

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ
РАСТЕНИЙ

УДК 58.085:581.143.6:581.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ
ФОРМИРУЮЩИХСЯ МИКРОСПОРИАЛЬНЫХ ЭМБРИОИДОВ *IN VITRO*
И ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VIVO*
ПШЕНИЦЫ КАК ОСНОВА ПОНИМАНИЯ
ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ИХ РАЗВИТИЯ

© 2017 г. О. А. Сельдимирова^{a,*}, Н. Н. Круглова^a, Г. Е. Титова^{b,c}, Т. Б. Батыгина^{b,c}

^aУфимский Институт биологии РАН
450054, Уфа, пр. Октября, 69

^bБотанический институт им. В.Л. Комарова РАН
197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 2

^cСанкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

*E-mail: o_seldimirova@mail.ru

Поступила в редакцию 06.10.2016 г.

Проведен сравнительный ультраструктурный анализ развития микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* у яровой мягкой пшеницы. Наряду со сходством ультраструктурных характеристик клеток эмбриоидов и зародышей на соответствующих фазах развития, выявлены и их различия. В отличие от зародышей, клеткам эмбриоидов свойственно наличие липидных включений и многочисленных митохондрий (с хорошо развитой системой внутренних мембран). Предполагается, что липиды являются альтернативным источником энергии, необходимым для осуществления активных клеточных делений в формирующихся эмбриоидах. Также для клеток эмбриоидов (в отличие от зародышей) характерна аккумуляция значительного количества крахмала с самых первых стадий развития и последующая утилизация этого углевода в процессе органогенеза и прорастания. Сделан вывод о создании клетками эмбриоидов собственных резервных фондов углеводов, мобилизуемых в процессе развития. Рассмотрены перспективы использования микроспориального эмбриоидогенеза *in vitro* в качестве модели для изучения цитофизиологических аспектов зиготического эмбриогенеза *in vivo*. Подтверждена концепция Т.Б. Батыгиной (1987, 1997, 2014) об универсальности процессов морфогенеза растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro*.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., микроспора, эмбриоидогенез *in vitro*, эмбриогенез *in vivo*, ультраструктура клеток, резервные крахмал и липиды

DOI: 10.7868/S0475145017030119

ВВЕДЕНИЕ

Андроклиния (андрогенез *in vitro*) – нетрадиционная система размножения, имеющая свои параллели и аналоги с другими системами размножения растений. Биологический феномен андроклинии состоит в переключении морфогенетической программы развития гаплоидных клеток пыльника под действием внешнего стрессового фактора с обычного гаметофитного пути, связанного с образованием пыльцевого зерна, на иной путь – спорофитный, ведущий к формированию гаплоидного растения-регенеранта; при этом клетки реализуют свой потенциал различными путями морфогенеза *in vitro* (Круглова и др., 2005; Seguí-Simarro, Nuez, 2008; Seguí-Simarro, 2010, 2016; Батыгина и др., 2010; Batygina, 2011; Батыгина, 2014; Сельдимирова, Круглова, 2014 и др.). Один из таких путей спо-

рофитного развития гаплоидных клеток пыльника – микроспориальный эмбриоидогенез, представляющий собой формирование эмбриоида (биполярной зародышеподобной структуры) непосредственно из инициальной клетки – сильно вакуолизированной микроспоры.

Различные аспекты микроспориального эмбриоидогенеза *in vitro*, в том числе у пшеницы, достаточно изучены (Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010; Seguí-Simarro, 2010; Soriano et al., 2013; Сельдимирова, Круглова, 2014). Хорошо установлено сходство в прохождении основных стадий развития микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* у пшеницы (Сельдимирова и др., 2004; Круглова и др., 2005; Батыгина и др., 2010). Имеются достаточно подробные данные ультраструктурного анализа раз-

вития зародыша пшеницы (HrSel et al., 1961; Smart, O'Brien, 1983; Чабан, 1986; Банникова и др., 1991; Naumova, Matzk, 1998). Процесс же микроспориального эмбриоидогенеза исследован в этом отношении лишь на самых начальных стадиях — в связи с выявлением механизма переключения программы развития инициальной клетки эмбриоида — микроспоры — с гаметофитной на спорофитную, при этом исследования проведены главным образом на других представителях семейства злаков (Carreda et al., 2000; Ramirez et al., 2001; Testillano et al., 2002; González-Melendi et al., 2005; Góralski et al., 2005; Maraschin et al., 2005; Pulido et al., 2006) и только одна работа посвящена пшенице (Bonet, Olmedilla, 2000). В целом, детальный сравнительный ультраструктурный анализ клеток на всех фазах микроспориального эмбриоидогенеза и зиготического эмбриоидогенеза пшеницы не проводился. В то же время, именно такой анализ позволяет связать структурные характеристики клеток с их физиолого-биохимическим статусом.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в сравнительном ультраструктурном анализе развивающихся клеток микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo* пшеницы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), с привлечением данных световой микроскопии (СМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужила яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) гибридной линии Фотос, характеризующейся высокой частотой образования эмбриоидов в культуре *in vitro* пыльников. Донорные растения выращивали в полевых условиях научного стационара УИБ РАН (Уфимский р-н).

Эмбриоиды получали методом культуры *in vitro* пыльников пшеницы (Круглова, Батыгина, 2002) с использованием индукционной питательной среды Potato II (Chuang, Quyang, 1978), дополненной 0.2 мг/л кинетина и 0.1 мг/л 2,4-Д, и культивировали на свету до появления проростков. Зародыши *in vivo* получали путем искусственного опыления в полевых условиях.

Для светооптических исследований образцы фиксировали в смеси FAA (Berlin, Miksche, 1976), давленные препараты, окрашенные ацетокармином, и постоянные препараты, окрашенные 1%-м раствором йода в 0.5%-м растворе йодистого калия или с помощью реакции Шифф-йодная кислота, готовили согласно (Круглова и др., 2013). Для исследования методом ТЭМ образцы готовили согласно (Electron Microscopy ..., 1999). Для этого образцы фиксировали в 2.5%-м растворе глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере, постфиксировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия на том же буфере с добавлением 25 мг/мл сахарозы, обезвоживали с использова-

нием этилового спирта, ацетона и окиси пропилена и заключали в эпоксидную смолу с использованием набора для заливки EMBED 812 (EMS, США). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме 8800 Ultratome (LKB Bromma, Швеция) и контрастировали насыщенными водными растворами уранилацетата и цитрата свинца. Срезы анализировали с помощью электронного микроскопа JEM-1200 EX (JEOL, Япония). Использовали периодизацию эмбриоидогенеза (Батыгина, 1987, 1997) и эмбриоидогенеза (Круглова и др., 2005) пшеницы, а также периодизацию развития пыльника пшеницы (Круглова, 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ультраструктурные характеристики микроспориальных эмбриоидов *in vitro*. В момент инокуляции на индукционную питательную среду пыльники содержали сильновакуолизированные микроспоры (по периодизации: Круглова, 1999), характеризующиеся четко выраженной полярностью: ядро располагается на стороне, противоположной поре прорастания, при этом центральное положение в клетке занимает крупная вакуоль (рис. 1а).

Согласно данным ультраструктурного анализа, сильновакуолизированные микроспоры покрыты оболочкой, при этом ее слои четко выражены (рис. 1б). Ядро содержит ядрышко и конденсированный хроматин (рис. 1а, 1б). Вакуоль электронопрозрачна, содержит хлопьевидное вещество (рис. 1б, 1г, 1д). Цитоплазма электроноплотная, что обуславливается наличием в ней большого количества как свободных, так и связанных в группы рибосом (рис. 1б–1д). В цитоплазме содержатся каналы эндоплазматического ретикулума (ЭПР) (рис. 1в). Митохондрии крупные, округлые или овальные, очень редко с незначительно развитыми кристами (рис. 1в–1д). Пластиды содержат одиночные тилакоиды (рис. 1д) и 1–3 крахмальных зерна (на рисунке не приведены). В цитоплазме также присутствуют малоактивные цистерны комплекса Гольджи (рис. 1г), липидные капли и разнообразные везикулы (на рисунке не приведены).

Через 3 сут культивирования структура микроспор претерпевает изменения. Ядро, постепенно смещающееся в центральное положение, содержит ядрышко с несколькими вакуолями и конденсированный хроматин (рис. 1е, 1ж). Вакуоль фрагментируется за счет формирования цитоплазматических тяжей, соединяющих перинуклеарную и периферическую цитоплазму (рис. 1е, 1ж). В итоге вместо одной крупной вакуоли формируется несколько мелких, более или менее равномерно распределенных по всему объему клетки (рис. 1ж–1и). Такие изменения сопровождаются утратой микроспорой полярной организации.

Ультраструктурные характеристики деполаризованных микроспор в целом совпадают с таковыми у сильновакуолизированных поляризованных

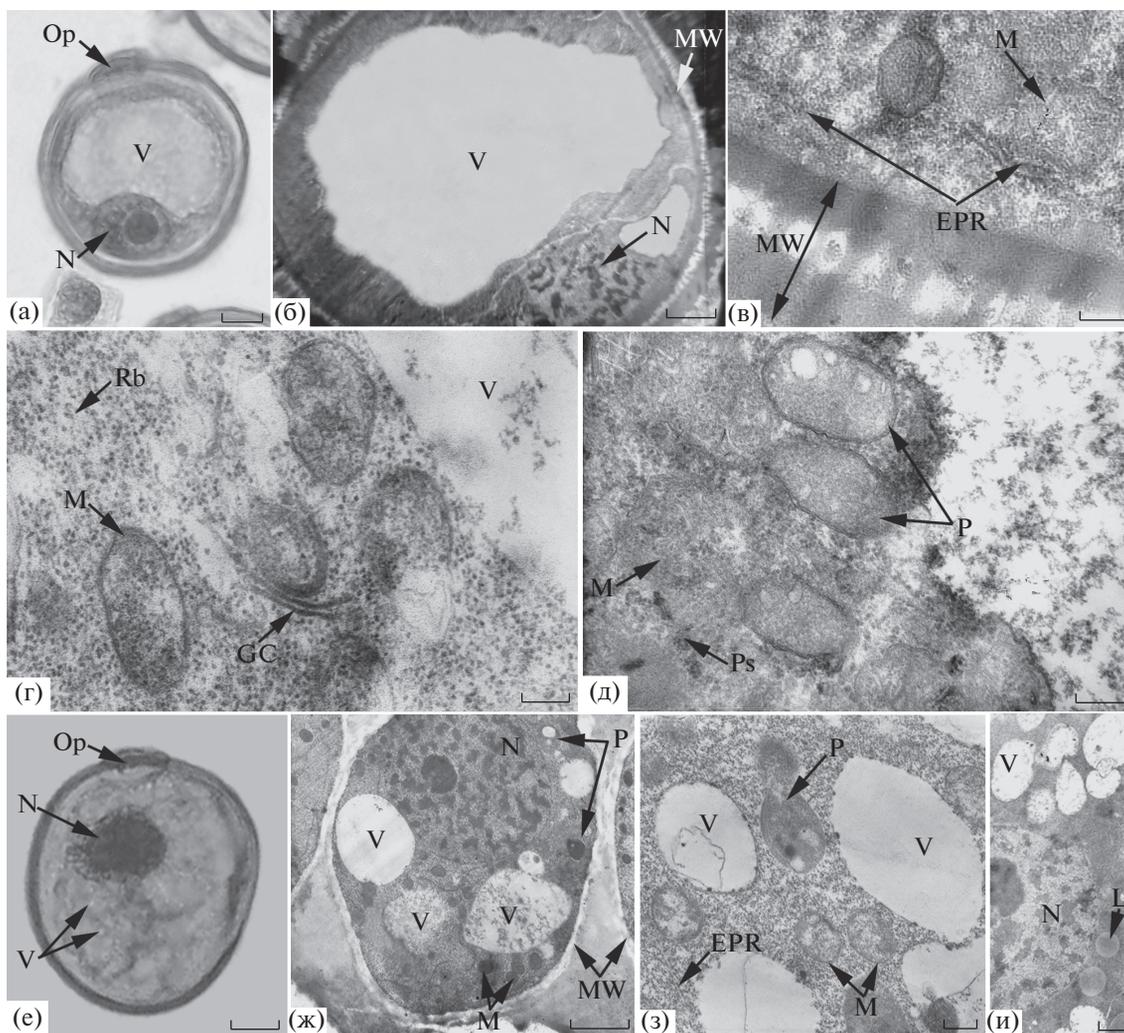


Рис. 1. Инициальная клетка эмбриоида. (а) – инициальная клетка эмбриоида – сильновакуолизированная микроспора с выраженной полярностью; (б–д) – ультраструктурные особенности строения сильновакуолизированной микроспоры: (б) – общий вид; (в–д) – фрагменты строения ее клетки; (е) – деполаризованная микроспора; (ж–и) – ультраструктурные особенности деполаризованной микроспоры; (ж) – ее общий вид; (з, и) – фрагменты строения ее клетки. (а, е) – СМ, давленные препараты; (б–д, ж–и) – ТЭМ. EPR – эндоплазматический ретикулум, GC – комплекс Гольджи, L – липидная капля, M – митохондрия, MW – оболочка микроспоры, N – ядро, Op – оперкулюм, P – пластида, Ps – полисома, Rb – рибосома, V – вакуоль. Шкала: (а, е, ж) – 10 мкм, (б) – 5 мкм, (в–д) – 200 нм, (з) – 500 нм, (и) – 1 мкм.

микроспор. Так, в цитоплазме присутствует большое количество свободных и собранных в группы рибосом (рис. 1з–1и). Имеются немногочисленные короткие каналы ЭПР (рис. 1з). Отмечаются липидные капли (рис. 1и). Внутренние мембранные структуры митохондрий и пластид слабо развиты (рис. 1з). Пластиды содержат небольшое количество мелких крахмальных зерен (рис. 1ж). Встречаются делящиеся пластиды (рис. 1з).

Ранее нами было показано, что именно такие микроспоры, претерпевая не свойственный в условиях *in vivo* симметричный митоз, дают начало эмбриоидам, проходящим в своем развитии фазы бластомеризации, органогенеза и сформированного эмбриоида (Круглова и др., 2005).

В начале фазы бластомеризации (5–7 сут культивирования) клетки эмбриоида, состоящего из 10–15 клеток, все еще находятся в пределах оболочки микроспоры (рис. 2а). Внутренние клеточные стенки эмбриоида тонкие, с плазмодесмами (рис. 2б, 2г). Клетки характеризуются наличием крупных ядер (иногда с несколькими ядрышками), занимающих центральное положение. Конденсированный хроматин равномерно распределен по всему ядру (рис. 2б, 2в). Ядерная оболочка имеет инвагинации, что увеличивает площадь контакта ядра и цитоплазмы (рис. 2в). Цитоплазма электроплотная, содержит большое количество рибосом, часто собранных в плотные группы (рис. 2г–2е); присутствует большое количество вакуолей, содержащих электроплотное хлопье-

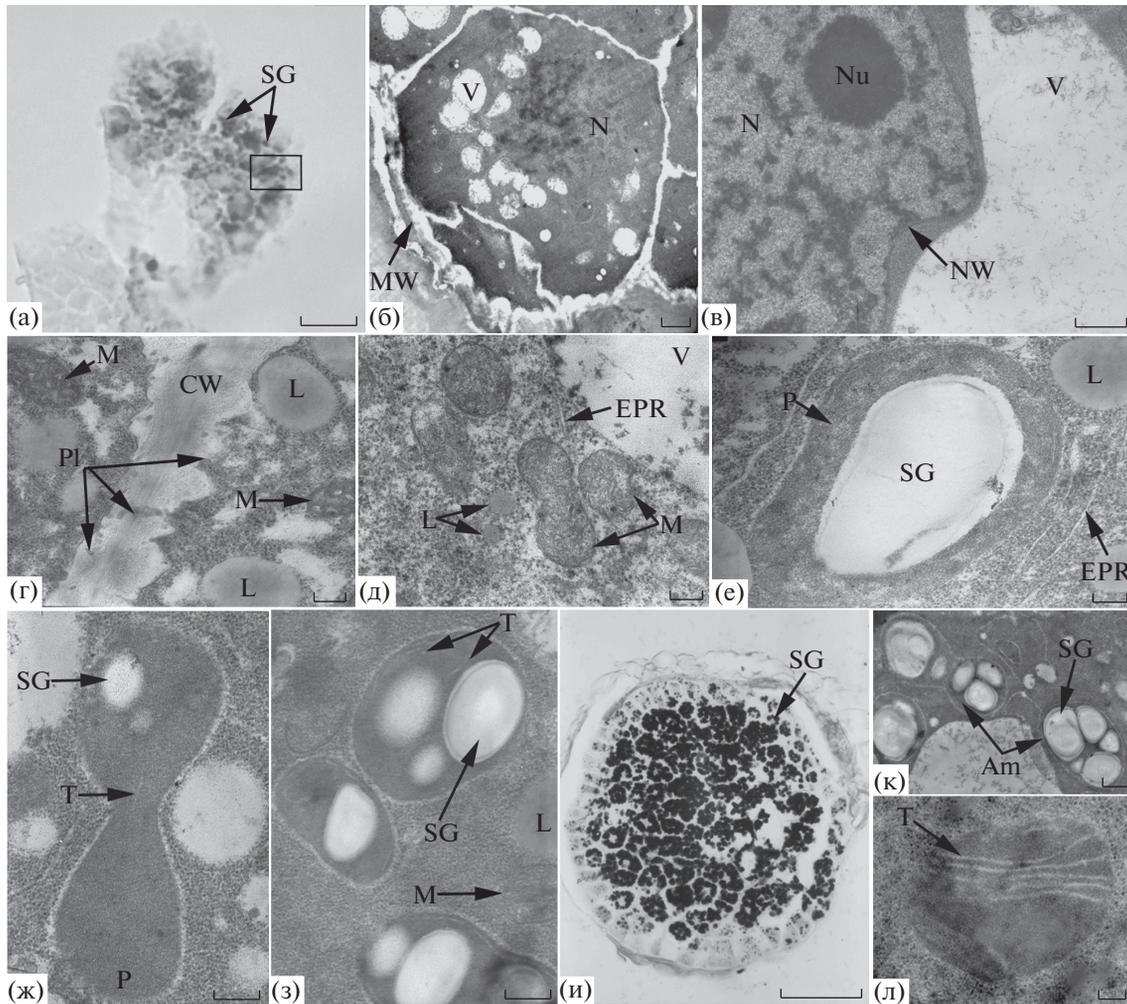


Рис. 2. Эмбрион в фазе бластомеризации и на глобулярной стадии развития. (а) – 15-клеточный эмбрион; (б–з) – ультраструктурные особенности строения клеток этого эмбриоида; (б) – фрагмент поверхностных клеток эмбриоида (обозначено рамкой на детали (а)); (в–з) фрагменты его центральных клеток; (и) – эмбрион в поздне-глобулярной стадии развития; (к, л) – ультраструктурные особенности строения его центральных клеток; (а, и) – СМ, постоянные препараты, гистохимическое окрашивание йодом на крахмал; (б–з, к, л) – ТЭМ. Am – амилопласт, CW – клеточная стенка, Nu – ядрышко, NW – ядерная оболочка, Pl – плазмодесма, SG – крахмальное зерно, T – тилакоид. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Шкала: (а) – 25 мкм, (б) – 2 мкм, (г–з, л) – 200 нм, (и) – 100 мкм, (в, к) – 1 мкм.

видное вещество (рис. 2б, 2в). Митохондрии округлые, с развитыми кристами (рис. 2г, 2д), в отдельных случаях гантелеобразные, делящиеся (рис. 2д). Число профилей пластид возрастает, количество крахмальных зерен и их размеры увеличиваются (рис. 2е–2з), что отчетливо видно и при гистохимическом окрашивании клеток эмбриоида на крахмал (рис. 2а). У части пластид (без крахмала) формируются тилакоиды (рис. 2ж, 2з). Встречаются гантелеобразные делящиеся пластиды (рис. 2ж). Возрастает количество липидных капель (рис. 2г–2е), которые располагаются преимущественно по периферии клетки (рис. 2г). Между липидными каплями часто обнаруживаются развитые каналы ЭПР с расширениями (рис. 2е). Комплекс Гольджи активен, представлен стопками цистерн, отделяющих везикулы (на рисунке не приведены).

На 12–15 сут культивирования в результате активных митотических делений размеры эмбриоида значительно увеличиваются, эмбрион переходит к глобулярной стадии развития (рис. 2и) и выходит из пределов оболочки микроспоры. Ультраструктурные характеристики клеток такого эмбриоида (по сравнению с предыдущей стадией развития) не изменяются (рис. 2а), за исключением того, что в клетках становится отчетливой дифференциация пластид двух типов – амилопластов, аккумулирующих крахмал в виде крупных крахмальных зерен (рис. 2к), и пластид со стопками развивающихся тилакоидов, представляющих собой, по-видимому, ювенильные хлоропласты (рис. 2л).

В ходе дальнейшего развития, на 20–21 сут культивирования начинается переход к фазе органогенеза. При этом становится четко выражен-

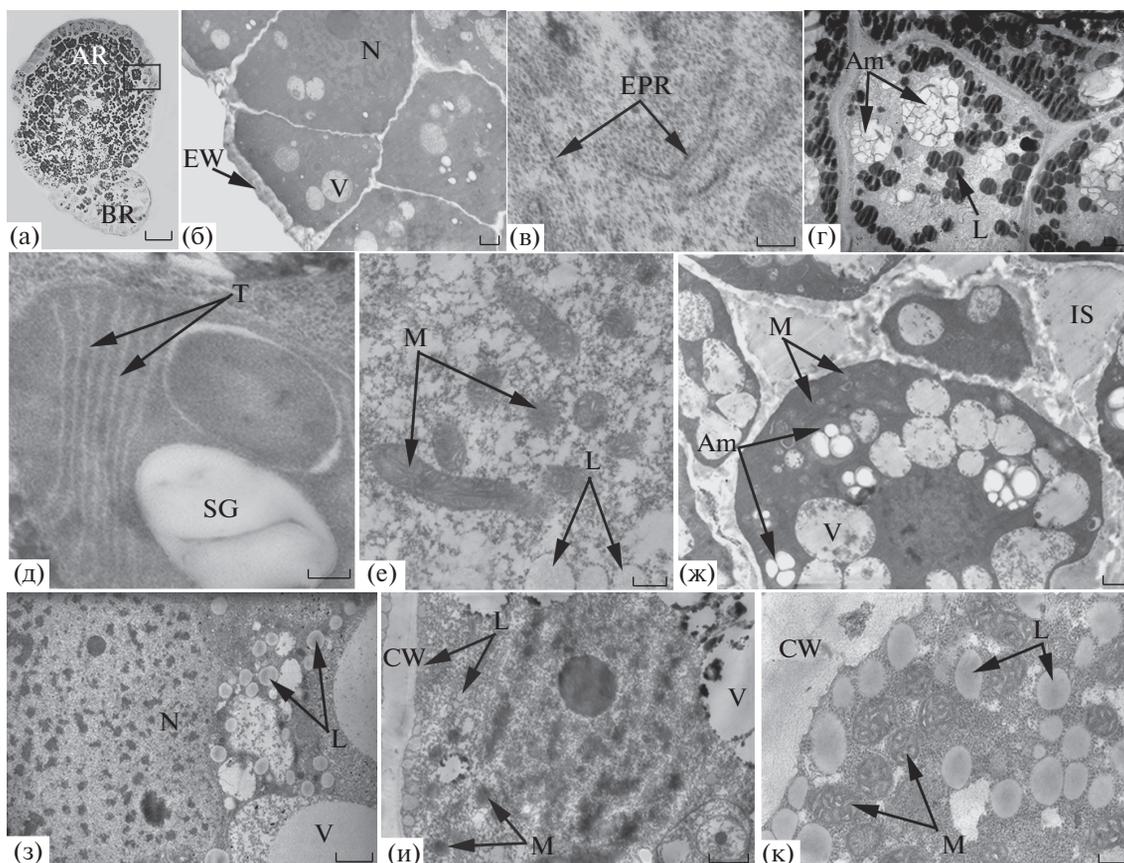


Рис. 3. Эмбрион со сформированной апикально-базальной осью при переходе к фазе органогенеза. (а) – общий вид эмбриоида; (б–к) – ультраструктурные особенности строения его клеток; (б) – фрагмент клеток апикальной части эмбриоида в области протодермы на границе закладывающихся щитка и апикальной меристемы побега (обозначен рамкой на детали (а)); (в–е) – фрагменты клеток в центре апикальной части эмбриоида; (ж–к) – фрагменты клеток базальной части эмбриоида. (а) – СМ, постоянный препарат, гистохимическое окрашивание йодом на крахмал; (б–л) – ТЭМ. AR – апикальная часть, BR – базальная часть, EW – внешняя оболочка эмбриоида, IS – межклетник. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–2. Шкала: (а) – 50 мкм, (б, г) – 2 мкм, (в, е, ж, к) – 200 нм, (д) – 100 нм, (з, и) – 1 мкм.

ной полярность эмбриоида, что проявляется в обособлении его апикального и базального полюсов (рис. 3а). Клетки апикальной и базальной частей различаются, что особенно проявляется на ультраструктурном уровне.

Так, клетки апикальной части меристематичны, плотно прилегают друг к другу, их крупные ядра округлой формы, с инвагинациями оболочки, занимают центральное положение. Поверхностные клетки имеют более толстые наружные оболочки (рис. 3б) и не отличаются по своим ультраструктурным характеристикам от центральных клеток, за исключением меньшего содержания крахмала (рис. 3а, 3б). Цитоплазма клеток, расположенных в центре, содержит каналы ЭПР, ассоциированные с рибосомами (рис. 3в). Также в цитоплазме содержится большое количество рибосом, часто собранных в группы (рис. 3в). По периферии клеток располагается значительное количество липидных капель (рис. 3г). Пластиды в основном представлены амилопластами, заполненными большим количеством крахмальных зе-

рен. Некоторые амилопласты очень крупные, с обилием крахмала (рис. 3г). Присутствуют также пластиды с 1–2 крахмальными зёрнами и тилакоидами (рис. 3е). Многочисленные митохондрии с хорошо развитыми кристами, округлые или гантелеобразные, обнаруживаются, как правило, в местах концентрации липидных капель (рис. 3е).

Клетки базальной части эмбриоида (по сравнению с клетками апикальной части) характеризуются формированием межклетников, они сильнее вакуолизированы (рис. 3а, 3ж). Большое количество липидных капель расположено как в центре (рис. 3з), так и по периферии таких клеток (рис. 3и, 3к). Среди липидных капель, расположенных по периферии клеток, обнаруживаются скопления митохондрий с хорошо развитой внутренней структурой (рис. 3к), также, как и в клетках апикальной части. Пластиды представлены амилопластами с крахмалом (рис. 3ж).

В начале фазы органогенеза, на 25–27 сут культивирования (рис. 4а), ультраструктурные характеристики клеток эмбрионидов (вследствие их ме-

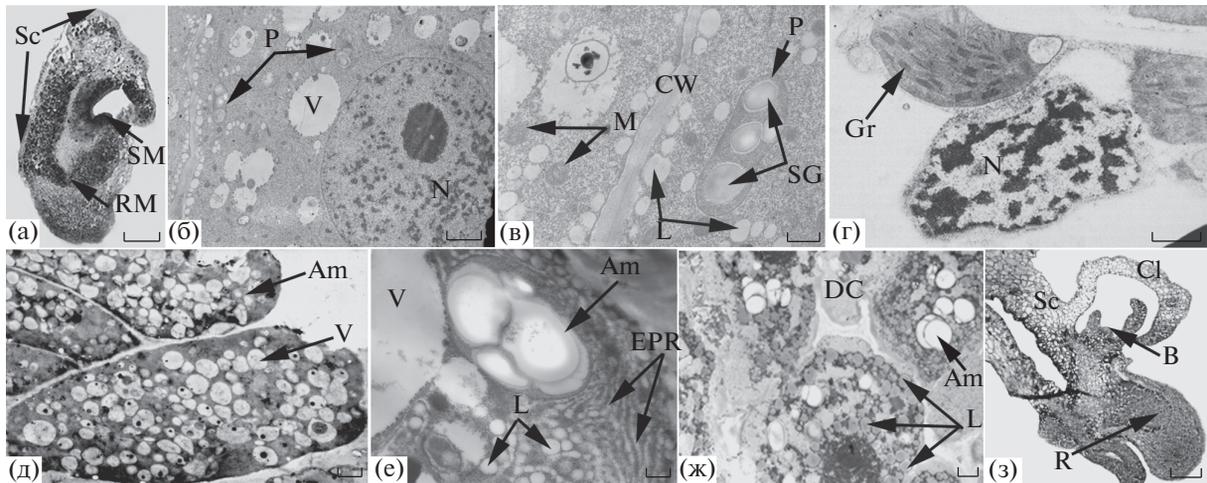


Рис. 4. Эмбрионид в фазе органогенеза и сформированный эмбрионид. (а) — общий вид эмбрионид в фазе органогенеза; (б–ж) — ультраструктурные особенности строения его клеток: (б–г) — фрагменты клеток в области апикальной меристемы побега, (д–е) — фрагменты поверхностных клеток щитка, (ж–з) — клетки базальной части эмбрионид; (з) — общий вид сформированного эмбрионид. (а, б) — СМ, постоянные препараты, гистохимическое окрашивание йодом на крахмал; (б–ж) — ТЭМ. В — почка, СЛ — колеоптиль, ДС — дегенерирующая клетка, Gr — грана, R — корень, RM — корневая меристема, Sc — щиток, SM — апекс побега. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–3. Шкала: (а) — 100 мкм, (б, ж) — 2 мкм, (в, е) — 500 нм, (г) — 200 нм, (з) — 500 мкм.

ристематичности) в большинстве своем совпадают с таковыми у более ранних эмбрионидов, однако имеются и различия. Так, в клетках апекса побега и корневой меристемы уменьшается количество амилопластов и крахмальных зерен (рис. 4б, 4в). В клетках апекса побега появляются хорошо развитые хлоропласты с тилакоидами, организованными в граны (рис. 4г). Поверхностные клетки щитка становятся удлиненными, однако мало отличаются от остальных его клеток. И те, и другие характеризуются наличием большого количества мелких вакуолей, часть которых содержит электроплотные включения (рис. 4д). В них выявляется множество цистерн ЭПР и липидных капель; присутствуют многочисленные амилопласты с крупными крахмальными зернами (рис. 4д, 4е). Клетки базальной части эмбрионид расположены рыхло, частично подвергаются деструкции; их амилопласты содержат единичные мелкие крахмальные зерна; по всему объему клетки отмечено большое количество липидных капель (рис. 4ж).

В сформированных эмбриониде (40–42 сут культивирования; рис. 4з) содержание крахмала и липидов не изменяется; в меристемах побегов и зачатках листьев обнаруживаются хорошо развитые хлоропласты (на рисунке не приведены).

Ультраструктурные характеристики зиготических зародышей *in vivo*. Через 12 ч после искусственного опыления в зародышевом мешке семязачатка обнаруживается зигота, имеющая типичную для пшеницы грушевидную форму (рис. 5а). Крупное ядро зиготы с конденсированным хроматином и ядрышком с несколькими вакуолями располагается в апикальной части клетки (рис. 5а, 5б). Вокруг ядра сосредоточено большое количество

вакуолей, содержащих электроплотные включения (рис. 5б). В перинуклеарном пространстве обнаруживаются многочисленные органоиды, представленные некрупными округлыми митохондриями, имеющими незначительно развитые кристы (рис. 5б, 5в), и амилопластами с 1–3 крахмальными зернами (рис. 5б, 5г). В цитоплазме присутствуют рибосомы — как свободные, так и собранные в группы (рис. 5в, 5д). ЭПР гранулярный, представлен удлиненными, местами извилистыми и расширенными каналами; комплекс Гольджи представлен стопками диктиосом, отделяющих везикулы (рис. 5д). В цитоплазме обнаруживаются липидные капли, как правило, собранные группами и ассоциированные с удлиненными каналами ЭПР (рис. 5г).

Через 1 сут после опыления зигота делится с образованием двухклеточного зародыша. С этого момента начинается фаза бластомеризации зародыша. Дальнейшие деления приводят к формированию многоклеточного зародыша с дифференцированным суспензором (рис. 5е).

Клетки собственно зародыша и суспензора отличаются по своим ультраструктурным характеристикам.

Клетки апикальной части собственно зародыша — как поверхностные, так и расположенные в центре, практически не отличаются по своим характеристикам, за исключением того, что поверхностные клетки имеют более толстые наружные оболочки, как и в эмбриониде на этой стадии развития (рис. 5е). И те, и другие имеют цитоплазму, богатую органоидами, и крупное центрально расположенное ядро, нередко характеризующееся инвагинациями ядерной оболочки (рис. 5ж). В

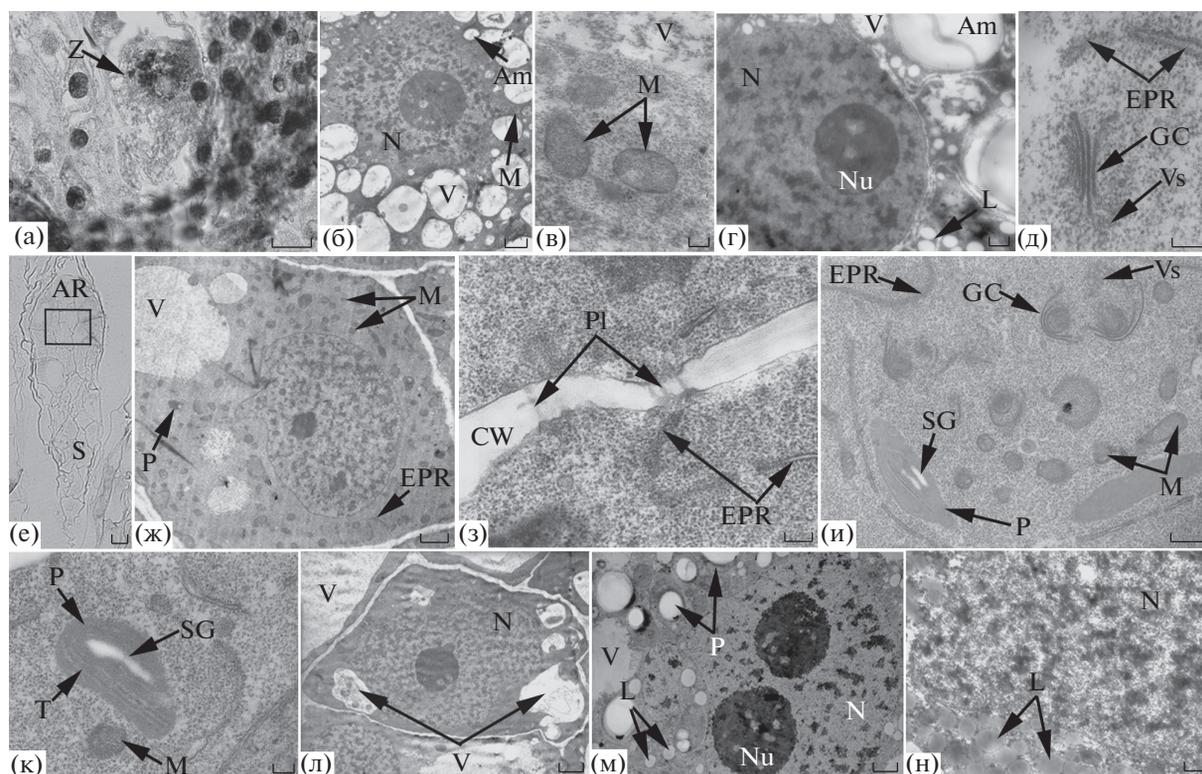


Рис. 5. Зигота и зародыш в фазе бластомеризации. (а) – общий вид зиготы; (б–д) – ультраструктурные особенности строения клетки зиготы в области ядра и прилегающей цитоплазмы; (е) – общий вид зародыша в фазе бластомеризации; (ж–к) – ультраструктурные особенности строения центральных клеток в его апикальной части (обозначено рамкой на детали (а)); (л–н) – ультраструктурные особенности строения клеток в его базальной части (в области суспензора). (а, е) – СМ, постоянные препараты, гистохимическое окрашивание Шифф-йодной кислотой (а) и йодом (е) на крахмал; (б–д, ж–н) – ТЭМ. S – суспензор, Vs – везикула комплекса Гольджи, Z – зигота. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–4. Шкала: (а) – 20 мкм, (б, ж, л) – 2 мкм, (в, д, з, к) – 200 нм, (г, и, н) – 500 нм, (е) – 10 мкм, (м) – 1 мкм.

клеточных стенках (за исключением более толстых наружных) отмечаются плазмодесмы (рис. 5з). Клетки менее вакуолизованы по сравнению с зиготой (ср. рис. 5ж и 5б). Во многих вакуолях отмечается диффузное распределение электроноплотного материала, иногда встречаются хлопьевидные включения (рис. 5ж). В цитоплазме много свободных рибосом, причем часть рибосом собрана в относительно крупные плотные группы (рис. 5з, 5к). Количество митохондрий увеличивается, а их кристы становятся более развитыми (рис. 5ж, 5и). Пластиды имеют единичные ламеллы; количество и размер крахмальных зерен в них сильно уменьшается по сравнению с зиготой (ср. рис. 5и и 5г). В некоторых пластидях начинают формироваться стопки тилакоидов, что, по-видимому, свидетельствует об их трансформации в ювенильные хлоропласты (рис. 5к). Наблюдается пролиферация ЭПР – увеличиваются длина и количество каналов (рис. 5з–5к). Комплекс Гольджи активен, представлен группами изогнутых диктиосом, отделяющих везикулы. Число диктиосом также увеличивается (рис. 5и). Характерно, что в цитоплазме клеток собственно зародыша практически полностью отсутствуют липидные капли.

Клетки суспензора, расположенного в базальной части зародыша, более вакуолизованы по сравнению с клетками его апикальной части. Многие вакуоли содержат включения, напоминающие дегенерирующие митохондрии и пластиды (рис. 5л). В цитоплазме содержится большее количество амилопластов (с 1–2 небольшими крахмальными зернами) (рис. 5м). Присутствуют многочисленные липидные капли – единичные или собранные в группы (рис. 5м, 5н). Количество митохондрий в местах концентрации липидных капель небольшое (рис. 5н).

С момента заложения щитка и апекса побега (рис. 6а) зародыш переходит к фазе органогенеза. В начале этой фазы (7–9 сут после опыления) клетки меристемы побега характеризуются наличием крупного центрально расположенного ядра с равномерно распределенным конденсированным хроматином и 1–2 ядрышками (рис. 6б). Ядерная оболочка имеет инвагинации (рис. 6б, 6в). В цитоплазме отмечается наличие небольшого числа мелких вакуолей, содержащих электроноплотные везикулярные включения (рис. 6б). Цитоплазма содержит большое число свободных рибосом. Наблюдается дезагрегация рибосомальных

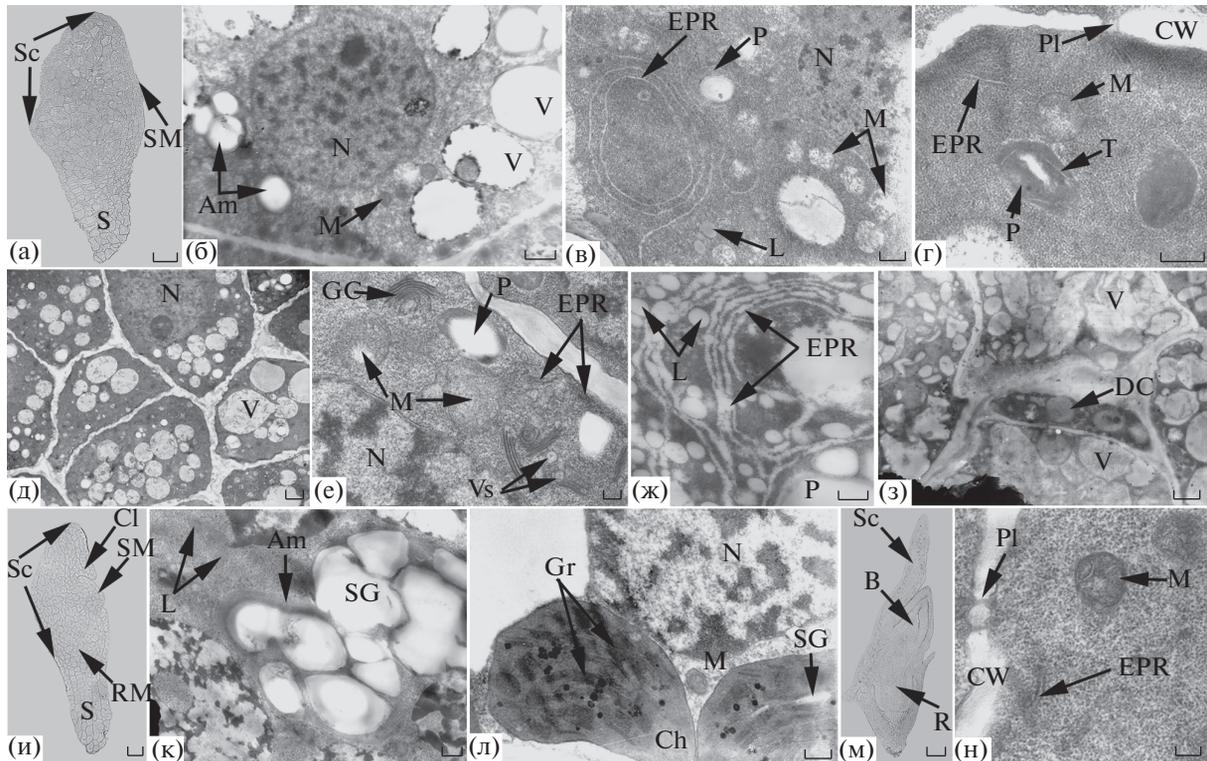


Рис. 6. Зародыш в фазе органогенеза и сформированный зародыш. (а) – общий вид зародыша в начале фазы органогенеза; (б–з) – ультраструктурные особенности строения его клеток в области формирующейся апикальной меристемы побега (б–г), субэпидермальных клеток щитка (д–ж) и суспензора (з); (и) – общий вид зародыша в конце фазы органогенеза; (к) – ультраструктурные особенности строения субэпидермальных клеток его щитка; (л) – сформированный хлоропласт в клетке апикальной меристемы побега зародыша в конце фазы органогенеза; (м) – общий вид сформированного зародыша; (н) – ультраструктурные особенности строения клетки апикальной меристемы его почки. (а, и, м) – СМ, постоянные препараты, гистохимическое окрашивание йодом на крахмал; (б–з, к, л, н) – ТЭМ. Ch – хлоропласт. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1–5. Шкала: (а) – 25 мкм, (б–г, к) – 500 нм, (д, з) – 2 мкм, (е, ж, л, н) – 200 нм, (и) – 50 мкм, (м) – 100 мкм.

групп, вследствие чего количество последних уменьшается (рис. 6г). В цитоплазме вновь обнаруживаются небольшие амилопласты с 1–3 крахмальными зернами (рис. 6б), а также присутствуют ювенильные хлоропласты, степень развития и количество которых сопоставимы с таковыми на предыдущей фазе развития (рис. 6г). Митохондрии становятся более ювенильными, чем во время фазы blastomerization (рис. 6в, 6г). Длинные каналы ЭПР часто формируют концентрические образования (рис. 6в). Комплекс Гольджи активен, расположен вдоль клеточных стенок (рис. 6г). В цитоплазме снова появляются одиночные липидные капли (рис. 6в).

Клетки щитка в центральной его части сильно вакуолизованы. В их мелких вакуолях (как и в клетках центральной части эмбриоида на аналогичной стадии развития) отмечается диффузное содержимое (рис. 6д). В цитоплазме содержится большое количество цистерн комплекса Гольджи с везикулами (рис. 6е). В пластидах содержатся крахмальные зерна; митохондрии имеют хорошо развитые внутренние мембраны (рис. 6е). По периферии клеток располагаются длинные каналы ЭПР, которые ассоциированы с многочисленными

липидными каплями, расположенными вдоль плазмалеммы (рис. 6е, 6ж).

Клетки суспензора также сильно вакуолизованы. В них отмечается процесс автолиза, что приводит к началу деструкции клеток (рис. 6з).

В формирующемся зародыше (15–17 сут после опыления, рис. 6и) клетки щитка содержат более крупные, по сравнению с предыдущей стадией, амилопласты, которые аккумулируют крахмал (рис. 6к). В клетках апекса побега единичные хлоропласты становятся хорошо развитыми (рис. 6л).

В морфологически сформированном зародыше (21–23 сут после опыления, рис. 6м) в клетках почки значительно уменьшается число каналов ЭПР (рис. 6н). В клетках всех органов отмечается исчезновение рибосом, собранных в группы (например, рис. 6н).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным ультраструктурного анализа, процессы микроспорального эмбриодогенеза *in vitro* и зиготического эмбрио-

генеза *in vivo* пшеницы характеризуются определенным сходством.

Одно из таких общих свойств — высокая метаболическая активность инициальных клеток как эмбрионидов, так и зародышей пшеницы. Так, сильновакуолизованные микроспоры и деполаризованные микроспоры на ранних этапах культивирования *in vitro* характеризуются синтетической активностью. Оболочка ядра нередко имеет инвагинации, что увеличивает площадь контакта ядра и цитоплазмы. Отмечен контакт ядерной оболочки с конденсированным хроматином, что свидетельствует о функционировании примембранного хроматина, с которым связывают инициацию репликации, а в некоторых случаях и транскрипцию ДНК (Ченцов, 2004). Сходные данные по ультраструктуре сильновакуолизованных и деполаризованных микроспор, а также клеток ранних эмбрионидов, находящихся в пределах оболочки микроспор, получены для кукурузы (Barnabas et al., 1987; Góralski et al., 2005) и пшеницы (Bonet, Olmedilla, 2000; Carreda et al., 2000; Maraschin et al., 2005). Однако Ф. Бонэ, А. Олмедилла (Bonet, Olmedilla, 2000) показали, что у пшеницы в цитоплазме как инициальных микроспор, так и микроспор, подвергающихся первому симметричному делению, число рибосом уменьшается, что указывает на снижение интенсивности процессов синтеза белков и мРНК при смене программы развития этих клеток с гаметофитной на спорофитную. В целом, важный вопрос о зависимости индукции спорофитной программы развития инициальных клеток-микроспор от их метаболической активности требует дальнейшего исследования.

Аналогичные ультраструктурные характеристики, свидетельствующие о высокой метаболической активности, отмечены и у инициальной клетки зародыша пшеницы — зиготы.

В начале фазы бластомеризации эмбрионид пшеницы еще находится в пределах оболочки микроспоры, которая утолщается, что выявлено также у эмбрионидов кукурузы (Barnabas et al., 1987) и пшеницы (Bonet, Olmedilla, 2000).

Выявлено также, что в этой фазе развития внутренние клеточные стенки и эмбрионидов и зародышей пшеницы характеризуются наличием плазмодесм. Наличие плазмодесм в клеточных стенках эмбрионидов/зародышей вполне объяснимо, поскольку плазмодесмы обеспечивают тесную связь между клетками и опосредуют передачу факторов, обеспечивающих рост, деления и дифференциацию (Plasmodesmata ..., 1999).

Клетки как эмбрионидов, так и зародышей пшеницы в фазе бластомеризации и в начале фазы органогенеза, как и их инициальные клетки, характеризуются высокой метаболической активностью, необходимой для синтеза конституционных веществ в ходе воспроизводящих делений, приводящих к увеличению числа клеток эмбрионидов/зародышей. Это подтверждается наличием в клетках эмбрионидов/зародышей пшеницы хо-

рошо развитых митохондрий и пластид. Кроме того, в цитоплазме клеток эмбрионидов/зародышей визуально возрастает количество и длина цистерн ЭПР. Агранулярный ЭПР располагается, как правило, между липидными каплями, и, по-видимому, участвует в их синтезе. Пролиферация агранулярного ЭПР связана с синтезом материалов, необходимых для построения клеточных стенок (Банникова и др., 1991). В этом процессе также участвует комплекс Гольджи, активность которого в клетках эмбрионидов/зародышей возрастает, что проявляется в появлении везикул, отделяемых от его цистерн. Наличие цистерн гранулярного ЭПР, а также возрастание числа полисом связывают с активным синтезом белка (Ченцов, 2004). Выявленное в клетках эмбрионидов и зародышей на этих фазах развития возрастание количества митохондрий, усложнение их внутренней мембранной структуры и расположение их рядом с липидными каплями, возможно, свидетельствует о возрастании энергозатрат клеток, как это показано на других растениях и для других органов (Ченцов, 2004).

Во время фазы бластомеризации клетки эмбрионидов и зародышей пшеницы характеризуются наличием большого количества вакуолей. Аналогичные данные получены другими авторами при исследовании ранних эмбрионидов кукурузы, полагающими, что вакуоли выполняют функцию выведения из клетки продуктов жизнедеятельности, поскольку в них обнаруживаются различные включения (Barnabas et al., 1987). Вероятно, и вакуоли клеток эмбрионидов/зародышей пшеницы в фазе бластомеризации выполняют аналогичную функцию.

Начиная с фазы органогенеза, вакуоли сохраняются только в клетках базальной части эмбрионидов и суспензора зародышей пшеницы. Выказано мнение о том, что вакуоли в суспензоре зародыша служат как автолитические компартменты, участвующие в деструкции этого органа (Taylor, Vasil, 1995). Вполне вероятно, что и в эмбриоидах/зародышах пшеницы вакуоли играют аналогичную роль.

И у эмбриоида, и у зародыша пшеницы выявлены хлоропласты, хорошо развитые в клетках их апексов побегов в конце фазы органогенеза. Эти данные, вероятно, позволяют охарактеризовать эмбриониды и зародыши изученного сорта пшеницы как обладающие свойством хлорофиллоносности, а пшеницу отнести к группе хлороэмбриофитов — растений, зародыш (и эмбрионид — *Авт.*) которых содержит хлорофилл (Жукова, 1992; Puthur et al., 2013). Хлорофиллоносность зародыша *in vivo* широко распространена среди цветковых растений, однако у пшеницы ранее не была описана, согласно сводке (Жукова, 1997). Специфика “эмбрионального” фотосинтеза заключается в том, что он направлен прежде всего на накопление в формирующихся семенах запасных питательных веществ, а синтезируемые в световых реакциях АТФ и НАД(Ф) · Н расходуются главным образом на превращение поступающей из материнского растения

сахарозы в жирные кислоты (Смоликова, Медведев, 2016). По-видимому, и в культивируемых на свету эмбриоидах фотосинтез направлен на те же цели, а синтезируемые АТФ и НАД(Ф) · Н расходуются на биохимические превращения входящей в состав питательной среды сахарозы. В то же время, в отличие от эмбриоида, явно зеленой окраски почечки зародыша не наблюдалось ни на одной из стадий развития, видимо, в силу единичности хлоропластов в клетках апекса побега.

Наряду со значительным сходством в ультраструктурных характеристиках клеток, развивающихся эмбриоидов и зародышей пшеницы, выявлены и их определенные различия.

Если описанные выше ультраструктурные характеристики сохраняются в клетках эмбриоидов на всем протяжении их развития, то в клетках зародышей в конце фазы органогенеза длина цистерн ЭПР значительно уменьшается, что, по-видимому, связано с подготовкой зародыша к периоду покоя, отсутствующему в развитии эмбриоида *in vitro*. С подготовкой к периоду покоя также можно связать увеличение в цитоплазме клеток зародышей количества свободных рибосом, а также ювенилизацию митохондрий.

Следующее отличие состоит в присутствии в клетках эмбриоидов липидных капель (локализованных, как правило, вдоль клеточной стенки) в количествах, визуальном намного превышающих это значение у клеток зародышей. В литературе имеются данные о значительном уменьшении количества липидных капель в клетках зародышей злаков к началу фазы органогенеза и возрастании их количества в клетках щитка сформированного зародыша перед его вступлением в период покоя (Банникова и др., 1991; Taylor, Vasil, 1995). Этот факт укладывается в представление о том, что использование инициальных запасов липидов для энергозатрат клеток в определенные фазы развития зародыша и последующая их аккумуляция в качестве запасных веществ характерны для эмбриогенеза покрытосемянных растений (Банникова и др., 1991; Наумова, 1997; Raghavan, 1997).

В клетках эмбриоидов пшеницы визуальным отмечается высокое содержание липидов на протяжении всего развития начиная с фазы органогенеза. Ряд исследователей также выявили большое количество липидных капель в клетках глобулярных эмбриоидов пшеницы (Bonet, Olmedilla, 2000) и кукурузы (Tsay et al., 1986; Barnabas et al., 1987; Góralski et al., 2005). В целом, наличие липидов, по-видимому, является общим характерным признаком развивающихся микроспориальных эмбриоидов злаков. Высказано мнение, что способность к синтезу и использованию липидов может быть следствием переключения программы развития инициальных микроспор с гаметофитной на спорофитную (Tsay et al., 1986; Barnabas et al., 1987). Б. Барнабас с соавт. (Barnabas et al., 1987) считают, что аккумуляция липидов вызвана

скорее программированной деградацией тапетального слоя стенки пыльника или мембран микроспор, чем их синтезом *de novo*. В нашем случае наличие удлинённых каналов агранулярного ЭПР среди липидных капель позволяет предположить, что этот органоид осуществляет интенсивный синтез липидов для энергетических потребностей активно делящихся клеток эмбриоида. Об этом свидетельствует и присутствие возле групп липидных капель митохондрий с хорошо развитыми кристами. Исходя из вышеизложенного, можно полагать, что липиды представляют собой альтернативный источник энергии, необходимой для осуществления активных клеточных делений в процессе формирования и последующего прорастания эмбриоидов в отсутствие эндосперма.

Еще одна отличительная черта ультраструктурных характеристик клеток эмбриоидов пшеницы состоит в иной, по сравнению с зародышами, динамике синтеза крахмала в клетках в процессе развития. У ранних зародышей пластидом представлен, как правило, небольшими амилопластами с единичными мелкими крахмальными зёрнами, начало аккумуляции крахмала отмечается только к концу фазы органогенеза в клетках щитка. В отличие от зародышей, начало аккумуляции крахмала в клетках эмбриоидов наблюдается уже на стадии инициальной клетки-микроспоры; количество крахмала визуальным увеличивается во всех органах и тканях эмбриоида по мере его развития. Сходные данные получены при изучении инициальных клеток эмбриоидов у кукурузы (Barnabas et al., 1987; Góralski et al., 2005) и пшеницы (Bonet, Olmedilla, 2000; Carreda et al., 2000).

Многими авторами высказано мнение, что именно микроспоры, содержащие большое количество крахмала, дают начало эмбриоидам, поскольку наличие крахмала — это энергетическое обеспечение процесса клеточных делений (Dunwell, Sunderland, 1974; Barnabas et al., 1987; Carreda et al., 2000). Однако С. Карреда с соавт. (Carreda et al., 2000) показали, что в культивируемых микроспорах ячменя существует две программы развития пластида. Первая программа ведет к их дифференциации по пути амилопластов, которые интенсивно накапливают крахмал, утрачивают тилакоиды и способность к делениям, т.е. следуют гаметофитной программе развития, и эта программа развития необратима. При второй программе пластиды в начале культивирования утрачивают крахмал и в дальнейшем способны превращаться в хлоропласты, т.е. сохраняют способность к дедифференциации и развитию по спорофитной программе. Следует отметить, что в обоих случаях микроспоры реализуют спорофитную программу развития, ведущую к формированию эмбриоидов и в дальнейшем — растений-регенерантов (альбиносных в первом случае и зеленых — во втором).

Наличие большого количества крахмала в клетках изученных эмбриоидов пшеницы отмечено и на более поздних фазах их развития, что соответствует

литературным данным как по пшенице, так и по другим представителям цветковых растений (Rahman, 1993; Reynolds, 1993; Hause et al., 1994; Yeung et al., 1996; Palmer, Keller, 1997; Сельдимирова, 2013).

В состав питательных сред для получения микроспориальных эмбриоидов в качестве осморегулятора и источника углерода нередко включают сахарозу (Dunwell, 2010 и мн.др.). Сахароза легко поглощается клетками, так как ее молекула способна без расщепления проникать через клеточные мембраны с помощью специфических переносчиков. При этом поглощенная сахароза может запасаться в вакуолях культивируемых клеток или превращаться в крахмал и запасаться в их пластидах (Pic-Grubor et al., 1998).

Известно, что превращение сахарозы в крахмал контролируется рядом ферментов. Один из ключевых ферментов – сахарозосинтаза (СС, КФ 2.4.1.13) (Дэй, 2010). Имеются данные, что индолил-3-уксусная кислота может оказывать прямое активирующее воздействие на сахарозосинтазу (Туркина, Соколова, 1972). В состав индукционной среды для микроспориального эмбриоидогенеза *in vitro* пшеницы входит синтетический аналог индолил-3-уксусной кислоты – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. Не исключено, что этот синтетический ауксин может оказывать такое же действие на сахарозосинтазу, как и индолил-3-уксусная кислота.

Согласно мнению ряда авторов (Rahman, 1993; Pic-Grubor et al., 1998b; Yeung et al., 1996), накопление крахмала в клетках эмбриоидов – следствие избыточной концентрации сахарозы в питательной среде. Такая избыточность не может не оказывать воздействия на содержимое клеток и тканевую структуру эмбриоидов. Это мнение подтверждается, например, тем фактом, что зиготические зародыши рапса, извлеченные из семязачатка на торпедовидной фазе развития и культивируемые *in vitro* в течение 2-х недель на среде, содержащей сахарозу, аккумулировали крахмальные зерна таким же образом, что и микроспориальные эмбриоиды (Rahman, 1993).

Для устранения аккумуляции крахмала как предполагаемого результата влияния сахарозы К. Илик-Грубор с соавт. (Pic-Grubor et al., 1998) предприняли попытку культивирования микроспор рапса на среде с высоким содержанием полиэтиленгликоля в качестве осморегулятора и среде с очень ограниченным содержанием сахарозы в качестве источника углевода. Установлено, что эмбриоиды, культивируемые на первом варианте среды, имели морфологию, сходную с таковой зиготических зародышей в соответствующей фазе развития. Эмбриоиды же, культивируемые на втором варианте среды, отличались от зиготических зародышей по размеру, окраске, строению семядолей и аккумулировали крахмал, что подтверждает данные о зависимости этого процесса от воздействия внешних условий.

Однако при изучении соматического эмбриоидогенеза *in vitro* у двух видов ели было выявлено,

что варьирование типов углеводов и их количества в питательной среде не влияет на концентрацию эндогенного крахмала в эмбриоидах (Iraqi, Tremblay, 2001). При микроразмножении хосты также отмечено отсутствие влияния концентрации сахарозы в питательной среде на содержание крахмала в клетках эксплантов (Gollagunta et al., 2004). Таким образом, этот вопрос требует дальнейших исследований.

В условиях *in vivo* сахароза поступает в зародыш из окружающих материнских тканей и используется, наряду с другими веществами, на дыхание и построение тела зародыша. Количество 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 (Медведев, 2004). Кроме того, углеводы служат в качестве основного энергетического источника для клеточных делений зародыша, а при прорастании семян продукты расщепления крахмала быстро используются на дыхание и различные синтетические процессы (Наумова, 1997). В целом, физиологические механизмы, подготавливающие растяжение клеток при прорастании, функционируют только на фоне энергетической обеспеченности и поступления веществ из собственных запасных фондов (Обручева, Антипова, 1997; Liu et al., 2006). Поэтому, на наш взгляд, нельзя исключать возможность того, что аккумуляция крахмала эмбриоидами с самого начала их развития служит для создания энергетического ресурса, который может быть быстро востребован микроспориальным эмбриоидом в надлежащий период развития *in vitro*.

Хорошо известно, что в условиях *in vivo* функцию источника энергии для развивающегося зародыша выполняет эндосперм. Можно предположить, что часть клеток эмбриоида пшеницы, формирующегося в отсутствие эндосперма, принимает на себя его функцию. Такое предположение согласуется с данными некоторых авторов (Testillano et al., 2002; Maraschin et al., 2005; Pulido et al., 2006), которые показали, что эмбриоиды кукурузы состоят из двух доменов – зародышевого и “эндоспермоподобного”, различающихся паттернами экспрессии генов, размерами, строением клеток и выполняющих разные функции (так, “эндоспермоподобный домен” выполняет запасающие функции). В эмбриоидах кукурузы были выявлены гены, для которых характерны специфические временные и пространственные паттерны экспрессии во время раннего зиготического эмбриогенеза: ESR, ZmAЕ1 и ZmAЕ3 (экспрессируются на микроспилярном конце эндосперма), OCL3 (экспрессируется в суспензоре), LTP2 (экспрессируется в протодерме); установлено, что специфичные для эндосперма и собствен-

но зародыша гены экспрессировались в разных частях эмбриоидов (Magnard et al., 2000; Massonneau et al., 2005; Testillano et al., 2002). Аналогичные данные получены и в результате гистологического анализа ранних эмбриоидов других злаков, также выявившие наличие в них двух доменов, различающихся по структурным характеристикам составляющих их клеток (Bonet, Olmedilla, 2000; Ramirez et al., 2001; Góralski et al., 2005; Maraschin et al., 2005; Dubas et al., 2010). Кроме того, в ранних эмбриоидах ячменя, полученных в культуре изолированных микроспор *in vitro*, обнаружены гордеины — основные запасные белки эндосперма (Pulido et al., 2006), что также свидетельствует о наличии в эмбриоидах групп клеток, аналогично эндосперму выполняющих функцию аккумуляции крахмала для создания энергетического ресурса.

Микроспориальный эмбриоидогенез *in vitro* следует рассматривать как детерминированный и пластичный процесс, направленный на определенный результат — формирование нормального растения-регенеранта. Пластичность выражается, в том числе, и во включении в метаболизм альтернативных путей, направленных на создание энергетических ресурсов для развития и роста эмбриоида в отсутствии эндосперма. Эти процессы можно рассматривать в качестве поливариантности решения задач (Батыгин, 1986), направленных на реализацию системы надежности организма (Гродзинский, 1983; Батыгин, 1986; Веселовский, 1987; Batygina, 2012; Батыгина, 2014).

Сходство в развитии микроспориальных эмбриоидов *in vitro* и зиготических зародышей *in vivo*, в том числе сходство ультраструктурных характеристик их клеток, подтверждает выдвинутую Т.Б. Батыгиной (1987, 1997, 2014) с использованием системного подхода концепцию об универсальности процессов морфогенеза растений *in vivo*, *in situ* и *in vitro* независимо от типа репродуктивной структуры, способа репродукции и условий произрастания. Как полагает автор, такая универсальность должна проявляться уже начиная со строения инициальных клеток различных репродуктивных структур. Действительно, согласно полученным светооптическим и ультраструктурным данным, и сильновакуолизированная микроспора (инициальная клетка эмбриоидогенеза *in vitro*) и зигота (инициальная клетка эмбриогенеза *in vivo*) характеризуются таким структурным свойством, как полярность строения, т.е. существование функционально значимых асимметричных структур, образующихся в ответ на действие векторизованных стимулов, внешних или внутренних (Медведев, Шарова, 2011). В ходе дальнейшего развития такая полярность обуславливает постепенное формирование апикально-базальной организации, дифференциацию апикального и базального полюсов, апексов побега и корня и у эмбриоидов и у зародышей. Кроме того, и эмбриоиду, и зародышу присущи клеточная и гистологическая (“гистогенная”) дифференциация.

Эмбриоиды и зародыши проходят одинаковые фазы развития: инициальная клетка — бластомеризация — органогенез — сформированная структура. У эмбриоида и зародыша формируются идентичные органы, при этом их формирование в целом сходно по последовательности и способу заложения. На всем протяжении развития эмбриоида и зародыша, начиная с инициальной клетки, выявлено и несомненное сходство ультраструктурных характеристик составляющих их клеток.

Такая универсальность, несмотря на определенные специфические черты, позволяет предложить использование развивающихся *in vitro* микроспориальных эмбриоидов в качестве модели для изучения цитофизиологии развития зиготических зародышей *in vivo*.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией анатомии и морфологии растений Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН к.б.н. Яковлевой О.В. за ценные консультации при проведении исследований. Работа выполнена по государственным заданиям № 01201361803 и № 01201255606.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А., Тарасенко Л.В., Шулаев В.К., Ильиченко К.В., Майстров П.Д., Барабанова Е.А. Основы эмбриогенеза злаков. Киев: Наукова думка, 1991. 176 с.
- Батыгин Н.Ф. Устойчивость, гомеостаз и надежность растительных систем // Надежность биологических систем. Киев: Наук. думка, 1985. С. 196–203.
- Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас. Л.: Наука, 1987. 281 с.
- Батыгина Т.Б. Эмбриоидогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 624–648.
- Батыгина Т.Б. Биология развития растений. Симфония жизни. СПб.: ДЕАН, 2014. 712 с.
- Батыгина Т.Б., Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. От микроспоры — к сорту. М.: Наука, 2010. 174 с.
- Веселовский В.А. Надежность растительной клетки и стресс // Надежность и гомеостаз биологических систем. Киев: Наук. думка, 1987. С. 96–101.
- Гродзинский Д.М. Надежность растительных систем. Киев: Наук. думка, 1983. 366 с.
- Дэй Ж. Активность ферментов, участвующих в синтезе крахмала, в семенах сортов пшеницы, различающихся по содержанию крахмала // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 1. С. 81–85.
- Жукова Г.Я. Пластиды зародыша цветковых растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб.: БИН РАН, 1992. 33 с.
- Жукова Г.Я. Хлорофиллоносность зародыша как признак для классификации цветковых растений // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семя / ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 461–470.
- Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андро-

- гене́за *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. 1999. № 3. С. 275–281.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. 32 с.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас. М.: Наука, 2005. 99 с.
- Круглова Н.Н., Егорова О.В., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Зинатулина А.Е. Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. Уфа: Гилем, Башк. энцикл., 2013. 128 с.
- Медведев С.С. Физиология растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2004. 335 с.
- Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2011. 256 с.
- Наумова Т.Н. Ультраструктурные аспекты эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 557–568.
- Обручева Н.В., Антипова О.В. Морфология и физиология прорастания семян // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2: Семя / Ред. Батыгина Т.Б. СПб.: Мир и семья, 1997. С. 667–681.
- Сельдимирова О.А. Гистохимический анализ динамики содержания крахмала в микроспориальных эмбриоидах *in vitro* у яровой мягкой пшеницы // Известия Уфимского НЦ РАН. 2013. № 2. С. 62–66.
- Сельдимирова О.А., Абрамов С.Н., Круглова Н.Н. Развитие микроспориальных эмбриодов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. 2004. Т. 36. № 4. С. 320–326.
- Сельдимирова О.А., Круглова Н.Н. Андроклинический эмбриогенез *in vitro* злаков // Успехи соврем. биологии. 2014. Т. 134. № 5. С. 503–514.
- Смоликова Г.Н., Медведев С.С. Фотосинтез в семенах хлороэмбриофитов // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 1. С. 3–16.
- Туркина М.В., Соколова С.В. Изучение мембранного транспорта сахарозы в растительной ткани // Физиология растений. 1972. Т. 19. № 5. С. 912–919.
- Чабан И.А. Ультраструктурные аспекты эмбриогенеза пшеницы // IX Всесоюз. совещ. по эмбриологии растений “Гамето́генез, оплодотворение и эмбриогенез семенных растений, папоротников и мхов”: тезисы докл. Кишинев: Штиинца, 1986. С. 263.
- Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2004. 495 с.
- Barnabas B., Frantz P.F., Schel J.H.N. Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Rep. 1987. V. 6. № 3. P. 212–215.
- Batygina T.B. Integrity and reliability system in ontogenesis and evolution // The Internation J. Plant Reproductive Biology. 2012. № 4(2). P. 107–120.
- Batygina T.B. Stem cells and morphogenetic developmental programs in plants // Stem Cell Res. J. 2011. V. 3. № 1–2. P. 45–120.
- Berlin G.P., Miksche G.P. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. Iowa: State Univer. Press, 1976. 326 p.
- Bonet F.J., Olmedilla A. Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen // Protoplasma. 2000. V. 211. № 1–2. P. 94–102.
- Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R.S., Clément C. Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Sex. Plant Reprod. 2000. V. 13. № 2. P. 95–104.
- Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // Sympos. on Plant Tissue Culture: Proceed. Peking: Sci. Press., 1978. P. 52–56.
- Dubas E., Wedzony M., Petrovska B., Salaj J., Zur I. Cell structural reorganization during induction of androgenesis in isolated microspore cultures of Triticale (*×Triticosecale* Wittm.) // Acta Biol. Cracov. Bot. 2010. V. 52. № 1. P. 73–86.
- Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. № 4. P. 377–424.
- Dunwell J.M., Sunderland N. Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum*. II. Changes associated with embryogenesis // J. Exp. Bot. 1974. V. 25. № 85. P. 363–373.
- Electron microscopy. Methods and protocols / Ed. Nasser M.A. Hajibagheri. Totowa: Humana Press, 1999. 296 p.
- 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.
- González-Melendi P., Ramírez C., Testillano P.S., Kumlehn J., Risueño M.C. Three dimensional confocal and electron microscopy imaging define the dynamics and mechanisms of diploidisation at early stages of barley microspore-derived embryogenesis // Planta. 2005. V. 222. № 1. P. 47–57.
- Góralski G., Rozier F., Matthys-Rochon E., Przywara L. Cytological features of various microspore derivatives appearing during culture of isolated maize microspores // Acta Biol. Cracov. Bot. 2005. V. 47. № 1. P. 75–83.
- Hršel I., Wolfová B., Mohelská H. Electron microscopic investigation of cytoplasm of scutellar cells of a young wheat embryo // Biol. Plant. 1961. V. 3. № 2. P. 126–131.
- Hause B., van Veenendaal W.L.H., Hause G., van Lammeren A.A.M. Expression of polarity during early development of microspore derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L. cv. Topas // Bot. Acta. 1994. V. 107. № 1. P. 407–415.
- Ilic-Grubor K., Attree S.M., Fowke L.C. Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycole (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium // Plant Cell Repts. 1998. V. 17. № 1. P. 329–333.
- Iraqi D., Tremblay F.M. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos // Physiol. Plant. 2001. V. 111. № 3. P. 381–388.
- 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.
- Magnard J.L., Le Deunff E., Domenech J., Rogowsky P.M., Testillano P.S., Rougier M., Risueño M.C., Vergne P., Dumas C. Genes normally expressed in the endosperm are expressed at early stages of microspore embryogenesis in maize // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. № 4. P. 559–574.
- Maraschin S.F., Vennik M., Lamers G.E.M., Spalink H.P., Wang M. Time-lapse tracking of barley androgenesis re-

- veals position determined cell death within pro-embryos // *Planta*. 2005. V. 220. № 4. P. 531–540.
- Massonneau A., Coronado M.-J., Audran A., Bagniewska A., Mol R., Testillano P.S., Goralski G., Dumas C., Risueno M.-C., Matthys-Rochon E. Multicellular structures developing during maize microspore culture express endosperm and embryospesific genes and show different embryogenic potentialities // *Eur. J. Cell Biol.* 2005. V. 84. № 7. P. 663–675.
- Naumova T.N., Matzk F. Differences in the initiation of the zygotic and parthenogenetic pathway in the Salmon lines of wheat: ultrastructural studies // *Sex. Plant Reprod.* 1998. V. 11. № 3. P. 121–130.
- Palmer C.E., Keller W.A. Pollen embryos // *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement* / Eds Shivanna K.R., Sawhney V.K. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997. P. 392–422.
- Plasmodesmata: Structure, Function, Role in Cell Communication / Eds. van Bel A.J.E., van Kesteren W.J.P. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag, 1999. 357 p.
- Pulido A., Hernando A., Bakos F., Mendez E., Devic M., Barnabas B., Olmedilla A. Hordeins are expressed in microspore-derived embryos and also during male gametophytic and very early stages of seed development // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. № 11. P. 2837–2846.
- Puthur J.T., Shackira A.M., Saradhi P.P., Bartels D. Chloroembryos: a unique photosynthesis system // *J. Plant Physiol.* 2013. V. 170. P. 1131–1138.
- Raghavan V. *Molecular Embryology of Flowering Plants*. Cambridge: Cambridge Univer. Press, 1997. 565 p.
- Rahman M.H. Microspore-derived embryos of *Brassica napus* L.: stress tolerance and embryo development: PhD Thesis. Calgary: University of Calgary, 1993. 220 p.
- Ramirez C., Testillano P.S., Castillo A.M., Valles M.P., Coronado M.J., Cistue L., Risueno M.C. The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes // *Inter. J. Dev. Biol.* 2001. V. 45. Suppl. 1. P. 57–58.
- Reynolds Th. A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (Poaceae) during normal ontogeny and induced embryogenic development // *Amer. J. Bot.* 1993. V. 80. № 1. P. 569–576.
- Segui-Simarro J.M. Androgenesis revisited // *Bot. Rev.* 2010. V. 76. P. 377–404.
- Segui-Simarro J.M. Doubled haploidy in model and recalcitrant species // *Frontiers in Plant Science*. 2016. № 3. P. 4–5.
- Segui-Simarro J.M., Nuez F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis // *Physiol. Plant.* 2008. V. 134. № 1. P. 1–12.
- Smart M.G., O'Brien T.P. The development of the wheat embryo in relation to the neighbouring tissues // *Protoplasma*. 1983. V. 114. № 1. P. 1–13.
- Soriano M., Li H., Boutilier K. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture // *Plant Reprod.* 2013. V. 26. P. 181–196.
- Taylor M.G., Vasil I.K. The ultrastructure of zygotic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae) // *Amer. J. Bot.* 1995. V. 82. № 2. P. 205–219.
- Testillano P.S., Ramirez C., Domenech J., Coronado M.J., Vergne P., Matthys-Rochon E., Risueno M.C. Young microspore-derived maize embryos show two domains with defined features also present in zygotic embryogenesis // *Int. J. Dev. Biol.* 2002. V. 46. № 8. P. 1035–1047.
- Tsay H.S., Miao S.H., Widholm J.M. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture // *J. Plant Physiol.* 1986. V. 126. № 1. P. 33–40.
- 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.

Comparative Ultrastructural Analysis of the In Vitro Microspore-Derived Embryoids and In Vivo Zygotic Embryos of Wheat as a Basis for Understanding of Cytophysiological Aspects of Their Development

O. A. Seldimirova^{a,*}, N. N. Kruglova^a, G. E. Titova^{b,c}, and T. B. Batygina^{b,c}

^aUfa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bKomarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia

^cSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: o_seldimirova@mail.ru

Received October 6, 2016

Ultrastructures of in vitro microspore-derived embryoids and in vivo zygotic embryos of spring wheat have been analyzed and compared. Along with the similarity of ultrastructural characteristics of embryoid and embryo cells at the corresponding developmental stages, some differences have been revealed. Unlike embryos, embryoid cells are characterized by lipid inclusions and numerous mitochondria with well-developed internal membranes. According to our hypothesis, lipids represent an alternative energy source required for active cell divisions in the forming embryoids. Unlike embryos, since the earliest developmental stages, embryoid cells accumulate a significant amount of starch and then utilize it during the organogenesis and germination. A conclusion has been made that embryoid cells create their own reserve of carbohydrates, which is then mobilized during their development. The concept of T.B. Batygina (1987, 1997, 2014) about the universal character of the plant morphogenesis in vivo, in situ, and in vitro has been confirmed. The prospects for the use of microspore embryoidogenesis in vitro as a model to study cytophysiological aspects of zygotic embryogenesis in vivo are discussed.

Keywords: *Triticum aestivum* L., microspore, in vitro embryoidogenesis, in vivo embryogenesis, cell ultrastructure, reserve starch and lipids