



УДК 581.33

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРЕДПОСЫЛОК К ПОЛИЭМБРИОНИИ У АПОМИКТИЧНЫХ ВИДОВ МЯТЛИКОВ

О. И. Юдакова, В. С. Тырнов

Саратовский государственный университет
E-mail: yudakovaoi@info.sgu.ru



В статье представлены результаты сравнительного анализа частоты цитозембриологических предпосылок к полиэмбрионии и степени их реализации у трех видов мятликов с разными типами апомиксиса: *Poa badensis* Haenke (диплоспория) и *P. pratensis* L., *P. chaixii* Vill. (апоспория). Установлено, что апоспорические виды мятликов обладают более высокими потенциальными к истинной и ложной полиэмбрионии по сравнению с диплоспорическим видом *P. badensis*. У *P. pratensis* и *P. chaixii* образование дополнительных яйцеклеток вместо синергид наблюдалось в 4,0 и 5,4% зародышевых мешков, соответственно, а развитие двух и более мегагаметофитов зарегистрировано в 32,1 и 31,5% семязачатков. У *P. badensis* эти явления встречались лишь с частотой 0,1 и 2,5% соответственно. Предпосылки к развитию множественных зародышей в большинстве случаев остаются нереализованными. При высоких потенциальных возможностях к полиэмбрионии частота семян с близнецовыми проростками у *P. pratensis* и *P. chaixii* составила лишь 5,8 и 1,8%. У *P. badensis* полиэмбрионы среди проростков не обнаружены. Обсуждаются возможные причины, препятствующие реализации потенций к полиэмбрионии.

Ключевые слова: полиэмбриония, апомиксис, злаки, *Poa*.

Realization of the Prerequisites to Polyembryony in Apomictic *Poa* L.

O. I. Yudakova, V. S. Tyrnov

The article presents the comparative analysis results of the frequency of cytoembryological prerequisites to polyembryony and the extent of their realization in three bluegrass species with different types of apomixis: *Poa badensis* Haenke (diplospory) and *P. pratensis* L., *P. chaixii* Vill. (apospory). It was found that aposporous bluegrass species have higher potencies to true and false polyembryony in comparison with diplospous *P. badensis*. In *P. pratensis* and *P. chaixii* the formation of additional egg cells instead synergids was observed in the 4,0 and 5,4% embryo sacs, respectively, and the development of two or more megagametophytes was registered in the 32,1 and 31,5% ovules. In *P. badensis* these phenomenas are occurred only with a frequency of 0.1 and 2.5%. In most cases prerequisites to the development of multiple embryos remain unfulfilled. At high potencies to polyembryony in *P. pratensis* and *P. chaixii* the twin seedlings frequency was only 5,8 and 1,8 %. In *P. badensis* the twins were not found. The possible reasons preventing the realization of potencies to polyembryony are discussed.

Key words: polyembryony, apomixis, cereals, *Poa*.

Изучение явления полиэмбрионии (формирования в одном семени нескольких зародышей) имеет важное практическое значение, поскольку может использоваться в селекционно-генетических работах для ускоренного получения чистых линий, гаплоидов и гомозиготных диплоидных форм. Способы образования многозародышевых семян весьма разнообразны. Дополнительные

зародыши могут развиваться из разных структур семязачатка и элементов зародышевого мешка, причем как в результате оплодотворения (бипарентальное наследование), так и без него (унипарентальное наследование) [1, 2]. Многочисленные попытки систематизации типов полиэмбрионии привели к созданию различных классификаций, в которых нередко один и тот же термин использовался для описания совершенно разных явлений. В зависимости от числа мегагаметофитов, в которых развиваются дополнительные зародыши, часто выделяют два типа полиэмбрионии: 1) истинную, если несколько зародышей образуются из элементов одного зародышевого мешка (дополнительных гамет, яйцеклеткоподобных синергид и др.) [3–5]; 2) ложную, когда в одном семязачатке формируется несколько мегагаметофитов с собственными зародышами [5–7].

Виды с апомиктическим способом репродукции, как правило, характеризуются высокой частотой полиэмбрионии [8–10]. Дело в том, что некоторые особенности развития репродуктивных структур у апомиктов создают условия для образования в одном семени более одного зародыша. Однако наличие цитозембриологических предпосылок к полиэмбрионии еще не является гарантом развития семян с близнецовыми проростками [11, 12]. В связи с этим важно изучать не только механизмы развития многозародышевых семян, но и то, в какой степени происходит реализация потенций к полиэмбрионии и какие причины могут препятствовать их проявлению.

Модельным объектом для изучения полиэмбрионии у апомиктических форм может стать род *Poa* L. Среди злаков он занимает одно из первых мест по числу апомиктических видов, многие из которых характеризуются разными типами апомиксиса и полиэмбрионии [9, 13]. В частности, у апоспорического *P. pratensis* L. зарегистрированы истинная, ложная и нуцеллярная полиэмбриония [14–18].

Цель данной работы состояла в выявлении цитозембриологических предпосылок к полиэмбрионии и определении степени их реализации у растений трех видов мятликов с разными типами апомиксиса: *Poa badensis* Haenke (диплоспория) и *P. pratensis* L., *P. chaixii* Vill. (апоспория).



Материал и методы

Материалом исследования послужили видеобразцы *P. pratensis*, *P. chaixii*, *P. badensis* из коллекции Ботанического сада Саратовского госуниверситета. Соцветия фиксировали ацеталкоголем (3:1) за 1 и 2 суток до начала цветения, в разгар цветения и через 1, 2, 3, 5, 10 и 15 суток после опыления. Структуру женских гаметофитов исследовали на классических микротомных препаратах, окрашенных гематоксилином [19], а также на препаратах просветленных семязачатков [20, 21] и целых зародышевых мешков, выделенных с использованием метода ферментативной мацерации с последующей диссекцией семязачатков [22]. Анализ просветленных препаратов проводили с помощью фазово-контрастного микроскопа «AxioStar Plus» (K. Zeiss, Германия). Во все сроки фиксации у каждого видеобразца анализировали в среднем по 100 зародышевых мешков. Всего была изучена структура около 3000 мегагаметофитов.

Для выявления полиэмбрионов среди проростков зерновки проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре +23°C. Частоту полиэмбрионии

определяли как отношение семян с несколькими проростками к общему числу исследованных, выраженное в процентах.

Фотографирование проводили с использованием программ визуализации изображения «Zoombrowser» и «AxioVision» на микроскопах «AxioStar Plus» и «AxioScope».

Результаты и их обсуждение

Изученные виды мятликов являются факультативными псевдогамными апомиктами, у которых зародыш развивается партеногенетически, а эндосперм формируется после оплодотворения центральной клетки. У *P. chaixii* и *P. pratensis* нередуцированный зародышевый мешок образуется из соматической клетки нуцеллуса в результате трех последовательных митозов в соответствии с Poa (Hieracium)-типом [15–18, 23, 24], у *P. badensis* – из нередуцированной клетки диады мегаспор в соответствии с Taхасит-типом [24, 25].

Проведенный анализ показал, что у растений всех трех видов при образовании зародышевых мешков и в процессе их дифференцировки создаются предпосылки к истинной и ложной полиэмбрионии (рис. 1, 2).

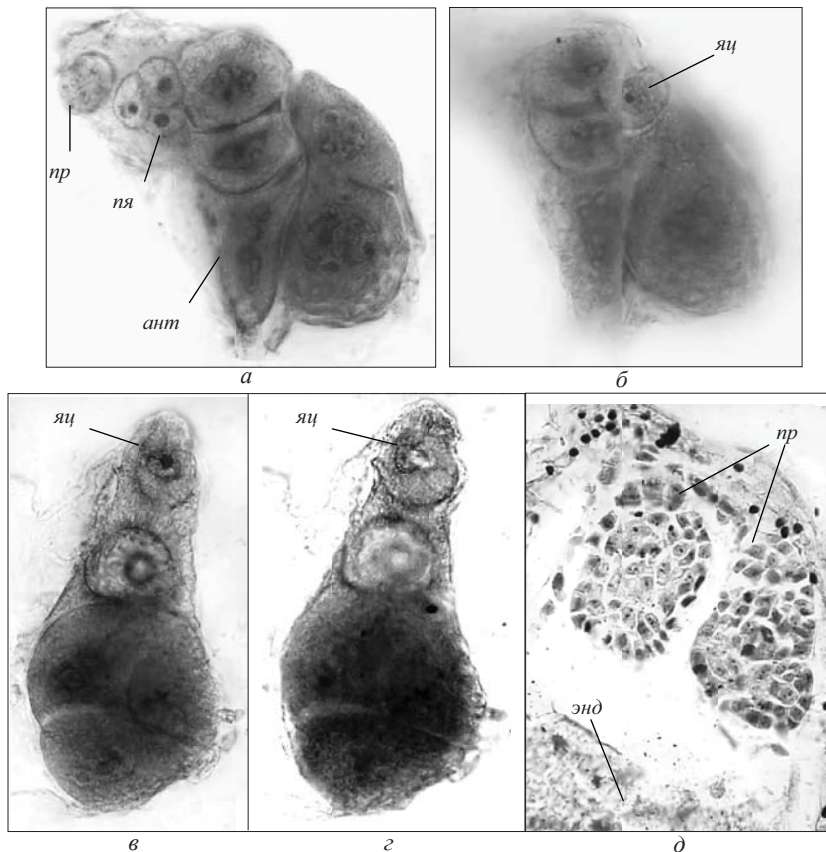


Рис. 1. Эмбриологические предпосылки к истинной полиэмбрионии (*P. pratensis*): а, б – зародышевый мешок с яйцеклеткоподобной антиподой (пр – проэмбрио, пя – полярные ядра, ант – антиподы, яц – яйцеклетка); в, г – зародышевый мешок с двумя яйцеклетками в яйцевом аппарате; д – два глобулярных проэмбрио и клеточный эндосперм (энд)

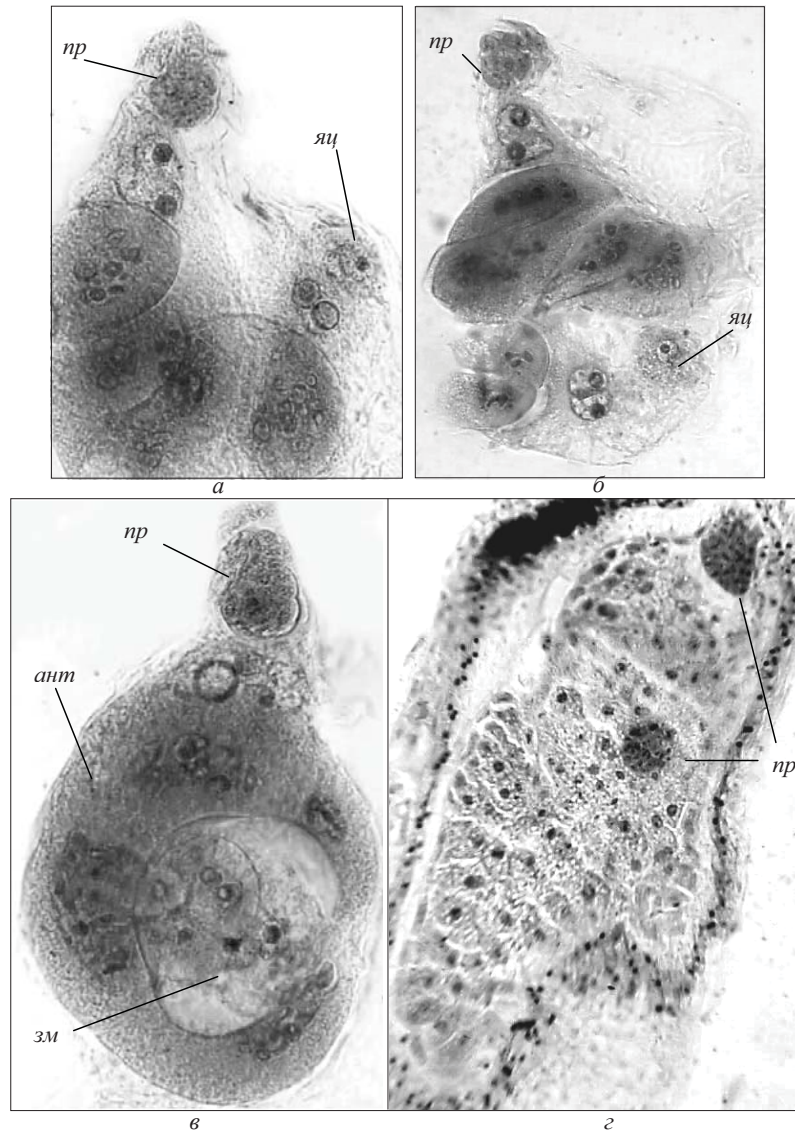


Рис. 2. Эмбриологические предпосылки к ложной полиэмбрионии (*P. pratensis*): а, б – двоянные зародышевые мешки, в одном из которых присутствует партеногенетический проэмбрио (*np*), в другом яйцеклетка (*яц*); в – два зародышевых мешка (*зм*), один из которых расположен внутри антиподального комплекса (*ант*) другого; з – два зародышевых мешка с проэмбрио и клеточным эндоспермом

Нарушение поляризации и дифференциации элементов женского гаметофита приводят к формированию дополнительных яйцеклеток вместо синергид и в исключительных случаях – антипод [26–29]. Полигаметия делает возможным развитие нескольких зародышей на базе одного мегагаметофита. Более высокой частотой полигаметии характеризовались апоспорические виды *P. pratensis* (5,7%) и *P. chaixii* (4,0%). У диплоспорического *P. badensis* она составила лишь 0,1%. Только у *P. pratensis* в одном зародышевом мешке дополнительная яйцеклетка присутствовала среди клеток антиподального комплекса (см. рис.1 а, б). Во всех остальных случаях яйцеклеткоподобными были синергиды (см. рис.1 в, з).

Предпосылки к ложной полиэмбрионии у изученных видов создаются за счет развития в семязачатках нескольких зародышевых мешков (см. рис. 2). У *P. pratensis* и *P. chaixii* около трети всех исследованных семязачатков содержали два, реже три и в единичных случаях четыре и пять мегагаметофитов (табл. 1). Высокая частота образования множественных зародышевых мешков типична для апоспорических видов. Во-первых, при этой форме апомиксиса может происходить одновременное развитие в семязачатке эуспорического и апоспорического зародышевых мешков. Во-вторых, нередко несколько соматических клеток нуцеллуса вступают на путь мегагаметофитогенеза.



Таблица 1

Частота образования семязачатков с несколькими мегаспорофитами у изученных видовобразцов

Вид	Количество исследованных семязачатков	Количество семязачатков с несколькими зародышевыми мешками, %			
		с двумя	с тремя	с четырьмя	с пятью
<i>P. badensis</i>	120	2,5	0,0	0,0	0,0
<i>P. chaixii</i>	102	27,4	3,9	0,0	0,0
<i>P. pratensis</i>	131	25,9	4,6	0,8	0,8

У *P. badensis* только 2,5% семязачатков содержали сдвоенные зародышевые мешки. К сожалению, нам не удалось достоверно определить механизм их образования. Можно предположить лишь, что в исключительных случаях обе клетки диады мегаспор дают начало зародышевому мешку.

Исходная высокая частота семязачатков с цитоэмбриологическими предпосылками к полиэмбрионии снижалась по мере созревания семени. На завершающих стадиях эмбриогенеза

более двух зародышей в одном семени уже не встречалось, а количество семязачатков с двумя зародышами даже у апоспорических видов было практически вчетверо меньше, чем сумма исходной частоты полигамии и частоты семязачатков с множественными зародышевыми мешками (табл. 2). При этом в некоторых семязачатках с двойнями наблюдалась остановка развития проэмбрио на глобулярной стадии из-за отсутствия эндосперма или его аномального строения (рис. 3, б).

Таблица 2

Структура семязачатков на завершающих стадиях развития зародыша и эндосперма

Вид	Количество семязачатков, %						
	Всего	С клеточным эндоспермом			С аномальным эндоспермом или без него		Без зародыша и эндосперма
		с одним дифференцированным зародышем	с двумя дифференцированными зародышами	без зародыша	с одним глобулярным проэмбрио	с двумя глобулярными проэмбрио	
<i>P. badensis</i>	130	92,6	0,7	0,7	3,0	1,5	1,5
<i>P. chaixii</i>	120	86,1	5,8	0,8	1,6	2,5	3,2
<i>P. pratensis</i>	115	80,0	7,0	2,7	1,7	4,3	4,3



Рис. 3. Семена *P. pratensis*: а – с дифференцированным зародышем (зар) и клеточным эндоспермом (энд) (норма, дана для сравнения); б – с двумя глобулярными проэмбрио (пр) и без эндосперма

На стадии проростков частота полиэмбрионии у *P. pratensis* составила 5,8%, у *P. chaixii* – 1,8%. Полиэмбрионы были представлены только двойнями (рис. 4). У *P. badensis* семян с близнецовыми проростками не обнаружено. Фактическая частота многозародышевых семян достоверно и значительно отличалась от теоретически ожидаемой (рис. 5, табл. 3). Все это свидетельствует о том, что предпосылки к полиэмбрионии в большинстве случаев остаются не реализованными. В ходе развития семени происходит дегенерация дублирующих структур: дополнительных зародышевых мешков, яйцеклеток и зародышей.

В качестве одной из основных причин снижения потенций к полиэмбрионии нередко указывается конкуренция между дублирующими генеративными структурами [2, 18]. Особенности образования и развития близнецов не гарантируют их абсолютной идентичности. Напротив, в большинстве случаев они различаются своими

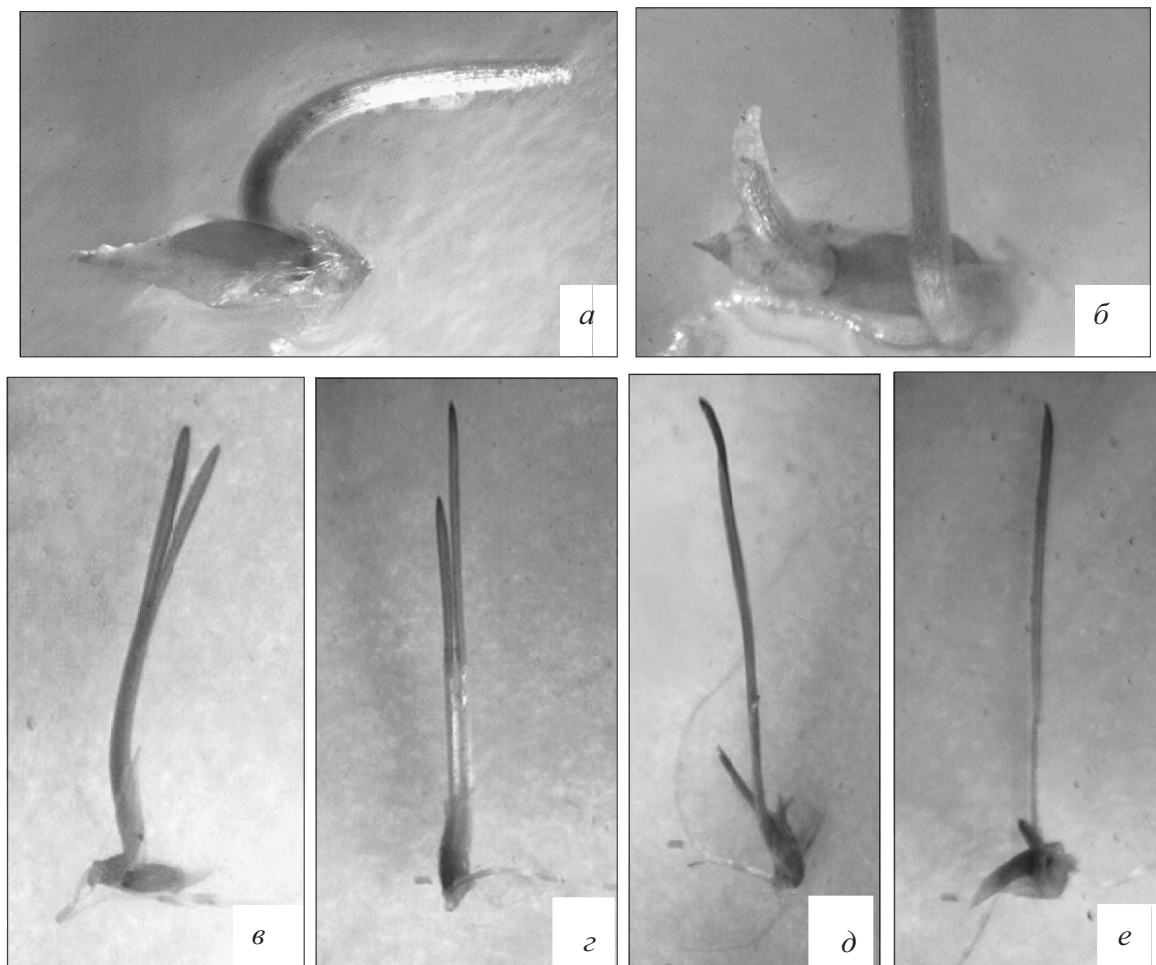


Рис. 4. Проросшие семена: а – с одним проростком (*P. badensis*); б – с двумя проростками, один из которых выходит из семени в базальной области (*P. pratensis*); в – с двумя проростками одинакового размера (*P. pratensis*); г–е – с двумя проростками разного размера (*P. chaixii*, *P. pratensis*)



Рис. 5. Исходная частота эмбриологических предпосылок к полиэмбрионии и фактическая частота семян с несколькими проростками у апомиктических видов мятликов



Таблица 3

Отклонение фактически установленных данных по частоте полиэмбрионии от теоретически ожидаемой величины (по методу χ^2)

Вид	Цитоэмбриологические предпосылки к полиэмбрионии, %		Теоретически ожидаемая частота полиэмбрионии	Фактическая частота полиэмбрионии	χ^2
	количество зародышевых мешков с дополнительными гаметам	количество семязачатков с несколькими зародышевыми мешками			
<i>P. badensis</i>	0,1	2,5	2,6	0,0	2,7
<i>P. chaixii</i>	4,0	31,5	35,5	1,8	49,6*
<i>P. pratensis</i>	5,7	32,1	37,8	5,8	43,5*

Примечание: χ^2_{st} {2,7; 3,84; 6,63}, *различия между теоретически ожидаемыми и фактически полученными данными достоверны при уровне значимости $p \geq 0,99$

генетическими характеристиками (например, уровнем пloidности), временем индукции к развитию и взаимным расположением. Генетические различия, прежде всего, определяются разным способом происхождения дублирующих структур. Так, формирование зародышевых мешков в одном семязачатке может идти с участием мейоза и в его отсутствии, зародыш может развиваться партеногенетически и в результате оплодотворения. Генотип и уровень пloidности

зародышей может оказать существенное влияние на их развитие и конкурентоспособность.

Из-за разного времени индукции к развитию отстающая в росте структура может угнетаться более развитым аналогом. У *P. pratensis* и *P. chaixii* были зарегистрированы случаи, когда морфогенез зародышей нарушался вследствие того, что он оказывался сдавленным соседним зародышем (рис. 6 а, б) или соседним мегагаметофитом (см. рис. 6 в).

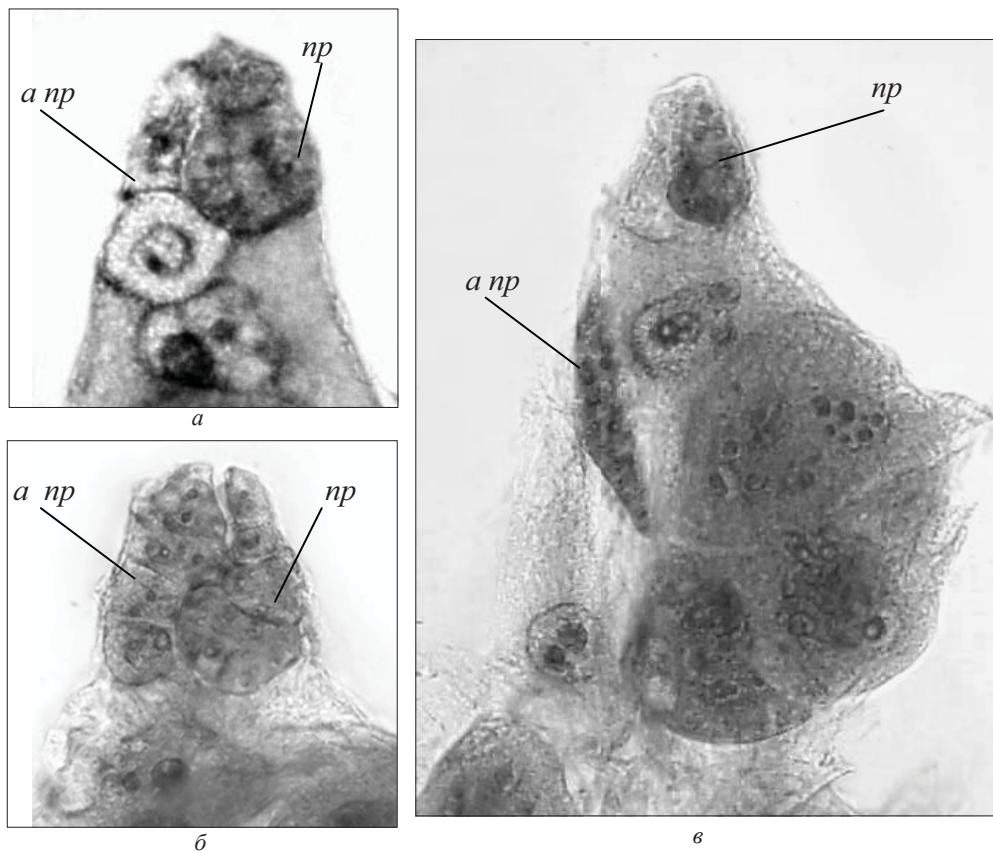


Рис. 6. Нарушение морфологии одного из близнецовых зародышей: а, б – зародышевый мешок с двумя проэмбрио, один из которых имеет нетипичную морфологию (а np); в – два зародышевых мешка, в одном из которых проэмбрио имеет веретенообразную форму



Существенным препятствием на пути реализации цитоэмбриологических предпосылок к полиэмбрионии является остановка эмбриогенеза в результате аномального развития эндосперма или его отсутствия (см. рис. 3, б). Центральная клетка зародышевого мешка может остаться неоплодотворенной по разным причинам. Прежде всего, низкое качество пыльцы, характерное для апомиктов, снижает вероятность успешного опыления. Средняя степень дефектности пыльцы составила у *P. badensis* $59,8 \pm 4,7\%$, *P. chaixii* – $45,26 \pm 6,8\%$, *P. pratensis* – $47,23 \pm 16,2\%$.

Кроме того, расположение в семязачатке некоторых из множественных зародышевых мешков затрудняет проникновение в них пыльцевых трубок. Дополнительные зародышевые мешки у *P. pratensis* и *P. chaixii* нередко располагались перпендикулярно микропилярно-халазальной оси семязачатка под антиподами соседнего мегагаметофита (см. рис. 2, б), а иногда даже внутри его антиподального комплекса (см. рис. 2, в, табл. 4). Проникновение пыльцевых трубок в такие зародышевые мешки проблематично, а следовательно, для них существует риск остаться неоплодотворенными.

Таблица 4

Расположение множественных зародышевых мешков в семязачатках

Вид	Количество семязачатков с несколькими зародышевыми мешками, %				
	Всего	Расположение зародышевых мешков			
		параллельно друг другу	перпендикулярно друг другу	под углом менее 90° друг к другу	один мегагаметофит лежит внутри антиподального комплекса другого
<i>P. badensis</i>	3	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. chaixii</i>	32	53,1	15,6	15,6	9,4
<i>P. pratensis</i>	42	57,1	21,4	11,9	9,9

Таким образом, при разных типах апомиксиса у мятликов на ранних стадиях эмбриологического развития создаются цитоэмбриологические предпосылки к ложной полиэмбрионии вследствие развития в семязачатках нескольких мегагаметофитов и предпосылки к истинной полиэмбрионии в результате формирования в зародышевых мешках нескольких яйцеклеток. Частота образования множественных мегагаметофитов существенно превышает частоту полигаметии. Апоспорические виды *P. pratensis* и *P. chaixii* обладают более высоким потенциалом для производства семян с добавочными зародышами по сравнению с диплоспорическим *P. badensis*. Значительное отклонение теоретически ожидаемой частоты полиэмбрионии от фактической и результаты цитоэмбриологического анализа свидетельствуют в пользу того, что среди дублирующих структур (зародышевых мешков, яйцеклеток и зародышей) в процессе их развития осуществляется клеточная селекция, в результате которой выживают наиболее жизнеспособные и занимающие в семязачатке более выгодное для нормального развития положение. Кроме того, низкое качество пыльцы, аномалии или отсутствие развития эндосперма могут служить существенным препятствием на пути реализации потенций к полиэмбрионии.

Список литературы

1. Лакиманан К. К., Амбегаокар К. Б. Полиэмбриония // Эмбриология растений : использование в генетике, селекции, биотехнологии : в 2 т. Т. 2. / под ред. В. М. Джори. М. : Агропромиздат, 1990. С. 5–38.
2. Батыгина Т. Б., Виноградова Г. Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян // Онтогенез. 2007. Т. 38, № 3. С. 166–191.
3. Ernst A. Bastardierung als Ursache der Apogamie in Pflanzenreiche Eine Hypothese zur experimentellen Verebings und Abstammunglehre. Jena : G. Fischer, 1918. 666 s.
4. Webber J. M. Polyembryony // Bot. Rev. 1940. Vol. 6. № 11. P. 575–598.
5. Maheschwari P. Polyembryony in Angiosperms // Paleobotanist. 1952. Vol. 1. P. 319–329.
6. Lebegue A. La polyembryonie chez les Angiospermes // Bull. Soc. Bot. France. 1952. Vol. 99. P. 329–367.
7. Lebegue A. Nouveaux aspects d'une classification embryologique // Bull. Soc. Bot. France. 1966. Vol. 113. P. 3–9.
8. Селиванов А. С. Многозародышевость семян и селекция. Саратов : Изд-во Сарат. ун-та, 1983. Ч. 1. 83 с.
9. Carman J. G. Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives // Apomixis Newsletter. 1995. № 8. P. 39–53.
10. Carman J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony // Biol. J. Linn. Soc. 1997. Vol. 61, № 1. P. 51–94.



11. Солнцева М. П. Проблемы апогамии // Бот. журн. 1999. Т. 84, № 8. С. 1–23.
12. Czapik R. Non-functional aposporous embryo sacs in flowering plants // XVII Inter. Cong. On Sex. Plant Reproduction. Abstr. Lublin, 2002. P. 48.
13. Шишкинская Н. А., Юдакова О. И., Тырнов В. С. Популяционная эмбриология и апомиксис у злаков. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2004. 145 с.
14. Nishimura M. On the germination and polyembryony of *Poa pratensis* L. // Bot. Mag. Tokyo, 1922. P. 36.
15. Батыгина Т. Б., Маметьева Т. Б. К эмбриологии рода *Poa* L. // Актуальные вопросы эмбриологии покрытосеменных. Л. : Наука, 1979. С. 89–95.
16. Батыгина Т. Б., Фрейберг Т. Е. Полиэмбриония у *Poa pratensis* L. (*Poaceae*) // Бот. журн. 1979. Т. 64, № 6. С. 793–804.
17. Кутлунина Н.А. Эмбриологическое изучение апомиксиса у образцов мятлика лугового (*Poa pratensis* L.), перспективных для селекции : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 1999. 20 с.
18. Кутлунина Н. А. Эмбриологическое изучение апомиксиса и полиэмбрионии у мятлика лугового // Итоги интродукции и селекции травянистых растений на Урале. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2001. С. 197–214.
19. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. Изд. 4-е. М. : Агропромиздат, 1988. 272 с.
20. Herr Jm. J. M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. Vol. 20, № 8. P. 785–790.
21. Юдакова О. И., Гуторова О.В., Беляченко Ю. А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2012. 38 с.
22. Куприянов П. Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка // Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. С. 155–163.
23. Юдакова О. И., Шакина Т. Н. Псевдогамный апомиксис у *Poa chaixii* Vill. // Изв. высших учеб. заведений. Поволж. регион. 2006. № 5. С. 277–283.
24. Yudakova O. I., Shakina T. N. Apomixis in *Poa chaixii* Vill. and *P. badensis* Haenke // 3rd Inter. Apomixis Conf. Wernigerode, Germany. 27 June – 1 July 2007. Abst. Germany, 2007. P. 29.
25. Шакина Т. Н., Юдакова О. И. Апомиксис у *Poa badensis* Haenke // Бюл. Бот. сада Саратов. ун-та. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2007. Вып. 6. С. 102–104.
26. Шишкинская Н. А., Юдакова О. И., Тырнов В. С. Полигамия // Бот. исследования в азиатской России : материалы XI съезда РБО : в 2 т. Барнаул, 2003. Т. 2. С. 176–177.
27. Шишкинская Н. А., Юдакова О. И., Тырнов В. С. Явление полигамии у растений и его возможные эволюционно-генетические эффекты // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2005. Т. 5, вып. 2. С. 25–32.
28. Юдакова О. И., Шишкинская Н. А. Эмбриологические особенности апомиктических злаков. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2008. 105 с.
29. Юдакова О. И. Аномалии развития женского гаметофита у апомиктических форм мятликов // Онтогенез. 2009. Т. 40, № 3. С. 38–46.