

Саприн А.Н., Калинин Е.В. Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биологической химии. 1999. Т.39. С. 289–326.

Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. С. 32–34.

УДК 633.174 : (575.224.4 + 581.143.6 + 581.331.2)

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАНТОВ СОРГО С МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ, ПОЛУЧЕННЫХ ОБРАБОТКОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* СТРЕПТОМИЦИНОМ

М.И. Цветова, Л.А. Эльконин

ГНУ Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока РАСХН,
410010 Саратов, ул. Тулайкова, 7; e-mail: elkonin@mail.saratov.ru

К настоящему времени у различных видов растений выявлены и исследованы многочисленные гены, контролирующие развитие пыльцы. Мутации в таких генах, ведущие к мужской стерильности, найдены или искусственно индуцированы у разных видов, и их исследование представляет интерес, как с теоретической точки зрения, так и в целях практической селекции. При этом, было установлено, что отдельные гены влияют на строго определённые этапы формирования пыльцы (Kaul, 1988; Kaul, Singh, 1991; Kindiger et al., 1991).

В данной работе исследовали цитологические механизмы стерилизации пыльцы у линии сорго Майло-*ms-str* с мутацией мужской стерильности, которая была получена от регенеранта из каллуса линии Майло-10, обработанного стрептомицином (Эльконин, 1999).

Материал и методика

Линия зернового сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench раса *durra*) Майло-*ms-str* была получена на основе одного мужски-стерильного растения, регенерированного из каллуса линии Майло-10, обработанного стрептомицином (500 мг/л). Этот регенерант с мутацией мужской стерильности, обозначенной *ms-str*, был опылен пыльцой исходной линии. Стерильные растения из гибрида F1 были вновь бэккроссированы с Майло-10. Полустерильные растения из BC1 были самоопылены и в их потомстве выявлены стерильные, полустерильные и фертильные растения. В дальнейшем мутация мужской стерильности поддерживалась путем самоопыления полустерильных растений в течение 9 поколений. Стерильные растения из 8-го поколения были подвергнуты цитологическому исследованию.

Соцветия фиксировали в ацетоалкоголе (1:3), промывали и хранили в 75% спирте. Для окраски использовали ацетокармин (2%) после предварительного протравливания материала в 4% растворе железоммонийных квасцов в течение 25 минут при температуре 45-50о. Для

приготовления давленых препаратов из пыльников сорго использовали смесь 45% уксусной кислоты и 70% хлоралгидрата (1:1), подкрашенную ацетокармином.

Результаты и обсуждение

Цитологический анализ формирования пыльцы у мужски-стерильных мутантов выявил значительные нарушения в ходе микроспорогенеза. У мутантных растений материнские клетки пыльцы (МКП) в пределах одного пыльника делились асинхронно: одновременно наблюдались стадии от профазы I до II деления мейоза, а в некоторых случаях даже до микроспор с формирующейся оболочкой (рис. 1), чего никогда не наблюдается в норме. При этом на разных стадиях формирования пыльцы наблюдались разнообразные нарушения, причём, отдельные растения различались спектром наблюдаемых аномалий.

У двух из исследованных растений (20-2 и 20-6) наблюдался цитомиксис, который интенсивнее всего проявлялся в профазе I, особенно на стадии пахитены. В результате миграции ядерного материала образовывались: а) клетки, у которых кроме ядра в цитоплазме находились дополнительные свободные ядрышки и/или хроматин (рис. 2, 3); б) двуядерные клетки (рис. 4); в) клетки, у которых отсутствовало ядро, но в цитоплазме находилось ядрышко без хромосом, или хроматин без ядрышка; г) безъядерные клетки. В двуядерных клетках ядра могли быть на разных стадиях мейоза (рис. 4), либо делиться синхронно (рис. 5, 6). Интересно отметить, что в цветках, в которых имел место цитомиксис, МКП значительно различались по размеру. Кроме того, в этих же цветках отмечены синцитиальные образования с 2-4 ядрами. В отдельных цветках цитомиксисом было затронуто до 28% мейоцитов. При этом многие из них имели признаки дегенерации, независимо от того, имели они избыток или недостаток хроматина.

Наряду с мейоцитами, затронутыми цитомиксисом, в пыльниках содержались МКП, в которых мейотические процессы протекали нормально, либо наблюдались аномалии, не связанные своим происхождением с цитомиксисом. Среди 20-хромосомных МКП, находящихся в диакинезе, 71,1% имели по 10 бивалентов. В остальных наблюдали нарушения конъюгации (униваленты наряду с бивалентами, раскрытые биваленты, квадриваленты и в 4х случаях (1,3%) конъюгацию типа end-to-end, когда от 4 до 6 хромосом, соединённых концами, составляли цепочки. Диады, сформировавшиеся у этих мутантов, варьировали по размеру. Около 10% из них имели от 1 до 10 микроядер. Очевидно, что эти микроядра образовались как в результате аномального расхождения хромосом, так и из хроматина, попавшего в цитоплазму некоторых МКП в результате цитомиксиса.

В дальнейшем, у этих мутантов (20-2 и 20-6) наблюдали микроспоры аномальной формы, двуядерные, с микроядрами. Около 10% микроспор были значительно крупнее других, возможно, что они образовались из

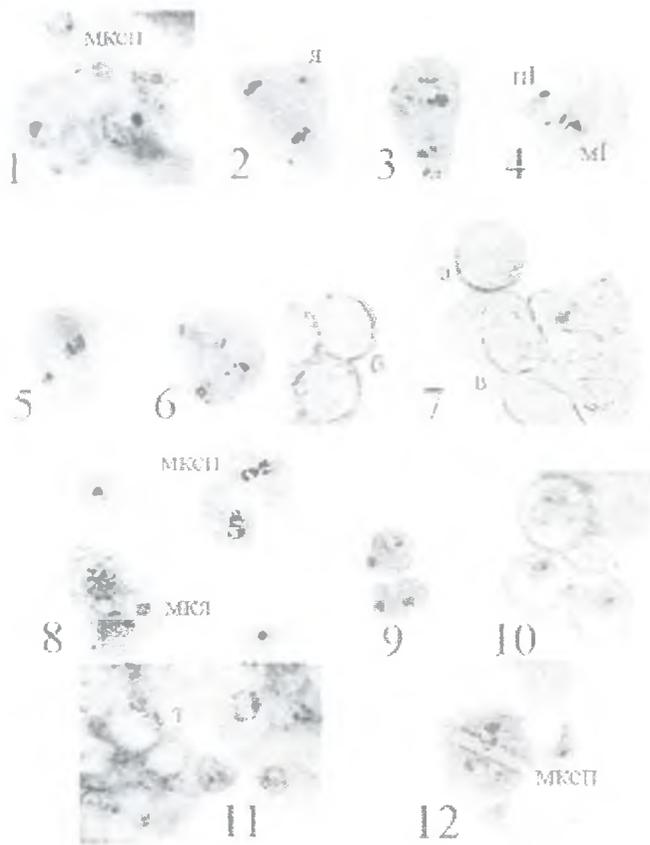


Рисунок. Аномалии при развитии пыльцы у линии Майло-*ms-str*

1 - мейциты в профазе I и микроспора в одном пыльнике; 2 - ядрышко в цитоплазме МКП на стадии телофазы I; 3 - чужеродный хроматин в плазме МКП на стадии профазы I; 4 - 6 двухдерные клетки на разных стадиях мейоза; 7 - микроспоры из одного цветка растения 20-6: а - нормальная; б - неразьединившиеся, но образовавшие оболочку; в - не образовавшие оболочку; 8 - клетка тапетума и микроспоры с микроядрами; 9, 10 - результаты нарушения цитокинеза в телофазе II, 11 - вакуолизация тапетума; 12 - формирование оболочки вокруг половинок диад.
 мксп-микроспора; я - ядрышко; ПI - профазы I; МI - метафаза I; мкя - микроядро; т - тапетум

половинок диад, в которых не прошло II деление мейоза. Часть тетрад не распадалась. При этом микроспоры в этих тетрадах продолжали развитие: у них формировались оболочки и пора. В то же время часть микроспор, высвободившихся из тетрад, не образовывали оболочки, хотя и увеличивались в размерах. Все пыльцевые зёрна у этих растений прекращали развитие на стадии одноядерной вакуолизированной пыльцы (рис. 7).

У одного из этих растений (20-2) во время вакуолизации пыльцы клетки тапетума не отличались от таковых у фертильной исходной линии Майло-10. Однако у другого растения (20-6) в разных цветках от 7 до 13% тапетальных клеток имели микроядра (рис.8), и до 5% клеток имели ядра, значительно различающиеся по размеру, чего мы не наблюдали в норме. Кроме того, клетки тапетума у этого растения варьировали по длине от 16.7 до 75.2 мкм (в норме пределы изменчивости этого признака 20.9-33.4 мкм).

У двух других растений (19-1 и 23-12) в обоих мейотических делениях свыше 20% ана-телофаз происходили аномально (1-7 отставших хромосом и/или нарушения цитокинеза) (рис. 9). В результате в микроспорах содержалось различное количество ядер и микроядер, формировались «двойные» и «тройные» ПЗ (рис.10), и в некоторых случаях формировались гигантские пыльцевые зёрна (ПЗ), содержащие 4 ядра.

Часть тетрад у этих растений, также, как у описанных выше, не распадалась ко времени формирования оболочки и поры ПЗ. У растения 23-12 часть ПЗ не сформировала оболочку и пору к моменту, когда в других ПЗ заканчивалась стадия вакуолизации.

В клетках тапетума к моменту формирования микроспор у растений 19-1 и 23-12 имелись огромные вакуоли, оттеснявшие цитоплазму и ядра к периферии (рис.11). В норме у сорго, и, в частности, у исходной линии Майло-10, на этой стадии также наблюдаются вакуоли, но не настолько крупные. Кроме того, у растения 23-12 в некоторых случаях клетки тапетума образовали синцитии.

У еще одного изученного растения, 20-3, на стадии тетрад наблюдались огромные протопласты, которые были, возможно, остатками синцитиальных структур. У этого же растения было резко нарушено расхождение хромосом в первом и втором делениях. При этом микроспорогенез часто прекращался на стадии диад, и половинки диад формировали оболочку одновременно с высвободившимися из тетрад микроспорами (рис.12). При этом в некоторых случаях хромосомы не объединялись в ядро, а оставались разбросанными в цитоплазме

У всех исследованных растений развитие пыльцы не проходило далее стадии одноядерного вакуолизированного ПЗ. На всех стадиях микроспорогенеза наблюдали дегенерацию части мейоцитов, пикноз ядер, а также ряд других аномалий.

Таким образом, у исследованных нами растений линии *ms-str* нарушения происходили на разных стадиях развития пыльника и пыльцы и

имели совершенно различную природу. Так, аномалии в расхождении хромосом и цитокинезе обычно являются результатом нарушений в действии микротрубочек веретена и их взаимодействия с центромерами хромосом (Dawe, 1998). Отсутствие нормально сформированной оболочки у микроспоры на стадии вакуолизации может быть связано с нарушениями синтеза спорополленина. Сохранение нераспавшихся тетрад, скорее всего, связано с нарушениями в процессе растворения каллозы. Изменения в развитии тапетума могут быть вызваны изменениями метаболизма аденина и цитокинина. Многие гены, экспрессия которых влияет на эти процессы, были выявлены и исследованы методами классической и молекулярной генетики (Татинцева, 1968; Warmke, Overman, 1972; Wang et al., 2002; Zhang et al., 2002; Rhee et al., 2003; Xie et al., 2005).

Исследования, проведенные ранее на ячмене, показали, что мутации, нарушающие формирование оболочек ПЗ, были не аллельны мутациям, при которых развитие микроспоры прерывалось после высвобождения из каллозной оболочки, так же как и мутациям, нарушавшим высвобождение микроспор из каллозы (Kaul, Singh, 1991). У кукурузы мутации, определяющие аномалии веретена деления и нарушения цитокинеза были неаллельны мутациям, прерывавшим развитие микроспоры на стадии вакуолизации (Alberstein, Phillips, 1981).

Обнаруженный нами спектр аномалий у разных растений одной и той же мутантной линии *ms-str* позволяет предположить более сложный мутационный механизм, чем возникновение одного рецессивного мутантного гена. Возможно, что в результате воздействия стрептомицина на каллусную культуру сорго произошла активация транспозона, гена-мутатора, либо возник какой-либо другой тип генетической нестабильности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-04-49119).

Литература

Татинцева С.С. Развитие мужских репродуктивных органов у фертильных и стерильных форм сорго. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л, 1968. 19 с.

Эльконин Л.А. Модификация систем размножения растений на основе методов культуры *in vitro* (на примере сорго). Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Санкт-Петербург, 1999. 48 с.

Alberstein M.C., Phillips R.L. Developmental cytology of 13 genetic male sterile locy in maize // *Can.J.Genet.Cytol.*, 1981. V. 23, N2. P.195-208.

Dawe R.K. Meiotic chromosome organization and segregation in plants // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998. V.49. P.371-395.

Kaul M.L.H. Male sterility in Higher Plants. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1988. 1005 pp.

Kaul M.L.H., Singh R.B. Male sterility in barley. 5. Gene action and microsporogenesis // *Cytobios*, 1991. V. 66, N265. P.71-85.

Kindiger B., Beckett T.A., Coe E.H. Differential effects of specific chromosomal deficiencies on the development of the maize pollen grain // Genome, 1991. V.32, N5. P.579-574.

Rhee S.Y., Osborne E., Poindexter P.D., Somerville C.R. Microspore separation in the quartet 3 mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation // Plant Physiol., 2003. V.133, N3. P.1170-1180.

Wang A, Xia Q., Xie W., Dumonceaux T., Zou J., Datla R., Selvaraj G. Male gametophyte development in bread wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular, cellular, and biochemical analyses of a sporophytic contribution to pollen wall ontogeny // Plant J., 2002. V.30, N6. p.613-623.

Warmke H.E., Overman M.A. Cytoplasmic male sterility in sorghum. I. Callose behavior in fertile and sterile anthers // J. Hered., 1972. V.63, N2. P.103-108.

Xie C.T., Yang Y.H., Qiu Y.L., Zhu X.Y., Tian H.Q. Cytochemical investigation of genic male-sterility in Chinese cabbage // Sex Plant Reprod., 2005. V.18, N 2. P.75-80.

Zhang C, Guinel FC, Moffatt BA. A comparative ultrastructural study of pollen development in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and male-sterile mutant *apt1-3* // Protoplasma, 2002. V.19, N 1-2. P.59-71.

УДК 581.3

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЭНДОСПЕРМА ПРИ ПСЕВДОГАМНОМ АПОМИКСИСЕ У *POA PRATENSIS* L.

О.И. Юдакова, Т.Н. Шакина

Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского
410012, г. Саратов, ул. Астраханская 83, biofac@sgu.ru

Передача способности к апомиктичному размножению культурным видам растений от их ближайших дикорастущих сородичей является одной из перспективных задач селекции, реализация которой сулит большие экономические выгоды. Проведение подобных работ требует знаний как генетических закономерностей наследования апомиксиса, так и эмбриологических особенностей скрещиваемых видов. Обязательным условием завязывания полноценных семян является формирование нормального эндосперма. Однако именно эндоспермогенез до сих пор остается наименее изученным разделом эмбриологии апомиксиса. Как правило, исследователи ограничиваются лишь констатацией способа формирования эндосперма, т.е. требуется или нет для его развития оплодотворение полярных ядер. Целью настоящей работы явилось изучение особенностей эндоспермогенеза при псевдогамном апомиксисе у мятлика лугового (*Poa pratensis* L.).