

УДК 581.331.1 + 581.192.7

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МЕГАГАМЕТОФИТА ТАБАКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФИТОГОРМОНОВ

Л.П. Лобанова, Н.Х. Еналеева

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

Модифицирующее действие на процессы формирования структуры макрогаметофита (МГ) могут оказывать различные внешние факторы: ионизирующие излучения, химические соединения, температурные условия, влажность и др. (Лобанова, Еналеева, 2000). Все факторы внешней среды представляют собой экзогенные сигналы, влияющие на работу физиологических систем клетки.

Одной из основных систем регуляции жизнедеятельности растения, обеспечивающей его гомеостатическую стабильность и эпигенетическую направленность, является гормональная система (Гамбург, 1970; Лутова, 2000). Однако в настоящее время полностью отсутствуют данные о динамике эндогенных гормонов на стадиях формирования женского гаметофита, и только в единичных работах по культивированию незрелых завязей *in vitro* отмечается возможность влияния экзогенных гормонов на ход развития ЗМ. Недостаток подобных данных ограничивает понимание физиологических механизмов, определяющих развитие нормальных МГ или приводящих к модификационным изменениям его структуры.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния экзогенных фитогормонов на процессы формирования ЗМ табака: клеточные деления, цитокinesis, дифференцировку клеток. Такие исследования в перспективе могли бы способствовать пониманию роли фитогормонов в реализации генетической программы мегагаметофитогенеза, а также выявить условия для индукции специфических модификаций ЗМ.

Материал и методы

Объектом исследования послужили 3 линии *Nicotiana tabacum*. Две линии, RF-3 и БГ-6, характеризуются высокой стабильностью в проявлении цитологических признаков женского гаметофита. В полевых условиях данные линии формируют в основном нормальные 7-и клеточные ЗМ, состоящие из 3-х клеточного яйцевого аппарата, двухъядерной центральной клетки и 3-х антипод. Аномальные ЗМ встречаются с небольшой частотой в среднем равной 2-3 %. Третья линия 165.18 содержит гаметофитную мутацию, которая на стадии зрелых ЗМ проявляется в уменьшенном, по сравнению с нормой, числе ядер и клеток. Количество малоядерных ЗМ достигает 80%.

Исследование влияния фитогормонов на развитие ЗМ проводилось с использованием методики культивирования завязей *in vitro*. Этот метод позволяет создавать строго контролируемые условия, в том числе и

гормональные, а также воздействовать фитогормонами одновременно на большое количество завязей на одинаковой стадии развития.

В работе исследовалось действие 2-х фитогормонов, 2,4-Д и кинетина, на стадию макрогаметогенеза, которая включает 3 митотических деления, поляризацию, цитокинез и специализацию клеток МГ. Для этого завязи, содержащие ЗМ на 1-ядерной стадии развития, изолировали из бутонов и помещали в пробирки с твердой питательной средой. Пять вариантов питательных сред отличались только по содержанию фитогормонов: безгормональная, с кинетином и 2,4-Д в концентрациях 2 и 10 мг/л.

Завязи фиксировали через 3 суток культивирования. Препараты зрелых ЗМ готовили методом ферментативной мацерации семяпочек до клеточной суспензии. ЗМ окрашивали ацетокармином и изучали на временных препаратах. Анализ ЗМ проводили на микроскопе «Jenval» при увеличении 10 x 50. В каждом варианте исследовалась выборка из 100 ЗМ из 5-7 завязей.

Результаты и обсуждение

В основном развитие ЗМ немутантных линий табака в изолированных завязях *in vitro* на безгормональной среде осуществлялось в соответствии с генетической программой вида. Через 3 суток культивирования на безгормональной среде большинство 1-ядерных МГ линий RF-3 и БГ-6 достигали стадии зрелых. 95-97 % МГ имели нормальное строение (табл.). В некоторых МГ типичного строения (2-3%) наблюдали изменение дифференциации клеток яйцевого аппарата: появление синергидоподобных яйцеклеток и яйцеклеткоподобных синергид. В единичных аномальных МГ количество ядер варьировало от 2-х до 8, могло быть нарушено образование клеточных перегородок.

При введении в состав питательной среды 2,4-Д зарегистрировано увеличение числа отклонений. Результаты цитологического анализа МГ приведены в таблице. Из нее следует, что цитологически эффект действия ауксина проявился прежде всего в подавлении митозов. Результатом явилось увеличение числа малоядерных МГ в обеих линиях. Наличие 2-х и 4-х ядерных биполярных ЗМ возможно указывает на остановку их развития на ранних стадиях. У большинства аномальных МГ в вариантах с 2,4-Д подавлен цитокинез, что привело к появлению многочисленных ценоцитных структур.

Результаты анализа типичных МГ (8-ядерных, биполярных, с завершённым цитокинезом) показали, что повышение концентрации ауксина может значительно изменять специфическую дифференциацию клеток яйцевого аппарата. Влияние 2,4-Д наиболее отчетливо проявилось в увеличении числа МГ с синергидоподобными яйцеклетками. Были зарегистрированы и другие изменения типичной дифференцировки клеток яйцевого аппарата: уменьшение размера, разный размер и линейное

расположение клеток синергид, промежуточное положение ядер синергид и яйцеклетки между базальным и апикальным полюсами.

Частота структурных изменений в зародышевых мешках различных линий табака, гаметогенез которых проходил под влиянием фитогормонов*

	Гормоны, концентрация (мг/л)	Аномальные ЗМ, %						С нарушенной дифференцировкой клеток яйцевого аппарата, %		
		общее кол-во	с числом ядер			центро-цит. ядер	дифференцированные	с синергидо-подобной яйце-клеткой	с яйцеклетко-подобной синергидой	линейным расположением синергид
			менее 8	равным или более 8						
RF-3	б/г**	5	3	2	3	2	2	2	1	
	кинетин - 2	5	5	0	5	0	3	3	4	
	кинетин 10	4	3	1	2	2	2	2	6	
	2,4-Д - 2	10	7	3	8	2	3	2	4	
	2,4-Д - 10	26	25	1	22	4	8	0	1	
БГ-6	б/г	3	3	0	1	2	1	1	0	
	Кинетин - 2	4	4	0	0	4	0	2	0	
	кинетин - 10	20	20	0	15	5	3	6	0	
	2,4-Д - 2	31	30	1	17	14	16	1	0	
165.18	б/г	83	81	2	70	13	0	0	0	
	кинетин - 2	61	61	0	41	20	0	0	0	
	2,4-Д - 10	48	48	0	12	36	42	0	0	

* В одном ЗМ возможно нарушение нескольких признаков;

** б/г – безгормональная питательная среда.

Влияние кинетина на формирование структуры женского гаметофита у немутантных линий менее выражено, чем 2,4-Д. Это проявилось в снижении количества аномальных МГ (см. табл). Качественная же характеристика аномальных МГ сходна с той, которая наблюдалась в вариантах с 2,4-Д. Кинетин также подавляет митозы и цитокинез. Поэтому аномальные ЗМ представлены малоядерными и, в основном, центоцитными.

У линии RF-3 в вариантах с кинетином, по сравнению с контролем, незначительно повышено число нарушений в дифференцировке клеток яйцевого аппарата, но выделить доминирующий тип невозможно. Однако, у линии БГ-6 добавление в среду кинетина (10 мг/л) приводит к увеличению яйцеклеткоподобных синергид до 6%. Вероятно, эти

межлинейные различия обусловлены особенностями генотипа линий. Необходимо провести дополнительные исследования, поскольку данный тип отклонений представляет интерес и как контрастный действию ауксинов и как перспективная модификация структуры МГ для получения гаплоидов и полиэмбрионов.

Влияние фитогормонов на развитие МГ мутантной линии 165.18 представляет особый интерес, так как у данной линии формирование малоядерных и ценоцитных МГ генетически детерминировано. Поэтому даже на безгормональной среде количество малоядерных достигает 81%, среди которых ценоцитных – 70%. Было обнаружено, что присутствие в питательной среде кинетина и 2,4-Д влияет на фенотипическое проявление мутации. При этом уменьшается общее количество аномальных ЗМ, а также доля ценоцитных ЗМ (см. табл). Так, кинетин (2 мг/л) снижает количество аномальных ЗМ на 1/4 (с 81 до 61%), среди которых 1/3 имеет клеточное строение (20%). В варианте с 2,4-Д (10 мг/л) процент аномальных ЗМ снижен почти в 2 раза (с 81 до 48%), в 2/3 которых прошли процессы цитокинеза.

Таким образом, под влиянием экзогенных гормонов у мутантной линии значительно увеличивается число МГ нормального строения. Однако, присутствие 2,4-Д в таких гаметофитах стимулирует дифференцировку яйцеклеток по типу синергид. При этом количество МГ типичного строения с синергидоподобными яйцеклетками у данной линии достигает 42%, в то время как у БГ-6 не превышает 16%. Влияния кинетина на дифференцировку синергид по типу яйцеклетки у линии 165.18 не зарегистрировано.

Результаты специфического влияния фитогормонов на дифференцировку клеток яйцевого аппарата представляют интерес при их сопоставлении с данными о влиянии температурных условий на гаметогенез табака. Показано, что у линий БГ-6 и RF-3 высокая температура (37оС), как и присутствие 2,4-Д, способствует увеличению синергидоподобных яйцеклеток (Лобанова, Еналеева, 2000; Лобанова, Бокова, 2005). Низкая температура (13оС), как и кинетин, у линии БГ-6 вызывает формирование яйцеклеткоподобных синергид (Лобанова, Еналеева, 2000). Можно предположить, что сигнал, влияющий на дифференцировку клеток ЗМ, имеет гормональную природу. Экстремальные температуры, изменяя направленность и интенсивность обменных процессов, могут способствовать изменению пропорций и концентраций фитогормонов в семяпочке и развивающемся гаметофите. Эта предпосылка представляет значительный интерес для понимания физиологических механизмов развития ЗМ. Выяснение таких механизмов предполагает проведение работ, включающих контроль динамики эндогенных гормонов как во время нормального развития ЗМ, так и под влиянием экстремальных факторов.

В ходе данной работы установлена зависимость определенных цитологических событий мегагаметофитогенеза от присутствия

исследованных фитогормонов. Изменение морфологической структуры ЗМ было обусловлено нарушением одного или нескольких цитологических процессов: митотических делений, поляризации, цитокинеза, клеточной дифференциации. В работе показана также определенная специфика реакций развивающегося ЗМ на тип гормона, а также специфичность реакции различных генотипов на один и тот же гормон. Не исключено, что, используя фитогормоны, их разные концентрации и сочетания, можно активно вмешиваться в эмбриональные процессы, изменяя их ход.

Литература

- Гамбург К.З. Фитогормоны и клетки. М.: Наука, 1970. 104 с.
- Лобанова Л.П., Бокова О.А. Модификационная изменчивость признаков мегagamетофита табака, индуцированная фитогормонами // Известия Саратовского университета, 2005. Т.5. Серия Химия. Биология. Экология, вып.2. С.22-24.
- Лобанова Л.П., Еналеева Н.Х. Модификационная изменчивость гаметофита // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция. СПб.: Мир и семья, 2000. Т.3. С.384 -389.
- Лутова Л.А. Сигнальная регуляция развития растений // Генетика развития растений. СПб.: Наука, 2000. С. 256-343.

УДК 581.33 + 582.542.1

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ МЕГАГАМЕТОФИТА У НЕКОТОРЫХ СОРТОВ *FESTUCA RUBRA L.* В УСЛОВИЯХ г. САРАТОВА

А.Х. Миндубасва, Н.Х. Еналеева, А.С. Кашин
 Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
 410026 Саратов, ул. Астраханская, 83, факс (8452) 24-16-96. e-mail: kashinas@sgu.ru

Вид овсяница красная (*Festuca rubra L.*) - представитель низовых многолетних злаков, широко применяется в зонах с умеренным климатом в качестве пастбищной и газонной культуры. По некоторым сведениям для овсяницы красной характерна значительная внутривидовая вариабельность цитологических и эмбриологических показателей (Mariany et al, 2000; Шишкинская, Юдакова, 2003; Шишкинская и др., 2004), свидетельствующая о тенденции к апомиктичному способу размножения (Шишкинская и др., 2004).

Одним из критериев, используемых при диагностике системы размножения, служит состояние пыльцы. Эмпирически установлено, что степень дефектности пыльцы (СДП), превышающая 11,7% указывает на возможность апомиксиса (Куприянов, Жолобова, 1975; Куприянов, 1989), при этом в случае варьирования пыльцевых зерен по размеру вероятность наличия апомиксиса у растений данных популяций существенно возрастает (Шишкинская, Юдакова, 2003; Шишкинская и др., 2004).