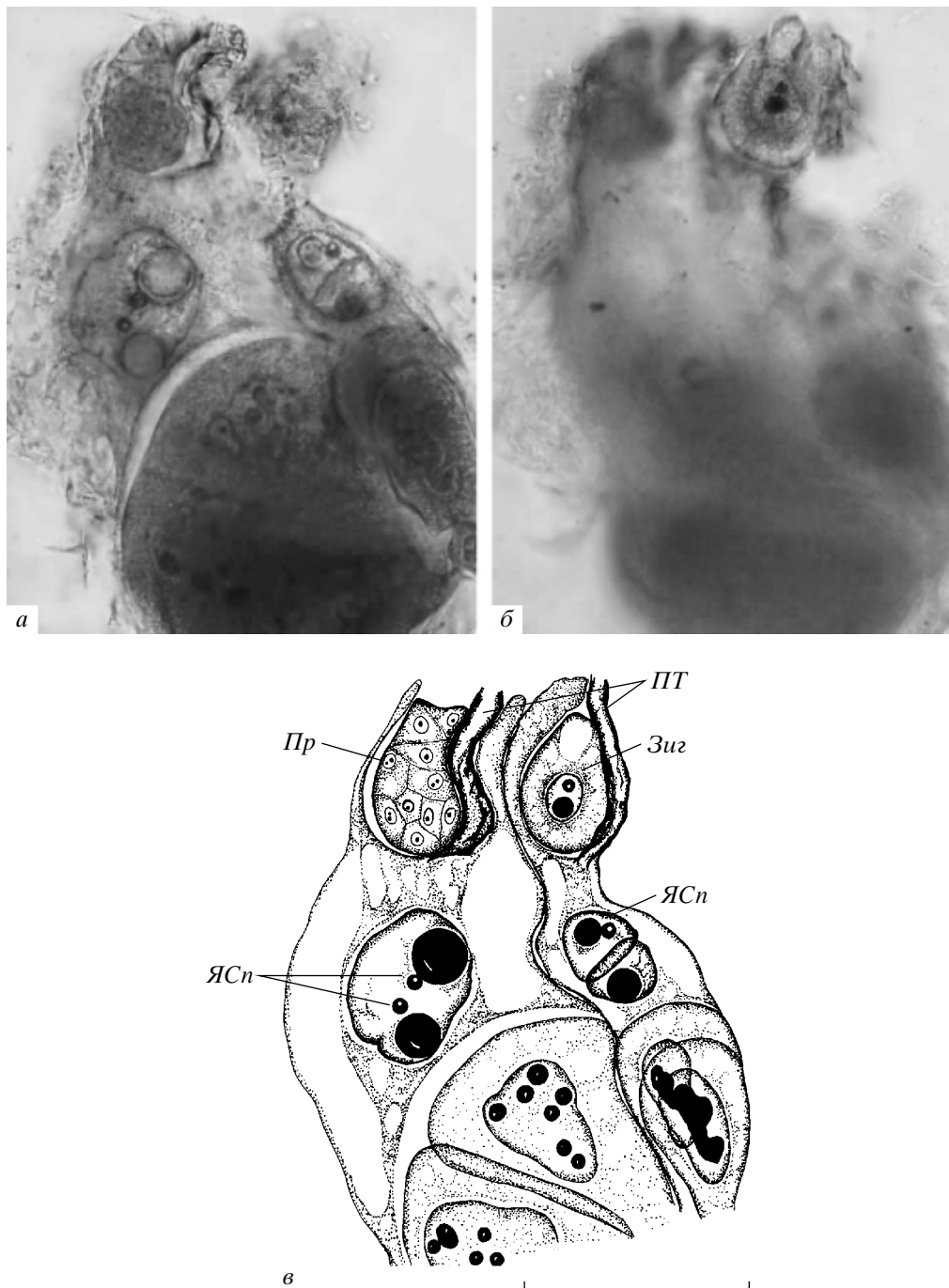


Рис. 3. Разные варианты развития зародыша и эндосперма в двух соседних зародышевых мешках из одного семязачатка *Poa pratensis*: *a, б* – фотографии одного препарата, сделанные в разных плоскостях; *в* – реконструкция зародышевых мешков. *Пр* – проэмбрио; *ПТ* – пыльцевая трубка, *Зиг* – зигота, *ЯСп* – ядра спермиев. Масштаб: 0.05 мм

этапы эмбриогенеза партеногенетических зародышей мятлика лугового, как правило, проходили строго в соответствии с типом Graminad. В то же время встречались зародыши (9.5%) с нарушением последовательности клеточных делений или неправильным заложением клеточных перегородок (рис. 1, *в, г*).

В ходе первого деления яйцеклетки фрагмопласт иногда закладывался не наклонно, а горизонтально (1.9%) или вертикально (0.4%). Аналогичные аномалии сопровождали и последующие деления клеток проэмбрио.

В норме у злаков зигота делится на две клетки неравного размера: меньшую апикальную (*ca*) и

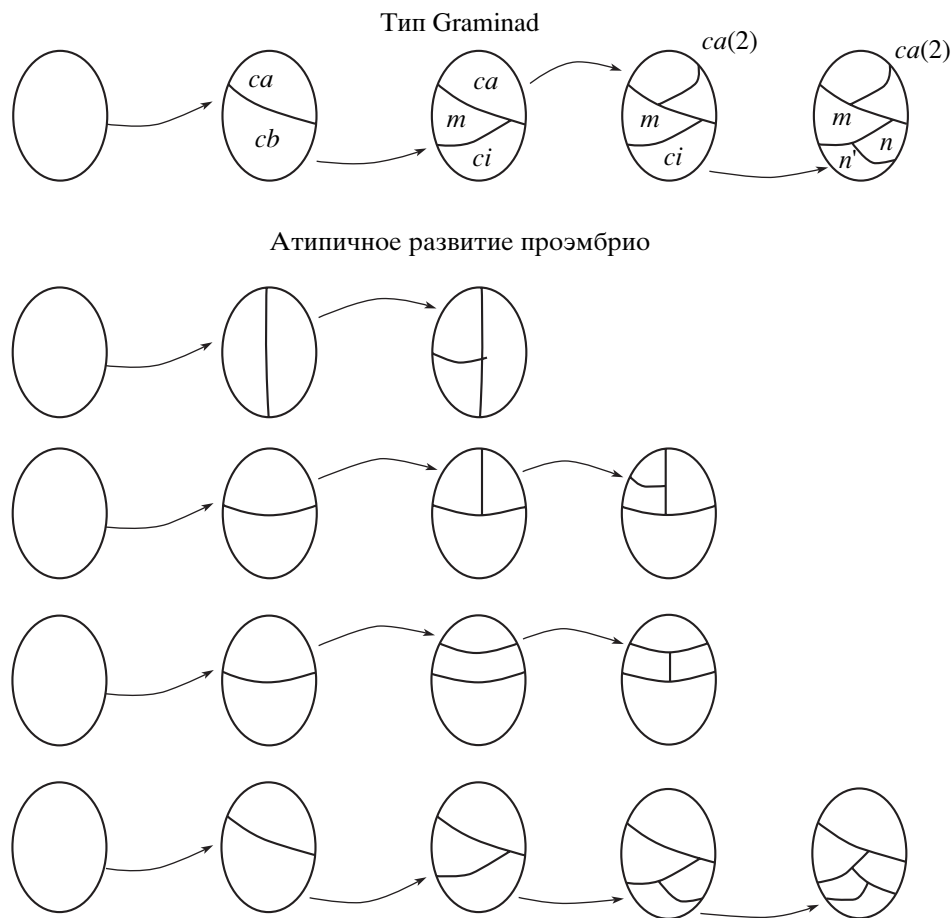


Рис. 4. Последовательные стадии развития раннего проэмбрио *Poa pratensis* в дорсовентральной проекции.

большую базальную (*cb*). Второе деление происходит в базальной клетке с образованием клеток *m* и *ci*, третье – в апикальной, а четвертое – в клетке *ci*. Судя по морфологии некоторых партеногенетических зародышей (6.1%), последовательность клеточных делений при их формировании была иной. Так, второй митоз нередко проходил не в базальной, а в апикальной клетке (рис. 1, в). В то же время у одного зародыша апикальная клетка оставалась поделенной вплоть до четвертого деления (рис. 1, г). Нарушение последовательности делений часто сопровождалось и аномальным заложением межклеточных перегородок (рис. 4).

Эти аномалии, несомненно, являются результатом нарушения сложных морфогенетических процессов, идущих в яйцеклетке. Тем не менее практически все нетипичные зародыши выглядели вполне жизнеспособными. Лишь в одном двухклеточном проэмбрио с горизонтальным положением межклеточной перегородки наблюдалась гибель базальной клетки (рис. 1, д). Однако, несмотря на отсутствие у большинства аномальных зародышей видимых признаков дегенерации,

трудно сказать, насколько они будут в дальнейшем жизнеспособны и сможет ли из них сформироваться полноценное потомство. Известно, что нарушение заложения первых перегородок у соматических зародышей *Triticum aestivum* L. приводит к аномальному гистогенезу и последующей гибели эмбриоидов (Батыгина, Васильева, 2002).

У 16–32-клеточных зародышей мятлика лугового нетипичная форма была вызвана, скорее, механическими, а не генетическими причинами. При развитии нескольких зародышевых мешков в семязачатке зародыш в одном из них оказывался буквально сдавленным с обеих сторон соседними гаметофитами. В результате вместо глобулярной он имел треугольную или неправильную форму. Аналогичная ситуация наблюдалась и при развитии в одном зародышевом мешке нескольких зародышей (рис. 1, е).

Разбалансированность генетической системы апомиктов неоднократно обсуждалась ранее (Хохлов, 1970; Shishkinskaya, 1991; Шишкинская, 1994), и в последние годы эта идея становится все более популярной. Согласно одной из гипотез, апомиксис рассматривается как результат гете-

рохронной или асинхронной экспрессии генов, контролирующих разные стадии развития женского гаметофита (Grimanelli et al., 2003). Наблюдаемая у *Poa pratensis* асинхронность эмбриологических процессов, на наш взгляд, также является отражением гетерохронной экспрессии генов, контролирующих гаметофито-, гамето- и эмбриогенез. Нетипичное положение клеточных перегородок у партеногенетических проэмбрио может быть обусловлено преждевременной экспрессией генов эмбрионального развития, когда в яйцеклетке еще не завершились сложные морфогенетические процессы, в ходе которых формируется ось будущего зародыша.

Анализ полученных результатов позволяет ответить на некоторые вопросы, поставленные в статье. С уверенностью можно говорить, что при переходе на партеногенез не устанавливается новый, отличный от полового, алгоритм развития зародыша, по крайней мере на ранних этапах эмбриогенеза. Скорее всего, это объясняется тем, что существует одна система генетического контроля эмбриогенеза, единая для апомиксиса и амфимиксиса. В случае партеногенеза работают те же гены, которые контролируют развитие зиготического зародыша, но по каким-то причинам их экспрессия начинается преждевременно, до оплодотворения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 528–539.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. 230 с.
- Батыгина Т.Б., Фрейберг Т.Е. Полиэмбриония у *Poa pratensis* L. // Ботан. журн. 1979. № 6. С. 793–804.
- Грант В. Видообразование у растений. М.: Мир, 1984. С. 393–436.
- Жиров Е.Г. Некоторые генетические аспекты апомиксиса у мятлика // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. 1969. Вып. 1. № 5. С. 76–85.
- Кордюм Е.Л. Апомиксис в роде *Poa* L. // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С. 141–149.
- Куприянов П.Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка // Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1978. С. 155–163.
- Кутлунина Н.А. Эмбриологическое изучение апомиксиса и полиэмбрионии у мятлика лугового // Итоги интродукции и селекции травянистых растений на Урале. Екатеринбург: Изд-во УрГУ, 2001. С. 197–214.
- Кутлунина Н.А., Мальцев А.В. Сравнительное изучение апомиксиса у низовых злаков // Тр. междунар. симпозиума “Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований”. Саратов, 1994. С. 92–94.
- Петров Д.Ф. Генетические основы апомиксиса. Новосибирск: Наука, 1979. 276 с.
- Петров Д.Ф. Апомиксис в природе и опыте. Новосибирск: Наука, 1988. 211 с.
- Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений // Успехи современной генетики. М.: Наука, 1967. С. 43–105.
- Хохлов С.С. Эволюционно-генетические проблемы апомиксиса у покрытосеменных растений // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С. 7–21.
- Шишкинская Н.А. О генетическом контроле апомиксиса у растений // Генетика. 1994. Т. 30 (приложение). С. 184.
- Шишкинская Н.А., Савина Т.А., Синегубова Ю.В. Апомиксис у мятликов Камчатки // Тр. междунар. симпозиума “Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований”. Саратов, 1994. С. 157–159.
- Akerberg E. Further studies of the embryo and endosperm development in *Poa pratensis* // Hereditas. 1943. V. 29. P. 199–201.
- Albertini E., Barcaccia A., Marconi G., Falcinelli M. Looking for candidate genes for apospory and parthenogenesis in the facultative apomict Kentucky bluegrass (*P. pratensis* L.) // Abstr. XVIIth Int. Congr. Sex. Plant Reprod. Lublin, 2002. P. 21.
- Grimanelli D., Garcia M., Kaszas E. et al. Heterochronic expression of sexual reproductive programs during apomictic development in *Tripsacum* // Genetics. 2003. V. 165. P. 1521–1531.
- Gustafsson A. Apomixis in higher plants. Part I // Lunds Univ. Arsskr. N. F. 1946. V. 42. № 3. P. 1–67.
- Gustafsson A. Apomixis in higher plants. Part II // Ibid. 1947a. V. 43. № 2. P. 69–179.
- Gustafsson A. Apomixis in higher plants. Part III // Ibid. 1947b. V. 43. № 12. P. 181–370.
- Gustafsson A., Gadd I. Mutations and crop improvement. IV. *Poa pratensis* L. (Gramineae) // Hereditas. 1965. V. 53. № 1–2. P. 90–102.
- Kiellander C. Studies on apospory in *Poa pratensis* var. *alpigena* // Svensk. Bot. Tidskr. 1941. V. 35. № 2–3. P. 321–332.
- Muntzing A. Apomictic and sexual seed formation in *Poa* // Hereditas. 1933. V. 17. № 2. P. 131–154.
- Naumova T., den Nijs A.P.M., Willemse M.T.M. Cytological approach to characterize apomixis in *Poa pratensis* genotypes // Apomixis Newsletter. 1992. № 4. P. 31–34.
- Naumova T., den Nijs A.P.M., Willemse M.T.M. Quantitative analysis of aposporous parthenogenesis in *Poa pratensis* genotypes // Acta. Bot. Neerl. 1993. V. 42. № 3. P. 299–312.
- Nielsen E.L. The origin of multiple macrogametophytes in *Poa pratensis* // Bot. Gaz. 1946a. V. 108. № 1. P. 41–50.
- Nielsen E.L. Developmental sequence of embryo and endosperm in apomictic and sexual forms of *Poa pratensis* // Ibid. 1946b. V. 108. № 4. P. 26–40.

- Nielsen E.L. Genetik variation in holt engrapp (*Poa pratensis* v. *alpigena*) // Forsk. Fors. Landbr. 1974. V. 25. № 1. P. 1–11.
- Nygren A. Cytological and embryological studies in arctic Poae // Symb. Bot. Upsal. 1950. V. 10. № 4. P. 1–64.
- Nygren A. Embryology of *Poa* // Carnegie Inst. Wash. 1951. № 50. P. 113–115.
- Rosenberg O. Cytological studies on the apogamy in *Hieracium* // Bot. Tidskr. 1907. № 28. P. 358–368.
- Shishkinskaya N.A. Non-traditional view on apomixis // Apomixis Newsletter. 1991. № 3. P. 34–36.
- Strassburger E. Apogamie der Eualchemillen und allgemeine Gesichtspunkte die sich aus ihr ergeben // Jahrb. Wiss. Bot. 1905. Bd. 4. № 1. S. 88–164.

Specific Features of Early Embryogenesis in Apomictic *Poa pratensis* L.

O. I. Yudakova and T. N. Shakina

Saratov State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia

E-mail: biofac@sgu.ru

Abstract—We studied the early stages of embryo formation in apomictic *Poa pratensis* L. It was shown that during transition to parthenogenesis, at least at the initial stages of embryogenesis, the algorithm of development of the sexual embryo is preserved. This could be due to the system of genetic control of embryogenesis, common for amphimixis and apomixis. We described asynchrony of developmental processes both within the efflorescence (asynchronous maturation of ovules) and within the ovule and even gametophyte (different timing of induction of apoarchesporic initials and oospores). This feature of pseudogamous apomicts allows them to produce simultaneously both sexual and apomictic progenies.

Key words: apomixes, pseudogamy, parthenogenesis, embryogenesis, *Poa pratensis*.