

три разросшиеся клетки (две одноядерные и восьмиядерная ценоцитная) примыкали к антиподальному комплексу. Автономного развития зародыша и эндосперма зарегистрировано не было. У контрольной линии 3Mgl все проанализированные зародышевые мешки имели нормальное строение.

Таким образом, проведенное исследование показало, что изучаемая мутация, нарушающая функциональность мужских гамет, не вызывает существенных отклонений в строении женского гаметофита. Отсутствие партеногенеза делает возможным отбор форм с наибольшей частотой гаплоиндукции при самоопылении растений внутри линии.

Библиографический список

Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // Докл. РАН. 1997. Т. 353, № 3. С. 405–407.

Тырнов В.С. Гаплоидия и апомиксис // Репродуктивная биология, генетика и селекция. Саратов, 2002. С. 32–46.

Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матрокллиных гаплоидов кукурузы // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276, № 3. С. 735–738.

Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // EUCARPIA Congress. Angers-France, 1992. P. 221–222.

УДК 581.331.1

МАКРОГАМЕТОФИТОГЕНЕЗ ТАБАКА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПРИ МОДЕЛИРОВАННЫХ СТРЕССАХ

Л.П. Лобанова

*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Саратов, Астраханская, 83*

Поиск путей целенаправленного изменения структур женского гаметофита покрытосеменных растений актуален для решения ряда теоретических и прикладных проблем генетики и селекции. Изучение изменчивости генеративных структур при экспериментально моделированных стрессах позволит определить размах их вариабельности в условиях внешней среды, норму реакции генотипа, возможность индукции таких явлений, как апомиксис, полиэмбриония, полиплоидия.

В настоящее время показано, что модифицирующее действие на процессы формирования структуры зародышевого мешка (ЗМ) могут оказывать различные внешние факторы (Лобанова, Еналеева, 2000). Модифицирующему влиянию внешних факторов подвержены все ключевые процессы развития женского гаметофита: разрастание функциональной споры, митотические деления, цитокинез, поляризация, дифференциация клеток. С точки зрения генетических последствий наибольший интерес представляет возможность экспериментальной индукции в ЗМ двух и более женских гамет, или явление полигамети. На табаке обнаружена определенная специфика действия некоторых факторов, вызывающих появление дополнительных клеток, морфологически похожих на яйцеклетки. При высокой температуре они формировались за счет добавочных митозов в гаметогенезе, а при низкой температуре и повышенной концентрации кинетина в питательной среде – за счет дифференцировки одной или обеих синергид по типу яйцеклетки (Лобанова, Еналеева, 2000; Лобанова, Еналеева, 2006). В ряде случаев установлена возможность развития зародыша из таких клеток, что указывает на их функциональную идентичность с яйцеклетками (Лобанова, 2001).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния ряда физиологических параметров на процессы формирования ЗМ табака: митотические деления, цитокинез, дифференцировку клеток. В задачи исследования входил качественный и количественный анализ ЗМ, развитие которых проходило при повышенных концентрациях ионов Ca^{2+} , сахарозы, АТФ и значений рН. Особое внимание уделялось влиянию физиологических условий на возможность индукции дополнительных яйцеклеткоподобных клеток и полярных ядер в ЗМ.

Материал и методы

Объектом исследования послужила гомозиготная линия табака БГ-6, характеризующаяся стабильным проявлением признаков женского гаметофита. Нормальные ЗМ имеют характерное для Polygonum-типа строение. Они биполярны и содержат 7 клеток: 3-клеточный яйцевой аппарат, центральную клетку с одним центральным ядром или двумя полярными ядрами и 3 антиподы. Яйцевой аппарат находится на микропиллярном полюсе ЗМ и состоит из яйцеклетки и 2 синергид. Яйцеклетка – женская гамета – четко отличается от синергид большим размером, довольно крупным ядром, сосредоточением цитоплазмы в апикальной части (там расположе-

но ядро) и крупной вакуолю в базальной части. Синергиды обычно имеют небольшие ядра, расположенные в базальной части и небольшие вакуоли в апикальной.

Исследование влияния физиологических параметров на развитие ЗМ проводилось в условиях *in vitro* на изолированных завязях. Ранее было показано, что при использовании определенного состава питательных сред метод культуры завязей может использоваться как модельный для исследования закономерностей развития ЗМ (Lobanova, Enaleeva, 1998). Нормальное развитие ЗМ табака осуществляется на среде, содержащей $\frac{1}{2}$ концентрации макросолей по MS, микросоли по MS, агар (7 г/л), сахарозу (20 г/л), витаминные добавки. После добавления всех ингредиентов pH среды доводился до 5,8. В качестве источника кальция в среду добавляли 220 мг/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Эта среда использовалась в данной работе в качестве контрольной. Культивирование осуществлялось при 25°C в темноте. Четыре экспериментальные среды отличались от контрольной следующими особенностями:

- 1) повышением концентрации кальция в 4,5 и 22,7 раза;
- 2) повышением концентрации сахарозы в 2,5 и 6,0 раз;
- 3) добавлением в среду аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) в концентрации 0,7 и 2 мг/л;
- 4) повышением pH до 6,7 и 8,2.

Воздействие перечисленных факторов проводилось на стадии гаметогенеза и созревания ЗМ, поэтому на питательную среду помещали завязи, содержащие ЗМ на одноядерной стадии. Завязи фиксировали ацетоалкоголем (1:3) через 3 суток культивирования. Препараты ЗМ готовили методом ферментативной мацерации семяпочек до клеточной суспензии (Еналеева и др., 1972). ЗМ исследовались по следующим основным признакам: число ядер и клеток, наличие или отсутствие цитокинеза, характер клеточной дифференциации, то есть форма и размер клеток и расположение в них ядра и вакуоли относительно друг друга. В каждом варианте анализировалось по 100 ЗМ.

Анализ препаратов проводился на микроскопе «Jenaval» при увеличении 8×40, 8×60, 8×100.

Результаты и их обсуждение

Развитие ЗМ линии БГ-6 в изолированных завязях *in vitro* на контрольной среде в основном осуществлялось нормально. Через 3 суток культивирования большинство 1-ядерных ЗМ достигали стадии зрелых, из которых 98% имели типичное строение (табл. 1). В двух аномальных ЗМ

было нарушено различное число ядер: в одном было 5 ядер, в другом – 9. ЗМ с изменениями дифференциации клеток яйцевого аппарата отсутствовали (табл. 2). Аналогичное число аномалий наблюдается у данной линии и при выращивании в полевых условиях (Lobanova, Enaleeva, 1998). Эти данные еще раз подтверждают правомерность использования метода культуры завязей *in vitro* в качестве модельной системы для экспериментальных исследований макрогаметофитогенеза.

Таблица 1. Влияние состава питательной среды на формирование зародышевых мешков табака

Вариант	Концентрация, значение рН	Общее количество аномальных ЗМ, %	Аномальные ЗМ с числом ядер, %				
			менее 8		равное 8		более 8
			клеточные	ценоцитные	клеточные	ценоцитные	
Контроль	0	2	1	0	0	0	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 г/л	5	2	2	0	0	1
	5 г/л	6	2	1	3	0	0
Сахароза	50 г/л	4	1	2	1	0	0
	120 г/л	3	2	1	0	0	0
АТФ	0,7 мг/л	1	1	0	0	0	0
	2 мг/л	24	18	3	3	0	0
рН	6,7	6	4	1	1	0	0
	8,2	10	4	6	0	0	0

Таблица 2. Влияние питательной среды на дифференцировку клеток яйцевого аппарата

Вариант	Концентрация, значение рН	ЗМ типичного строения			
		общее число	с нормальным яйцевым аппаратом, %	с синергидо-подобной яйцеклеткой, %	с яйцеклетко-подобной синергидой, %
Контроль		98	100	0	0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 г/л	95	96,8	3,2	0
	5 г/л	94	96,8	1,1	2,1
Сахароза	50 г/л	96	97,9	0	2,1
	120 г/л	97	98,0	1,0	1,0
АТФ	0,7 мг/л	99	100	0	0
	2 мг/л	76	98,7	0	1,3
рН	6,7	94	96,8	1,1	2,1
	8,2	90	96,7	0	3,3

При увеличении концентрации кальция в питательной среде происходит увеличение аномальных ЗМ (до 6%). В основном это клеточные или ценоцитные ЗМ с числом ядер менее 8 (см. табл. 1). Главная особенность аномальных ЗМ этого варианта заключается в образовании в них дополнительных полярных ядер. Из 7 аномально дифференцированных 5–8-ядерных ЗМ пять содержали 3 полярных ядра, а два – 4. В основном дополнительное полярное ядро формировалось за счет ядра, расположенного на микропилярном конце, и поэтому зрелые мешки содержали по две клетки в яйцевом аппарате. Только один ЗМ содержал типичный яйцевой аппарат и 3 полярных ядра. В ЗМ, где присутствовали 4 полярных ядра, одно дополнительное образовывалось взамен клетки яйцевого аппарата, а второе – антиподальной. Число антипод в таких ЗМ варьировало от 0 до 3.

Результаты анализа ЗМ с типичным планом строения (8-ядерные, биполярные, с завершенным цитокинезом) показали, что повышение концентрации кальция может изменять специфическую дифференцировку клеток яйцевого аппарата. При добавлении в среду 1 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ образуются синергидоподобные яйцеклетки, а при 5 г/л преобладают яйцеклеткоподобные синергиды (см. табл. 2).

Увеличение ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами отмечено также на среде, содержащей 5% сахарозы (см. табл. 2). Каких-либо иных четких модификаций структуры ЗМ при увеличении концентрации сахарозы не обнаружено.

При введении в состав питательной среды АТФ, которая является непосредственным источником энергии для многих клеточных процессов, обнаружено, что при добавлении 2 мг/л количество аномальных ЗМ увеличивается до 24% (см. табл. 1). Большинство из них (21%) появились в результате угнетения митотических делений в гаметогенезе. АТФ мало угнетает цитокинез и 21 ЗМ из 24 аномальных имеют клеточную структуру. Наибольший интерес представляют 8-ядерные дифференцированные ЗМ с дополнительными клетками в яйцевом аппарате, который вместо 3 клеток в норме содержит 4, 5 или 6 (3%). Некоторые дополнительные клетки дифференцировались по типу яйцеклеток. Один ЗМ содержал также 3 полярных ядра. Образование таких ЗМ возможно при нарушении расхождения ядер к полюсам в гаметогенезе. Это приводит также к редукции антиподального комплекса, который либо полностью отсутствует, либо представлен единственной клеткой.

Повышение рН среды также привело к увеличению количества ЗМ с уменьшенным по сравнению с нормой числом ядер, что указывает на угнетение митотической активности в гаметогенезе. При повышении рН до 8,2

отмечается тенденция к подавлению цитокинеза. Снижение кислотности и защелачивание питательной среды способствует также формированию ЗМ с яйцеклеткоподобными синергидами (2–3%) (см. табл. 1, 2).

В проведенном эксперименте исследовались компоненты питательной среды, которые во многом определяют жизнедеятельность клетки, оказывая влияние на ее пластический и энергетический обмен. Установлено, что изменение в питательной среде оптимальных концентраций кальция, сахарозы, АТФ, уровня рН приводит к увеличению числа ЗМ аномального строения. Однако следует отметить, что изменение параметров среды не привело к стимуляции митозов в гаметогенезе и, как следствие, формированию многоядерных и многоклеточных ЗМ. В этом плане экстремально высокая температура остается пока уникальным фактором, индуцирующим дополнительные митозы при развитии ЗМ табака (Лобанова, Еналеева, 2000).

Исследованные факторы характеризуются определенной спецификой воздействия на развивающиеся ЗМ. Так, повышение уровня рН и концентрации кальция способствуют образованию «субнормальных» ЗМ, у которых сохраняется типичный план строения, но изменяется морфология клеток яйцевого аппарата. Высокий уровень кальция в среде способствует формированию ЗМ с дополнительными полярными ядрами. АТФ приводит к появлению ЗМ с дополнительными клетками в яйцевом аппарате.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности экспериментально, моделируя условия выращивания, увеличить образование ЗМ с дополнительными яйцеклетками и полярными ядрами. Поскольку ЗМ с дополнительными гаметами служат основой для апомиксиса, полиэмбрионии, изменения плоидности зародыша и эндосперма, то работы по экспериментально индуцированной полигаметии представляют несомненный интерес.

Библиографический список

Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Хохлов С.С. Выделение зародышевых мешков покрытосеменных растений путем мацерации тканей // Цитология и генетика. 1972. Т. 6, № 5. С. 439–441.

Лобанова Л.П., Еналеева Н.Х. Модификационная изменчивость признаков гаметофита // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция. СПб., 2000. Т. 3. С. 384–389.

Лобанова Л.П. Исследование индуцированного апомиксиса у табака в связи с модификационной изменчивостью мегагаметофита // Изв. Саратов. ун-та. 2001. Сер. Биол. Вып. спец. С. 176–184.

Лобанова Л.П., Еналеева Н.Х. Изменчивость цитологической структуры мега-гаметофита табака под действием фитогормонов // Бюл. Бот. сада СГУ. Саратов, 2006. Вып. 5. С. 323–327.

Lobanova L., Enaleeva N. The development of embryo sacs in in vitro ovaries of *Nicotiana tabacum* L. // Plant Science. 1998. Vol. 131. P. 191–202.

УДК 581.163 + 582

ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРО- И МЕГАГАМЕТОФИТА
У НЕКОТОРЫХ СОРТО- И ВИДООБРАЗЦОВ *Festuca Rubra* L.,
F. Pratensis Huds. и *F. Arunolinacea* Schreb.

А.Х. Миндубаева, Т.Н. Шакина, Н.М. Лисицкая, А.С. Кашин

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012, Саратов, Астраханская, 83

Явление апомиксиса давно пользуется повышенным вниманием исследователей. Известно, что размножающиеся апомиктично растения дают более однородное, относительно постоянное потомство, способное сохранять гетерозисный эффект во многих поколениях. С помощью апомиксиса закрепляется целый ряд ценных свойств, что невозможно реализовать при половом размножении вследствие расщепления гибридов. В связи с этим использование апомиксиса открывает большие возможности в решении ряда селекционных задач, повышении урожайности и улучшении многих хозяйственных признаков. Однако способность к такому размножению отсутствует у важнейших культурных растений, что делает вопрос об экспериментальном получении устойчивого апомиктичного размножения у таких растений очень актуальным (Петров, 1979; Kindiger et al., 1996; Grossniklaus et al., 2001; 3rd International..., 2007).

Исследование биологии злаков, в особенности способа их размножения, имеет большое теоретическое и практическое значение, поскольку к злакам относятся все основные хлебные и многие кормовые растения. Знание закономерностей проявления апомиксиса в этом семействе может оказаться полезным для поисков путей и способов использования различных форм апомиксиса в селекции и семеноводстве (Хохлов, 1967; Savidan, 1995, 2001; Vielle Calzada et al., 1996).

Объектом цитоэмбриологического исследования данной работы являются представители рода овсяниц – *Festuca rubra* L., *F. pratensis* Huds. и *F. arunolinacea* Schreb. Изучение овсяниц интересно как в прикладном, так