

УДК 581.143.6

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

С. А. РЕЗНИКОВА

МИКРОСПОРОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ *LILIAM CANDIDUM* L.

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 26 V 1971)

Метод культуры изолированных пыльников значительно расширяет возможности исследования физиолого-биохимических механизмов мейоза и дифференциации микроспор. Культура пыльников *in vitro* может быть также использована для изучения природы различных отклонений от нормального хода мейоза и процессов тканевого взаимодействия при дифференциации микроспор, характерных для гибридных и полиплоидных форм растений и форм с цитоплазматической мужской стерильностью.

При разработке и применении методики культивирования изолированных пыльников возникли трудности, обусловленные специфическими требованиями обмена вещества в процессе формирования пыльцы. Рядом исследователей изучались питательные среды, методы работы и условия выращивания пыльников *in vitro* (¹⁻⁶). Лучшее развитие пыльцы было достигнуто у *Trillium erectum* (⁵) на среде с добавлением 25—50% кокового молока. При культивировании пыльников в течение 19 недель при температуре +4° были получены двуклеточные пыльцевые зерна в пыльниках, эксплантированных на питательную среду на стадии пахинеи. Митоз в микроспорах наблюдали также у *Secale cereale* (⁴) и *Allium* сера при изолировании пыльников на стадии одноклеточных микроспор, за 1—2 сут. до наступления этого процесса.

При помещении на питательную среду не отдельных пыльников, а андроев или цветочных бутонов с удаленными околоцветниками (⁷), а также целых цветочных почек (⁸) мейоз и развитие микроспор проходят более успешно. Однако наличие большого количества соматических тканей нежелательно, так как осложняет выявление физиолого-биохимических закономерностей формирования и дифференциации микроспор. Разработанная в последние годы методика культивирования изолированных микроспороцитов (⁹) оказалась наиболее результативной при изучении биохимии мейоза.

В результате проведенных исследований по культивированию микроспороцитов, пыльников и андроев получены данные, характеризующие некоторые этапы и механизмы мейоза и дифференциации микроспор (^{7, 10}). К сожалению, возможности экспериментального изучения мейоза и дифференциации микроспор при культивировании изолированных пыльников ограничены определенными стадиями микроспорогенеза. До настоящего времени, как правило, не удавалось успешно культивировать пыльники в течение всего микроспорогенеза. Регулярный мейоз в изолированных пыльниках получен при эксплантации их в поздней лептоне и зигонеме (³), а митоз в микроспорах — при эксплантации в поздней интерфазе (⁴).

Настоящее исследование предпринято с целью выяснения причин, ограничивающих развитие микроспороцитов и микроспор *in vitro*.

Пыльники *Lilium candidum* L. изолировались из бутонов, начиная со стадии ранней премейотической интерфазы до стадии зрелых одноклеточ-

ных микроспор. Минеральная часть применявшейся нами питательной среды заимствована у Спарроу (⁵) с добавлением некоторых физиологически активных веществ. Культивировались отдельные пыльники и андроеи. Стадия мейоза и развития микроспор определялась для каждого бутона путем анализа одного пыльника при эксплантации.

Пыльники культивировались в прозрачных камерах при дополнительном круглосуточном освещении с помощью люминесцентных ламп (около 5 тыс. лкс/м²) при температуре 8—10 и 24—25°. Состав питательной среды (в мг/л): Ca(NO₃)₂·4H₂O 236; MgSO₄·7H₂O 36; KNO₃ 81; KCl 65; KH₂PO₄ 20; MnSO₄ 2,032; ZnSO₄·7H₂O 0,5; H₃BO₃ 1,0; CuSO₄·5H₂O 0,025; Na₂MoO₄ 0,213; FeCl₃ 1,0; C₆H₅O₆ 1,0; тиамин 0,08; пиридоксин-HCl 0,08; никотиновая кислота 0,4; биотин 0,04; L-цистеин 5,0; глутатон 4,0; β-ИУК 0,01; кинетин 0,05; сахараза 40 г/л; агар Дифко 7,0 г/л.

Среда стерилизовалась в автоклаве при давлении 0,75 атм. в течение 20 мин. Бутоны обрабатывались 8% раствором хлорной извести 5—6 мин. и тщательно промывались стерильной бидистиллированной водой. Затем бутоны вскрывались и пыльники асептически помещались в широкие пробирки на питательную среду. При культивировании андроеев после стерилизации бутонов удалялись околоцветники и гинецеи.

Культивируемый материал фиксировали по Карнуа (6:3:1) через определенные сроки после опыта и заливали в парафин. Срезы окрашивались основным фуксином по Фельгену с подкраской светлым зеленым. Готовились также временные ацетокарминовые препараты. Динамика крахмала в пыльниках изучалась с помощью реактива Люголя на нефиксированном материале.

Пыльники, эксплантированные на питательную среду до мейоза, в течение мейотических стадий, а также вскоре после его завершения, прекращали свое развитие раньше, чем в них сформировались зрелые пыльцевые зерна. Так, пыльники, изолированные на стадии ранней премейотической интерфазы, продвигались до лептонеми. В отдельных клетках были обнаружены сильно измененные метафазы I деления мейоза.

Микроспороциты в пыльниках, изолированных в ранней лептонеми, вступают в мейоз. При этом наблюдаются нарушения, касающиеся конъюгации и расхождения хромосом. В диакинезе и метафазе I обнаруживаются биваленты с пониженным числом хиазм (рис. 1а). Иногда хромосомы не конъюгируют, и тогда можно наблюдать в метафазе I деления 24 сильно деспирализованные хромосомы (рис. 1б). Часто сконъюгированные хромосомы также деспирализованы в разной степени (рис. 1в). В результате нарушения расхождения деспирализованных хромосом сформировавшиеся тетрады включают микроспоры, имеющие ядра различной величины и микроядра. Наблюдается потеря синхронности в прохождении стадий мейоза отдельными микроспороцитами. Иногда отсутствует II деление мейоза. В некоторых случаях деления в мейозе не сопровождаются цитокинезом. Каллозная оболочка тетрад сильно редуцирована, а иногда полностью отсутствует (рис. 1г, см. вклейку к стр. 713).

В пыльниках, изолированных в зигонеми, мейоз проходит без заметных нарушений. Обычно формируются правильные тетрады (рис. 1д), которые, распадаясь, дают начало одноядерным микроспорам, не достигающим, однако, митоза. Пыльники, изолированные в метафазе I — анафазе I и на стадии тетрад, также не продвигаются в своем развитии дальше одноклеточных микроспор. В пыльниках, эксплантированных на питательную среду на стадии молодых одноклеточных микроспор с тонкой оболочкой, часть микроспор вступает в митоз. Однако цитокинез при этом отсутствует. При помещении на питательную среду пыльников на стадии одноклеточных микроспор с заметной оболочкой, но еще не содержащих крахмала (за 7—8 дней до начала митоза *in situ*), до 50% микроспор переходит к митозу (рис. 1е). Однако дальнейшее дифференцирование пыльце-

вых зерен сильно нарушено. Часто оба или одно из сформировавшихся ядер делаются вторично. Таким образом, большая часть пыльцевых зерен содержат три или четыре ядра, которые могут быть одинаковыми или различаются по величине и морфологии (рис. 1ж, з). Во многих случаях делению ядер не сопутствует цитокинез. Сформировавшиеся пыльцевые зерна часто прорастают в пыльниках (¹¹).

При эксплантации пыльников накануне митотической профазы микроспоры полностью превращаются в двуклеточные пыльцевые зерна. В этом случае дифференцирование пыльцевых зерен нарушается редко. Такие пыльцевые зерна способны прорасти на искусственной питательной среде, содержащей агар и сахарозу, и на рыльце.

В стенке культивируемых пыльников наблюдаются явно выраженные процессы распада, захватывающие постепенно тапетум, средний слой и эндотелий. Наиболее глубоки эти изменения при эксплантации пыльников на питательную среду в премейотической интерфазе и ранней лептоне. При этом по мере прохождения микроспороцитами мейотических стадий обычно полностью разрушается содержимое клеток тапетума. Значительно позднее разрушается тапетум при эксплантации пыльников в зигонеме. Однако к моменту образования микроспор он также подвергается деструкции, тогда как в пыльниках *L. candidum* in situ тапетум разрушается незадолго до начала профазы в ядре микроспор.

Важная роль метаболизма углеводов в процессах клеточного деления и дифференциации (¹², ¹³) заставила нас провести изучение локализации и динамики накопления крахмала в процессе микроспорогенеза в культивируемых пыльниках в сравнении с пыльниками, развивающимися на растении. Исследование показало, что в культивируемых пыльниках резко нарушается динамика накопления крахмала. Уже через сутки после помещения премейотических пыльников на питательную среду при температуре 24—25° в стенке пыльников не остается запасного крахмала, который в большом количестве обнаруживается у интактных пыльников на той же стадии.

Эффективным приемом сохранения крахмала у пыльников явилось культивирование их при пониженной температуре (8—10°), при которой получены приведенные выше результаты. При культивировании андроев крахмал еще дольше сохраняется в стенке пыльника, тапетум разрушается позднее, а пыльники дальше продвигаются в своем развитии (рис. 2).

Прохождение пыльниками in vitro отдельных этапов микроспорогенеза в зависимости от стадии эксплантации отражает, по-видимому, существование определенных критических событий в микроспорогенезе in situ. Это премейотический синтез ДНК в поздней интерфазе (¹⁴, ¹⁵), синтез ДНК и белков в профазе мейоза (¹⁰) и в поздней интерфазе микроспор (¹⁴, ¹⁶). Большое значение имеет также корреляция процессов, происхо-

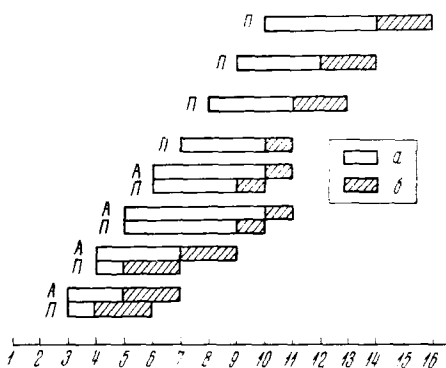


Рис. 2. Прохождение микроспорогенеза в изолированных пыльниках (П) и андроеях (А) у *L. candidum* без отклонений (а) и с отклонениями (б). Обозначение стадий: спорогенная ткань (1), митозы в спорогенной ткани (2), ранняя интерфаза (3), ранняя лептонема (4), зигонема (5), диплонема — метафаза I (6), тетрады микроспор (7), молодые одноклеточные микроспоры с тонкой оболочкой (8), одноклеточные микроспоры с заметной оболочкой (9), зрелые одноклеточные микроспоры (10), поздняя интерфаза микроспор (11), митоз микроспор (12), молодые двуклеточные пыльцевые зерна (13), генеративная клетка у стенки пыльцевого зерна (14), генеративная клетка в центре пыльцевого зерна (15), накануне раскрытия цветка

дящих в развивающихся микроспороцитах и в тканях стенки пыльника. Важная роль в этих взаимоотношениях принадлежит тапетуму, правильное функционирование которого необходимо для построения оболочки микроспор (¹⁴). Необходимым условием является, очевидно, и обеспечение делящихся и дифференцирующихся клеток углеводами (¹², ¹³).

Обнаруженные нами аномалии при культивировании пыльников *L. candidum*, изолированных в поздней премейотической интерфазе и ранней лептонеме, аналогичны специфическим отклонениям, вызванным экспериментальным блокированием синтеза белка на более поздних этапах мейоза — в зигоне и пахине (¹⁰). Можно предположить, что при достижении этих стадий культивируемыми пыльниками в них нарушается синтез белков, необходимых для нормального хода мейоза.

Преждевременная деструкция тапетума приводит к нарушению формирования оболочки микроспор, что препятствует их дальнейшей дифференциации.

Причиной нарушения биосинтетических процессов в клетках культивируемых пыльников и ранней деструкции тапетума может быть дефицит углеводов, баланс которых нарушается при перенесении пыльников на искусственную питательную среду. Как известно, углеводы служат источником энергии и могут быть использованы как предшественники для синтеза нуклеиновых кислот и белков.

Приемы, направленные на сохранение запасного крахмала (культивирование андроцеев, пониженная температура, обеспечивающая низкий уровень метаболизма в культивируемых пыльниках), позволяют увеличить продолжительность нормального хода микроспорогенеза *in vitro*.

Автор выражает благодарность Р. Г. Бутенко и З. Б. Шаминой за постоянный интерес к работе и ценные консультации и В. М. Семенову за техническую помощь в освоении культуры пыльников.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт афимасличных культур
Симферополь

Поступило
25 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. C. Gregory, *Am. J. Bot.*, **27**, 687 (1940). ² F. St. Gimesi, W. Frenyo, G. L. Farbas, *Acta Biol. Hung.*, **1**, 37 (1949). ³ J. H. Taylor, *Am. J. Bot.*, **37**, 137 (1950). ⁴ A. Lima-de-Faria, *Hereditas*, **36**, 106 (1950). ⁵ A. H. Sparrow, V. Pond, S. Kojan, *Am. J. Bot.*, **42**, 384 (1955). ⁶ I. K. Vasil, *In Plant Tissue Culture*, Berkley, California, 1965. ⁷ A. S. Rodrigues Pereira, H. F. Lins-kens, *Acta Bot. Neerl.*, **12**, 302 (1963). ⁸ И. И. Лешковцева, *Физиол. раст.*, **14**, в. 4, 710 (1967). ⁹ M. Ito, H. Stern, *Developm. biol.*, **16**, 36 (1967). ¹⁰ H. Stern, Y. Hotta, *Genetics Suppl.*, **61**, 27 (1969). ¹¹ С. А. Резникова, В сборн. *Культура изолированных органов, тканей и клеток растений*, Тр. I Всесоюзн. конфер. М., 1970. ¹² G. W. R. Walker, J. F. Dietrich, *Canad. J. Genet. Cytol.*, **3**, 170 (1961). ¹³ P. L. Webster, J. Van't Hof, *Exp. Cell Res.*, **55**, 88 (1969). ¹⁴ J. H. Taylor, *Am. J. Bot.*, **46**, 477 (1959). ¹⁵ С. А. Резникова, В. О. Островерхов, *ДАН*, **124**, 695 (1970). ¹⁶ J. W. Woodard, *J. Biochem. and Biophys. Cytol.*, **4**, 383 (1958).