

Кордюм Е.Л. Апомиксис в роде *Poa* L. // Апомиксис и селекция. М.: Наука, 1970. С.75-80.

Куприянов П.Г. Ускоренные методы исследования зародышевого мешка // Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 1978. С.155-163.

Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: изд-во «Колос», 1970. 45с.

Шишкинская Н.А., Юдакова О.И., Тырнов В.С. Популяционная эмбриология и апомиксис у злаков. Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2004. 145 с.

Юдакова О.И., Шакина Т.Н. Псевдогамный апомиксис у *Poa chaixii* Vill. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2006. №5. С. 75-81.

Юдакова О.И., Шакина Т.Н. Особенности раннего эмбриогенеза у апомиктического *Poa pratensis* L. // Онтогенез. 2007. Т.38, №1. С. 5-11.

Herr Jm. J. M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. V.20, № 8. P. 785-790.

УДК 581.33.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МАКРОСПОРОГЕНЕЗА ТАБАКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ЕЕ ВОЗМОЖНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Л.П. Лобанова

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

Макроспорогенез – важнейший этап в развитии гаметофита, от которого зависит фертильность растений и генетическая конституция будущего потомства. Возможность индукции изменчивости макроспорогенеза внешними факторами представляет не только теоретический интерес при исследовании его модификаций. Прикладное значение могут иметь, вызванные внешними условиями, нередукция или формирование нескольких функциональных макроспор. Эти явления влияют на способ размножения культурных и диких растений, являясь предпосылками полиплоидии, апомиксиса, полиэмбрионии.

Долгое время исследования морфогенетического эффекта внешних факторов на женский мейоз осложнялись невозможностью контролируемого воздействия на отдельные стадии развивающегося гаметофита или несколько его стадий. Одним из перспективных подходов экспериментального изучения спорогенеза оказался метод изолированных завязей *in vitro* (Lobanova, Enaleeva, 1998). Это позволило создавать контролируемые условия для изучения различных воздействий и при этом устранять неконтролируемое влияние спорофита и подвергать одновременному воздействию большое количество завязей находящихся на определенных (любых) стадиях развития макрогаметофита.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния высокой температуры 37°C на макроспорогенез *Nicotiana tabacum* L.

Материал и методы

Объектом исследования явились завязи гомозиготной линии табака БГ-6 в системе *in vitro*. Питательная среда для культивирования содержала соли по Мурасиге и Скугу, агар-агар ($7 \cdot 10^3$ мг/л), сахарозу ($2 \cdot 10^4$ мг/л), витамины В₁, В₂, РР и 0,1 мг/л ИУК. Для культивирования брали завязи, содержащие семязачатки на стадиях МКМ и мейоза. Экспланты выращивали в темноте, в термокамерах, в которых в течение нескольких суток поддерживалась постоянная температура 25 или 37°C. Фиксация завязей проводилась ацетоалкоголем (1:3). Для исследования спорогенеза применялся метод просветления семязачатков (Herr, 1971). Анализ семязачатков проводился на микроскопе «Zetopan» с фазово-контрастным устройством.

Результаты и их обсуждение

Женский мейоз у табака при температуре 25°C в условиях in vitro. Чтобы оценить эффект действия высокой температуры на женский мейоз необходимо представить этот процесс при оптимальных температурных условиях. Установлено, что условия *in vitro* при 25°C оказывают не существенное влияние на спорогенез (табл. 1). Частоты основных цитологических типов спор различаются с контролем незначительно. В обоих вариантах максимальный процент составляют линейные тетрады и триады с двухъядерной микропилярной клеткой. Изредка угнетение развития верхней клетки диады проявляется в подавлении деления ядра. Последнее приводит к появлению триады одноядерных спор.

Таблица 1. Вариации макроспорогенеза табака при разных температурах

Вариант	Стадия	Температура, °C	Число семязачатков	Тетрада макроспор, %	Нарушение цитокинеза, %			Выпадение мейотических делений, %		
					триада с 2-ядерной микропилярной кл.	4-ядерная ценоспора	другие нарушения	I и II, с образованием монад	I или II, с образованием диад	II, с образованием триад
<i>in vivo</i>	_	25	1990	77,0	22,0		0,4			0,6
<i>in vitro</i>	МКМ	25	402	72,7	21,6		4,2			1,5
	МКМ	37	109	75,2	17,4		2,8			4,6
	мейоз	37	75	63,3	17,4	12,0	2,7	1,3		1,3
	МКМ, мейоз	37	395	55,6	18,2	5,8	5,4	5,5	4,0	5,5

Цитологический анализ стадии материнской клетки ЗМ также показал значительное совпадение в их формировании в вариантах *in vitro* и *in vivo*. В большинстве случаев происходит разрастание халазальной клетки тетрады (табл.2).

Влияние высокой температуры на МКМ. Пробирки с завязями, на стадии МКМ, в течение одних суток выдерживались в камере при температуре 37°C, а затем переносились в камеру с температурой 25°C на 1-7 суток. В момент смены температурных условий 95% семязачатков содержали МКМ и только 5% приступали к развитию. Существенных отличий в спорогенезе данного варианта по сравнению с контролем (25°C) не отмечено (табл. 1). На этапе формирования материнских клеток ЗМ при воздействии высокой температуры только на МКМ зарегистрировано на 7% больше семязачатков с изменением начальных этапов развития ЗМ, но спектр аномалий остался неизменным (табл.2).

Таблица 2. Образования материнских клеток ЗМ табака при разных температурах

Вариант	Стадия	t °C	Число семязачатков	Формирование материнских клеток ЗМ (%) из:							
				халазальной споры	любой другой споры	2-3-х макроспор	4-х макроспор	2-4-х ядерной ценоспоры	монады	диады	триады
in vivo	—	25	2803	96,5	0,1	3,3		0,1			
in vitro	МКМ	25	289	95,8		3,5		0,7			
	МКМ	37	218	89,0	1,4	5,5		4,1			
	мейоз	37	440	82,0		1,1	2,8	9,5		1,8	2,8
	МКМ, мейоз	37	305	48,5	5,0	7,0	10,5	10,0	6,9	5,6	6,5

Влияние высокой температуры на мейоз. Развитие при 37°C более зрелых завязей, то есть уже приступивших к мейозу, характеризовалось более широким спектром нарушений спорогенеза (табл.1). Среди аномально сформированных спорад преобладали 4-ядерные ценоспоры, образование которых возможно только при полном подавлении цитокинеза. В этом варианте была отмечена также возможность полного подавления мейоза (1,3%). Нарушения цито- и карокинеза в этом варианте снижают вероятность формирования материнской клетки ЗМ из халазальной макроспоры нормальной тетрады на 14 % (табл.2). Значительно повысилось количество образования материнских клеток ЗМ из 4-ядерной ценоспоры, а также из ценоспор с 2 и 3-я ядрами. Отмечено также формирование материнских клеток ЗМ из спорад с частичным или полным выпадением II мейотического деления. Впервые зарегистрировано одновременное разрастание всех 4-х макроспор нормальной тетрады.

Влияние высокой температуры на МКМ и мейоз. При развитии завязей от стадии МКМ до образования тетрады макроспор при 37°C спектр отклонений от нормального хода спорогенеза еще более увеличился. Большинство отклонений явилось результатом нарушения цитокинеза; при этом возможно как полное так и частичное подавление образования клеточных стенок (табл.1).

Среди спорад с нарушенным цитокинезом значительная часть представлена 4-ядерными ценоспорами (5,8%). В случае нарушения цитокинеза после II

мейотического деления клеточные стенки образовывались либо в верхней клетке диады, либо в нижней, либо не образовывались совсем. Результатом были споры с 2-ядерной клеткой и двумя одноядерными клетками по-разному расположенными относительно друг друга, а также споры с двумя 2-ядерными клетками. Более редки случаи, когда образование клеточной стенки не происходило после I деления мейоза, а после II деления наблюдались различные вариации в их заложении. Так формировались либо одна 3-ядерная клетка вверху или внизу и одна одноядерная клетка, либо одна 2-ядерная клетка в середине и по одной одноядерной клетки с каждой стороны.

Нарушения спорогенеза в этом варианте были обусловлены также полным или частичным подавлением мейотического деления. Это привело к образованию трех, двух или только одной макроспоры. В последнем случае МКМ непосредственно становилась материнской клеткой ЗМ (6,9%). В этом варианте зарегистрированы также МКМ с ядрами в два раза и более превосходящими по величине нормальные размеры. Это указывает на возможность эндомитозов и возникновение реституционных ядер в клетках при длительном воздействии высокой температуры на МКМ.

Оценка изменчивости спорогенеза при действии высокой температурой и возможные последствия для развития женского гаметофита. Анализ морфогенетических вариаций спорогенеза, индуцированных высокой температурой, показал, что полиморфизм спорад может быть следствием выпадения цитокинеза, кариокинеза, цито- и кариокинеза. Эффект высокой температуры зависит от стадии развития семязачатка в момент воздействия и максимально выражен при воздействии на весь ход спорогенеза. Подавление цито- и кариокинеза происходит при непосредственном воздействии высокой температуры на эти процессы. Действие на МКМ в интерфазе не приводит к дополнительному, по сравнению с контролем, угнетению мейоза. Увеличенное во всех вариантах (в том числе и контрольном) число спорад без перегородки между микропилярными ядрами обычно не изменяет типичного развития ЗМ из халазальной макроспоры. Считается, что подобное угнетение развития верхней клетки диады уже на этом этапе служит доказательством подготовки к развитию халазальной макроспоры в ЗМ (Романов, 1960).

Отсутствие при высокой температуре в макроспорах микроядер, а в спорах микроклеток свидетельствует об отсутствии или, по крайней мере, о незначительных нарушениях кариокинеза, связанных с отставанием и выбросом хромосом. Однако повышение температуры в мейозе довольно часто приводит к угнетению мейотического деления. Результатом является формирование в ходе спорогенеза монад, диад или триад. Показана также возможность формирования при высокой температуре реституционных ядер в МКМ.

Известно, что в зависимости от того, какая макроспора окажется функциональной, часть нарушений макроспорогенеза может не иметь в дальнейшем последствий. В связи с этим анализ формирования материнских клеток ЗМ представляет особый интерес, так как именно от числа и пloidности ядер в них зависит последующий тип развития ЗМ.

Максимальная изменчивость формирования материнских клеток ЗМ наблюдалась, как и следовало ожидать, исходя из результатов анализа спорогенеза, при действии температуры 37°C на стадии МКМ и мейоза. В данном случае менее 50% ЗМ развивается из халазальной макроспоры нормально развитой тетрады макроспор (табл. 2).

В ходе эксперимента получены данные, свидетельствующие о потенциальной возможности экспериментальной индукции ряда явлений.

1. Формирование нередуцированных ЗМ. Вследствие полного или частичного подавления мейоза материнские клетки ЗМ могут образовываться из спор с диплоидным набором хромосом.

2. Получение полиплоидных растений. При оплодотворении нередуцированных ЗМ возможно появление триплоидных зародышей.

3. Индукция полиэмбрионии. В высокотемпературных вариантах в одной семязпочке часто наблюдается одновременное образование нескольких материнских клеток ЗМ из 2, 3 и 4-х макроспор.

4. Изменение споричности развивающегося ЗМ. Нарушения цитокинеза в спорогенезе являются причиной формирования материнских клеток ЗМ из клеток, содержащих 2,3 или 4 ядра.

Таким образом, нарушения, индуцированные высокой температурой, в спорогенезе очень разнообразны и проявляются на разных этапах развития женского гаметофита. Для решения ряда практических и теоретических задач крайне важно знание возможности регуляции последовательных событий макрогаметофитогенеза и механизмов, лежащих в основе их изменчивости. Исследования действия высокой температуры на спорогенез гомозиготной линии табака, которая характеризуется стабильным развитием моноспорических ЗМ, позволили впервые показать принципиальную возможность реализации на основе морфогенетических вариаций генеративных структур явлений полиэмбрионии, нередукции, полиплоидии и изменения споричности развивающегося ЗМ.

Литература

Романов И.Д. Аномальные митозы и цитоплазматический градиент в зародышевых мешках некоторых цветковых растений. II. Виды *Tulipa* // Цитология. 1965. Т.7, №1. С.23-31.

Herr J.M. A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms // Am. J. Bot. 1971. V.58. S. 785-790.

Lobanova L., Enaleeva N. The development of embryo sacs in in vitro ovaries of *Nicotiana tabacum* L. // Plant Science. 1998. V. 132. S. 191-202.