

УДК 581.5:470.44/47

Е. В. Ляпустина, Т. Н. Сатарова

*Український державний хіміко-технологічний університет  
Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара*

### **ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША КУКУРУЗЫ *IN VIVO***

Исследована динамика развития и строение зародыша у кукурузы в природных условиях на примере гибрида ДК633/266×ДК411. Установлена последовательность формирования основных элементов зародыша модельного гибрида в зависимости от его возраста, которая может быть использована в биотехнологических исследованиях для изоляции зародыша на соответствующей стадии развития. Определено, что на 14-е сутки после опыления сформированы все основные структурные элементы зародыша кукурузы.

О. В. Ляпустина, Т. М. Сатарова

*Український державний хіміко-технологічний університет  
Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара*

### **ДИНАМІКА РОЗВИТКУ ЗАРОДКА КУКУРУДЗИ *IN VIVO***

Досліджено динаміку розвитку та будову зародка у кукурудзи в природних умовах на прикладі гібриду ДК633/266×ДК411. Установлено, що послідовність формування основних елементів зародка модельного гібриду залежно від його віку може бути використана у біотехнологічних дослідженнях для ізоляції зародка на відповідній стадії розвитку. Визначено, що на 14-ту добу після запилення сформовані всі основні структурні елементи зародка кукурудзи.

E. V. Lyapustina, T. N. Satarova

*Ukrainian State University of Chemical Engineering, Dnipropetrovsk National University*

### **DYNAMICS OF DEVELOPMENT OF THE MAIZE EMBRYO *IN VIVO***

The development dynamics and the structure of maize hybrid DK633/266×DK411 embryo in natural conditions were studied. The sequence of formation of basic embryo elements of the model hybrid according to its age could be used in biotechnological research for embryo isolation at a corresponding developmental stage. In the 14<sup>th</sup> day after pollination all the structural elements of embryo had been formed.

#### **Введение**

Процесс двойного оплодотворения лежит в основе семенной репродукции и обеспечивает колоссальные эволюционные преимущества цветковым растениям. Это явление считается ключевым моментом в развитии растительного организма. В процессе двойного оплодотворения женские гаметы (гаплоидная яйцеклетка и диплоидная центральная клетка зародышевого мешка) объединяются с мужскими гаметами (двумя гаплоидными спермиями пыльцевого зерна), в результате чего возникают диплоидная зигота и триплоидная первичная клетка эндосперма. Зигота дает начало зародышу – новому растительному организму, а из первичной клетки развивается эндосперм, который играет важную роль в формировании и созревании зародыша, про-

растении семени и на начальных этапах жизнедеятельности проростка. Тип эмбриогенеза и тип эндоспермиогенеза закреплены генетически и являются постоянными в пределах вида, а скорость развития зародыша и эндосперма, их размеры, соотношения структурных элементов и физиологические особенности характеризуются внутривидовым разнообразием, зависят от генотипа и условий произрастания материнского растения.

Исследования по сравнительному эмбриогенезу внесли важный вклад в развитие теоретической биологии, в частности, в понимание феноменов дифференциации и дедифференциации клеток, закономерностей амфимиксиса и апомиксиса и их значения в семенной репродукции цветковых растений. Сравнение развития половых и апомиктических зародышей цветковых (зиготических и соматических, включая андрогенные) показало общность путей эмбриогенеза для спорофитных и гаметофитных структур различного уровня пloidности [7; 13], что говорит о главенствующей роли тотипотентности в судьбе клеток растительного организма. В исследованиях, выполненных в последние годы [10; 13], продемонстрировано, что гены, функционирующие в раннем эмбриогенезе и эндоспермиогенезе, экспрессируются в том числе и в структурах, возникших не в результате оплодотворения. И тем не менее они приводят к формированию зародышеподобных структур. Развернувшиеся исследования молекулярно-генетического контроля автономного развития зародыша и эндосперма, известного для некоторых видов в норме, а для других – лишь у мутантных форм [12], позволяют прогнозировать широкие возможности использования отклонений от типичного полового воспроизведения у цветковых растений для решения фундаментальных и практических задач.

Изучение эмбриогенеза имеет прикладное значение для таких областей как селекция и биотехнология растений. Большинство биотехнологических разработок основано на использовании в качестве эксплантатов генеративных органов и эмбриональных структур (пыльник, пыльцевое зерно, семязачаток, яйцеклетка, молодые семена, эндосперм и, в особенности, зародыш). Зародыши различного возраста составляют основу эмбриокультуры *in vitro* для решения проблем прорастания, межвидовой и внутривидовой гибридизации, покоя семян, хранения незрелого селекционного материала и получения дополнительных генераций в течение года, искусственного оплодотворения, культуры зигот и проэмбрио [4; 15]. У злаков незрелые зародыши являются наилучшими эксплантатами для получения каллусной ткани и регенерации растения в биотехнологических исследованиях, включая генно-инженерные манипуляции.

Изучению эмбриогенеза у кукурузы посвящен ряд публикаций [1; 2; 8; 9; 17], в которых, несмотря на некоторые спорные моменты, в целом дана морфогенетическая и ультраструктурная характеристика последовательных стадий гисто- и органогенеза зародыша. В работах последних лет большое внимание сосредоточено на молекулярно-генетических аспектах эмбриогенеза, сложных взаимоотношениях материнского и отцовского геномов в зиготе, зародыше и эндосперме, что проявляется в феномене импринтинга, морфогенетических корреляциях развития зародыша и эндосперма, характеристике сигналов, задействованных в регуляции экспрессии определенных генов в этих структурах. Особо важно изучение дифференциальной экспрессии генов в зародыше и эндосперме, ее регуляции и координации для гибридных форм кукурузы в связи с проявлением гетерозиса с самых ранних этапов формирования спорофита [6; 11; 14; 16].

Развитие селекции кукурузы ставит новые задачи перед биотехнологией этой культуры. Одна из таких перспективных задач – разработка технологии искусственного оплодотворения и дорашивания *in vitro* полученных зигот, зародышей и семян [5]. Для развития работ в этом направлении очень важным является знание особенностей

развития зародыша, включая тайминг наступления тех или иных стадий, в конкретных условиях произрастания у определенного генотипа для сравнения с развитием зародыша *in vitro*. В связи с этим цель данного исследования – охарактеризовать динамику эмбрионального периода развития зародыша в естественных условиях у модельного гибрида кукурузы.

#### Материал и методы исследований

Материалом исследования служили зерновки различного возраста модельного позднеспелого гибрида кукурузы ДК633/266×ДК411. Растения кукурузы выращивались в полевых условиях Днепропетровской области с мая по август по общепринятой методике. Зерновки с зародышами фиксировали темпорально с первых по четырнадцатые сутки после опыления фиксатором FAA. Постоянные микроскопические препараты готовили по общепринятой методике [3]. Толщина срезов составила 12 мкм. Применяли метод тройного окрашивания постоянных препаратов сафранином по Картису, альциановым синим и гематоксилином по Эрлиху. Анализ постоянных препаратов проведен под микроскопом МИКМЕД-5, микрофотографии получены с помощью фотоаппарата Canon PowerShot A590 IS.

#### Результаты и их обсуждение

Завязь в цветке на початке исследованного гибрида кукурузы одногнездная, содержит один семязачаток. Семязачаток сидячий, с мощно развитой плацентохалазой, крассинуцелятный, битегмальный (рис. 1а). Микропиле сформировано сомкнутыми концами внутреннего интегумента. Нуцеллярный колпачок присутствует до трех суток после опыления.

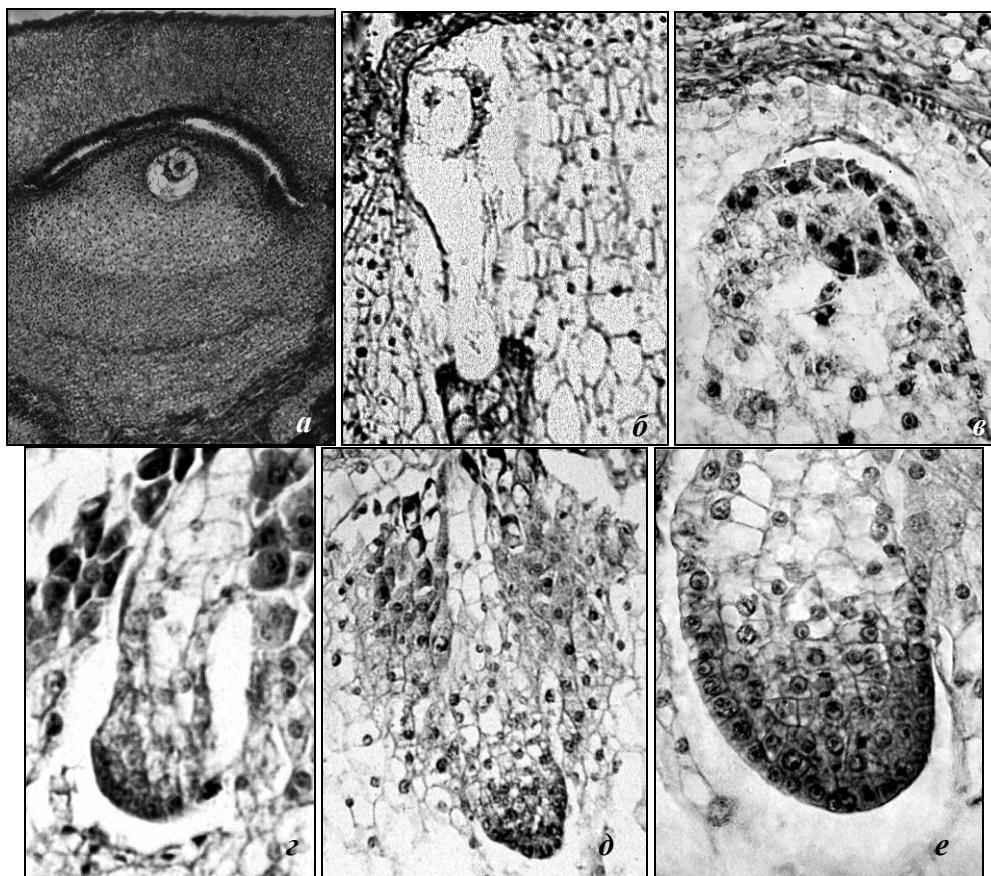
На 1-е сутки после опыления в зародышевом мешке сохраняются остатки синергид с хорошо различимым нитчатым аппаратом и более 15 антипод. Зигота имеет полярное строение, ядро и густая цитоплазма сконцентрированы в апикальной части, крупная вакуоль – в базальной (см. рис. 1б). Эндосперм ядерный.

На 3-и сутки после опыления (см. рис. 1в) тело зародыша имеет шаровидную форму и на поперечных срезах характеризуется радиальной симметрией. Зародыш имеет подвесок, эндосперм заканчивает переход к клеточной стадии.

На 6-е сутки после опыления (см. рис. 1г) эпидерма, которая дифференцировалась в базипетальном направлении, полностью сформирована. Зародыш имеет булавовидную форму. Тело зародыша сферическое, клетки мелкие, густоплазменные, подвесок достигает значительной длины, его клетки вытянуты в продольном направлении и сильно вакуолизированы.

На 7-е сутки (см. рис. 1д, е) вследствие активных клеточных делений происходит разрастание апикально-латеральной области тела зародыша со стороны плацентохалазы, что ведет к вычленению семядоли, или щитка. На 7–8-е сутки наблюдается значительный линейный рост за счет увеличения подвеска и деления клеток в области тела зародыша.

На 8-е сутки происходит обособление зародышевой оси со стороны, противоположной выделившемуся щитку (рис. 2а). Первой на зародышевой оси вычленяется точка роста стебля. В дальнейшем в процессе органогенеза в зародыше происходят сложные преобразования, в результате которых щиток смещается из латерального положения в терминальное, а точка роста побега – из терминального в латеральное.



**Рис. 1. Эмбриональное развитие кукурузы на 1–7-е сутки после опыления:**

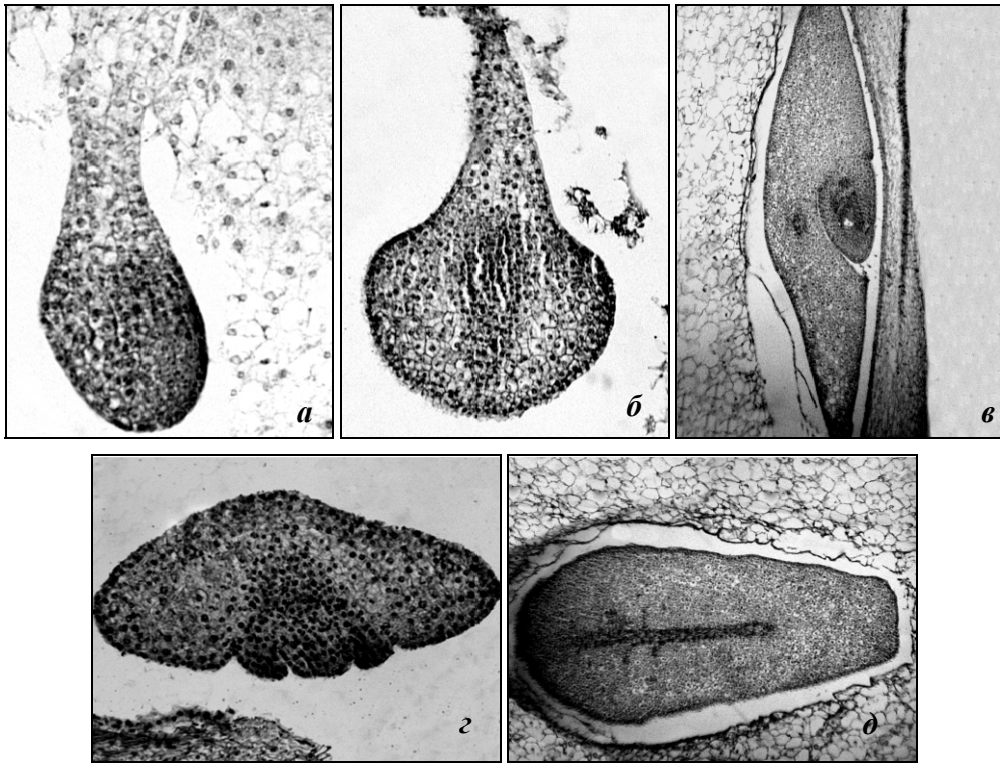
*a* – семязачаток на 2-е сутки после опыления; *б* – зародышевый мешок на 1-е сутки после опыления; *в* – зародыш и эндосперм на 3-и сутки после опыления; *з* – зародыш на 6-е сутки после опыления; *д, е* – зародыш на 7-е сутки после опыления; оптическое увеличение *a* –  $\times 100$ , *б–е* –  $\times 400$

На 9-е сутки после опыления хорошо просматривается зародышевая ось. На продольных срезах зародыш имеет характерную форму (см. рис. 2*б*). Подвесок становится массивным, происходит дальнейшее увеличение тела зародыша и дифференциация точки роста стебля.

У 10–11-суточных зародышей происходят активные деления в апексе побега и обособление колеоптиля (см. рис. 2*в, з*). Наблюдается повышение меристематической активности в радикулярной области зародышевой оси и формирование прокамбиальных тяжей в щитке.

На 13-е сутки наблюдается вычленение инициалей главного зародышевого корня, идет дифференцировка прокамбиального тяжа в щитке (см. рис. 2*д*), четко выражена почечка зародыша.

14-суточные зародыши массивные (рис. 3*а*), клетки эндосперма к этому времени заполнены крупными глобулами крахмала (см. рис. 3*б*). На этой стадии сохраняется подвесок (см. рис. 3*в, з*), в почечке присутствуют меристема стебля, две пары настоящих листьев и колеоптиль (см. рис. 3*д*). В корневой зоне выделяется мощная колеориза и эндогенно вычленившийся зародышевый корень (см. рис. 3*е*). В последнем хорошо различимы чехлик, меристематическая зона, начинается дифференциация проводящей системы.



**Рис. 2. Эмбриональное развитие кукурузы на 8–13-е сутки после опыления:**  
*a, б* – зародыш на 8-е и 9-е сутки после опыления соответственно; *в, з* – зародыш на 10-е сутки после опыления, продольный срез (*в*), поперечный срез (*з*); *д* – формирование прокамбиального тяжа в щитке 13-суточного зародыша; оптическое увеличение *a, б, з* –  $\times 400$ , *в* и *д* –  $\times 160$

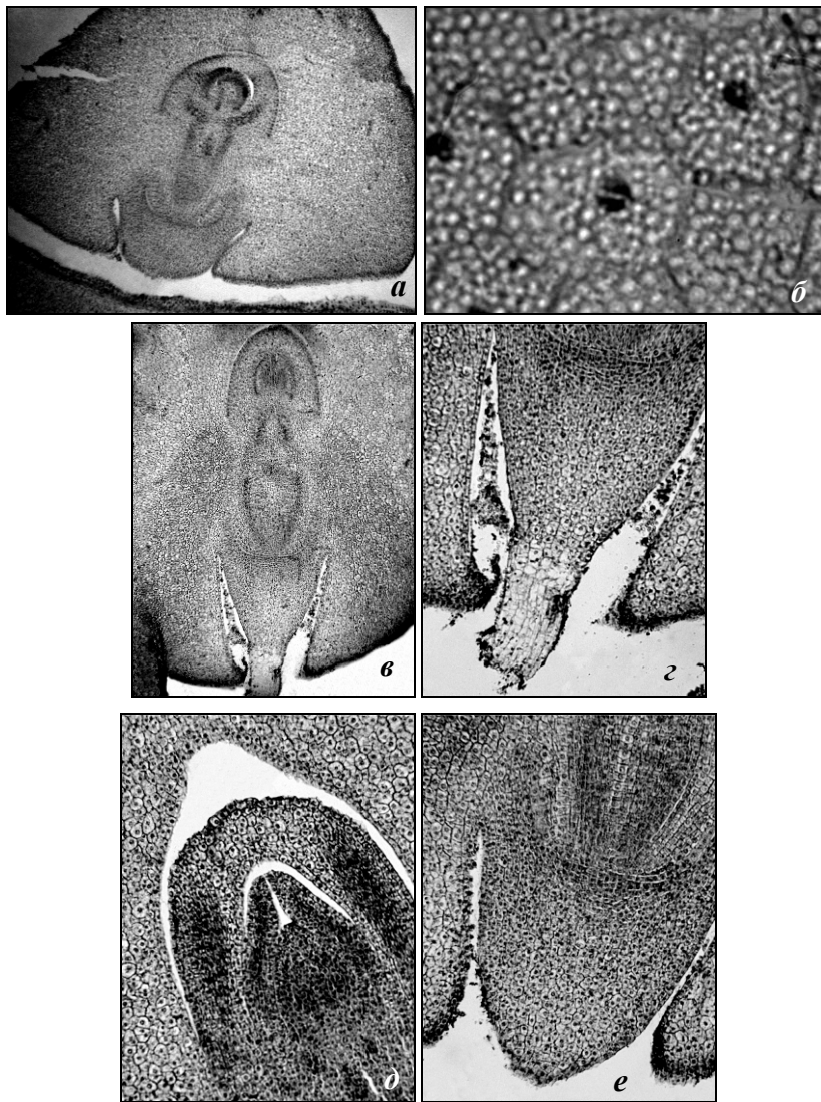
### Заключение

Таким образом, у гибрида кукурузы ДК633/266 $\times$ ДК411 на 14-е сутки после опыления оказываются сформированными все органы зародыша. Выявленная последовательность в формировании основных элементов зародыша модельного гибрида в зависимости от количества суток, прошедших с момента опыления, может быть использована в биотехнологических исследованиях для изоляции зародыша на заданной стадии развития.

Работа поддержана Государственным фондом фундаментальных исследований (ДФФД, грант Ф25/206-2008).

### Библиографические ссылки

1. Батыгина Т. Б. Хлебное зерно: Атлас. – Л. : Наука, 1987. – 103 с.
2. Батыгина Т. Б. *Graminad*-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. – Т. 2. – СПб. : Мир и семья-95, 1997. – С. 520–526.
3. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. – М. : Колос, 1970. – 255 с.
4. Сатарова Т. М. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Д., 2003. – 42 с.
5. Сатарова Т. Н. Искусственное оплодотворение и перспективы его использования у кукурузы // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2006. – Вип. 14, т. 1. – С. 172–176.
6. Соколов В. А. Импринтинг у растений // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 9. – С. 1250–1260.



**Рис. 3. Эмбриональное развитие кукурузы на 14-е сутки после опыления:**

*a-e* – 14-е сутки после опыления: зародыш, срез через зародышевую ось (*a*), крахмальные зерна в эндосперме (*b*), тангентальный срез через зародышевую ось, виден подвесок (*c*), подвесок при большем увеличении (*d*), почка зародыша (*e*), зародышевый корень и колеориза (*e*); оптическое увеличение *b* –  $\times 100$ , *c*, *d*, *e* –  $\times 400$ , *a* –  $\times 160$ , *b* –  $\times 1600$

7. Сравнение путей морфогенеза в культуре андрогенных и зиготических зародышей кукурузы / Т. Н. Сагарова, Е. В. Ляпустина, Н. В. Заколесник, С. М. Лисицкая // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Тез. IX Междунар. конф. – М. : ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. – С. 332.
8. Чеботарь А. А. Эмбриология кукурузы. – Кишинев : Штиинца, 1972. – 383 с.
9. Abbe E. Growth of the shoot apex in maize embryogeny / E. Abbe, O. Stein // Amer. J. Bot. – 1954. – Vol. 41, N 4. – P. 285–293.
10. Analysis of *ZmAE3* upstream sequences in maize endosperm and androgenic embryos / S. Sevilla-Lecoq, F. Deguerry, E. Matthys-Rochon et al. // Sex. Plant Reprod. – 2003. – Vol. 16. – P. 1–8.
11. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division / M. Sauter, P. von Wiesen, H. Lörz, E. Kranz // Sex. Plant Reprod. – 1998. – Vol. 11. – P. 41–48.

12. **Curtis M. D.** Molecular control of autonomous embryo and endosperm development // M. D. Curtis, U. Grossniklaus // *Sex. Plant Reprod.* – 2008. – Vol. 21. – P. 79–88.
13. **Functional** genomics of microspore embryogenesis / J. Hosp, S. Maraschin, A. Touraev, K. Boutilier // *Euphytica.* – 2007. – Vol. 158. – P. 275–285.
14. **Meyer S.** Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern / S. Meyer, H. Pospisil, S. Scholten // *Plant Molecular Biology.* – 2007. – Vol. 63, N 3. – P. 381–391.
15. **Raghavan V.** Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present // *New Phytologist.* – 2003. – Vol. 159. – P. 565–583.
16. **Timing** of the maternal-to-zygotic transition during early seed development in maize // D. Grimanelli, E. Perotti, J. Ramirez, O. Leblanc // *Plant Cell.* – 2005. – Vol. 17. – P. 1061–1072.
17. **Van Lammeren A. A. M.** Development morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.) // *Acta Bot. Neerl.* – 1986. – Vol. 35. – P. 169–188.

*Надійшла до редколегії 30.11.2009*