

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).

Из 6 сортов *F. rubra* L., исследованных нами ранее в отношении качества пыльцы, степень дефектности пыльцы (СДП) выше 11,7 % выявлена у трёх сортов (Тамара, №116 и ГБС 202), близкая к пограничной – у одного сорта (Salaspils), значительно ниже пограничной – у двух сортов (Выдубецкая славная и Areta) (табл. 1) (Крайнов и др., 2005),

Целью настоящего исследования было цитозембриологическое изучение мегагаметофита у трёх из этих сортов *F. rubra* L., контрастных по признаку

Таблица 1

Средние показатели дефектности пыльцы для исследованных ранее сортов овсяницы красной

Сорт	Дефектные пыльцевые зерна, %				
	Всего	остановившиеся в развитии	плазмолизированные	дегенерирующие	пустые
Salaspils	9,00 ± 0,96	2,38 ± 0,33	0,37 ± 0,07	4,35 ± 0,57	1,9 ± 0,30
Тамара	27,63 ± 2,74	3,58 ± 0,46	1,49 ± 0,25	20,60 ± 2,18	1,85 ± 0,21
№116	14,34 ± 1,85	1,9 ± 0,38	0,28 ± 0,09	10,97 ± 1,63	1,09 ± 0,21
ГБС 202	17,52 ± 2,52	2,18 ± 0,37	0,02 ± 0,02	14,69 ± 2,23	0,62 ± 0,10
Выдубецкая славная	4,19 ± 0,76	0,43 ± 0,10	0	3,38 ± 0,64	0,38 ± 0,08
Арета	4,03 ± 0,45	0,91 ± 0,15	0,09 ± 0,04	2,06 ± 0,30	0,98 ± 0,17

качество пыльцы с оценкой их на склонность к апомиктичному размножению.

Материал и методика

Были исследованы сорта Тамара, характеризующийся максимальным значением СДП ($27,63 \pm 2,74$ %), Salaspils, по уровню СДП близкий к пограничной величине ($9,00 \pm 0,96$ %), и Areta, характеризующийся минимальным значением СДП ($4,03 \pm 0,45$ %). Число растений каждого сорта в выборке варьировало от 20 до 30. В среднем по каждому сорту было исследовано около 120 зародышевых мешков (ЗМ).

Соцветия для цитозембриологического анализа в период массового цветения растений, произрастающих на коллекционном участке ботанического сада СГУ, фиксировали в фиксаторе Кларка (96%-ный этанол – 3 части; ледяная уксусная кислота – 1 часть) (Паушева, 1980). Препараты зародышевых мешков готовили по ускоренной методике П. Г. Куприянова (1982) с использованием мацерирующего агента (цитазы) и микропрепаровальных игл под стереомикроскопом МБС-10. Материал после протравливания (15 минут) 4 % железозаммонийными квасцами окрашивали 2 % ацетокармином в течение 24 часов. Мацерацию осуществляли в течение 3 часов. Препараты анализировали под микроскопом PZO (Poland) при увеличении $10 \times 1,5 \times 40$. Микрофотографии сделаны с помощью цифровой камеры Praktica DC 50. Наличие апомиксиса

определяли по частоте встречаемости апоспорических ЗМ и ЗМ с преждевременной эмбрионией.

Результаты и обсуждение

Частота встречаемости ЗМ с эмбриологическими признаками апомиксиса у растений *F. rubra* сортов Tamara и Salaspils была близкой (9,02 и 9,60 % соответственно), в то время как у растений сорта Areta была ниже более чем в 1,5 раза (5,74%). При этом у первых двух сортов преимущественно отмечена преждевременная эмбриония (в 70 – 80 % случаев), а у сорта Areta – апоспорический тип развития ЗМ (в 85 % случаев). Частота дегенерирующих ЗМ у растений первых двух сортов была низкой, а у растений сорта Areta – несколько выше, но в целом по сортам отмечена на уровне 1-2,5 % (табл. 2).

В ЗМ с преждевременной эмбрионией наблюдали развитие двух-, реже – трёх- или четырёхклеточного проэмбрио при отсутствии следов пыльцевой трубки, наличии ненарушенных синергид и слившихся или неслившихся полярных ядер. Известно, что даже после оплодотворения у цветков первой к делению приступает центральная клетка ЗМ, а яйцеклетка значительно отстаёт в темпах деления.

ЗМ апоспорического типа характеризовались нарушенной полярностью и дифференциацией, существенно отличающейся от свойственного растениям этого вида развития зуспорического ЗМ Polygonum-типа. Последний представляет собой биполярную семиклеточную структуру с одной яйцеклет-

Таблица 2
Особенности развития ЗМ у растений различных сортов *F. rubra*

Особенности развития зародышевых мешков	Частота встречаемости по сортам					
	Tamara		Salaspils		Areta	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Преждевременная эмбриония	8	6,56	10	8,00	1	0,82
Апоспорический	3	2,46	2	1,60	6	4,92
Дегенерирующий	1	0,82	1	0,80	3	2,45

кой, двумя синергидами, центральной клеткой и тремя антиподами. У *F. rubra* при Polygonum-типе развития ЗМ антиподы многоядерные и многоядрышковые (Шишкинская и др., 2004). ЗМ апоспорического типа чаще всего были четырёхядерными, трёхклеточными, содержали яйцеклетку, синергиду и два полярных ядра. Антиподы отсутствовали. При этом ЗМ были почти сферическими с явно нарушенной полярностью. По форме, числу прошедших митотических делений и характеру дифференциации они соответствовали Rapicum-типу развития апоспорического ЗМ, характерного для апомиктических представителей

семейства Роасеае. Однако, ранних стадии развития этих ЗМ мы не наблюдали.

Дегенерирующие ЗМ были деформированными, полярные ядра и синергиды в них были на различных стадиях дегенерации.

Кроме вышеупомянутых особенностей развития ЗМ у исследованных сортов *F. rubra* было характерно наличие в большом числе ЗМ многоядрышковых полярных ядер и ядер яйцеклеток. Вместо одного ядрышка ядра яйцеклетки и (или) полярные ядра содержали два, три и более ядрышек. Относительно низкий (около 60) процент ЗМ с многоядрышковыми яйцеклетками выявлен у растений сорта Tamara, промежуточный (около 70%) - у растений сорта Areta, максимальный (около 85%) – у растений сорта Salaspils. Доля ЗМ с многоядрышковыми полярными ядрами в указанной последовательности сортов составляла около 50, 70 и 80 % соответственно, т.е. в среднем по каждому сорту доли ЗМ с многоядрышковыми яйцеклетками и многоядрышковыми полярными ядрами были близкими (табл. 3).

При этом у растений всех сортов среди многоядрышковых преобладали яйцеклетки с двумя ядрышками: почти 85 % у сорта Tamara, около 50 % - у сортов Salaspils и Areta. В 1.5-5.0 раз было меньше яйцеклеток с трёхядрышковыми ядрами. Более трёх ядрышек в ядре яйцеклетки чаще всего встречалось в ЗМ растений сорта Salaspils (около 50% от числа ЗМ с многоядрышковыми ядрами) и совсем не наблюдалось в ЗМ растений сорта Tamara.

У растений всех сортов среди многоядрышковым полярных ядер также чаще всего встречались полярные ядра с двумя ядрышками (примерно в 40 -70 % случаев). Полярных ядер, содержащих более трёх ядрышек, у растений сорта Tamara не наблюдали, хотя у сорта Salaspils таковых было около 20 %, а у растений сорта Areta – около 10 %.

Таблица 3

Частота встречаемости ЗМ с многоядрышковыми мегагаметами у растений различных сортов *F. rubra*

Тип клеток зародышевого мешка	Число ядрышек, шт.	Частота встречаемости ЗМ					
		Tamara		Salaspils		Areta	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Яйцеклетка	1	25	40,98	11	15,28	27	31,76
	2	30	49,28	29	40,28	29	34,12
	3	6	9,84	15	20,83	22	25,88
	>3	0	0	17	23,61	7	8,24
Полярные ядра	1	34	49,28	15	17,86	27	27,00
	2	24	34,78	31	36,90	44	44,00
	3	11	15,94	24	28,57	24	24,00
	>3	0	0	14	16,67	5	5,00

Интересно, что у растений всех исследованных сортов с частотой от 5 (у сорта Tamara) до 25 % (у сорта Salaspils) наблюдалось деление внутри ядер яйцеклеток по типу эндомитоза (табл. 4). Явление это для *F. rubra* в норме типично для ядер антипод, но в ядрах яйцеклеток ранее не отмечалось.

Из результатов исследования очевидно, что все три сорта *F. rubra* имеют склонность к гаметофитному апомиксису. При этом максимальная склонность отмечена у сортов Tamara и Salaspils, имеющих СДП, близкую к пороговому значению или значительно превосходящую таковое, и в 1.5 раза более низкая – у сорта Areta с низкой СДП, что соответствует известной закономерности о корреляции между уровнем СДП и вероятностью апомиксиса. Если даже подвергнуть сомнению апоспорическую природу тех образований, которые мы отнесли к ЗМ апоспорического типа, под тем предлогом, что не отслежены ранние стадии развития этих структур, тем не менее процент ЗМ с преждевременной эмбрионией останется по двум из трёх сортов довольно значительным (у сорта Tamara - 6,56 %, у сорта Salaspils - 8,00 %).

Полученные нами данные в значительной степени совпадают с известными в литературе сведениями о внутривидовой изменчивости генеративных признаков *F. rubra* (Мальцев, 2001; Шишкинская, Юдакова, 2003; Шишкинская и др., 2004). Однако, явные признаки апомиктического развития ЗМ (преждевременная эмбриония и апоспорические ЗМ) обнаружены у растений *F. rubra*, вероятно, впервые.

В целом наблюдаемая на сортовом материале при произрастании в условиях г. Саратова картина довольно существенно отличается от той, что наблюдалась в трёх естественных популяциях этого вида, ранее исследованных в отношении возможности апомиктического размножения. Как в популяции с Приполярного Урала, так и в двух популяциях с Камчатки растения имели

Таблица 4

Частота встречаемости ЗМ с эндомитотическими делениями в ядрах

Число яйцеклеток у растений различных сортов <i>F. rubra</i> Сорт	Частота встречаемости	
	шт.	%
Tamara	6	4,92
Salaspils	31	24,80
Areta	11	9,02

значительную долю дегенерирующих и аномальных ЗМ (отсутствие синергид, яйцеклеткоподобные синергиды, двух- и трёхядерные яйцеклетки и синергиды, многоядрышковые яйцеклетки и (или) полярные ядра, более чем два полярных ядра в центральной клетке, дополнительные клетки в яйцевом аппарате). Однако это можно считать лишь предпосылкой, повышающей вероятность апомиксиса в популяциях, а не

констатацией самого апомиксиса даже на уровне его элементов. Только в одной из камчатских популяций авторы наблюдали единичные случаи, которые можно интерпретировать как автономное развитие эндосперма и проэмбрио (Шишкинская и др., 2004). Наличие явных признаков гаметофитного апомиксиса с частотой до 10 % в материале наших сортов существенно отличает их от исследованных естественных популяций. Это отличие может быть следствием либо нетипичных условий обитания популяций, либо результатом гибридизации при селекции, либо обеими этими причинами одновременно.

Следует отметить, что и выявленные эмбриологические признаки апомиксиса ещё не являются достаточным основанием для утверждения, что у исследованных сортов гаметофитный апомиксис является способом семенного воспроизводства. Оба использованных в работе маркера апомиктичного развития свидетельствуют о том, что у растений исследованных сортов с определённой частотой встречаются элементы гаметофитного апомиксиса в виде апоспории и апозиготии, но остаются неясными возможность совмещения обоих этих явлений в мегагаметофитогенезе одного растения и последующая судьба апоспорических и апозиготических структур.

То обстоятельство, что все растения произрастали на одной и той же территории, цветение проходило практически одновременно, а для анализа использовались ЗМ одновозрастных цветков, локализованных в одной и той же части соцветия, дает основание утверждать, что установленные различия обусловлены генетическими особенностями сортообразцов. Показатели для каждого сорта, представленные в таблицах 2 - 4, могут служить их популяционными характеристиками.

Особого внимания заслуживает обнаружение у растений исследованных сортов случаев эндомитотических делений в ядрах яйцеклетки, особенно часто встречающихся у растений сорта Salaspils. Это, во-первых, указывает на один из возможных путей полиплоидизации растений данного вида в ряду поколений, во-вторых, говорит о родстве процессов, происходящих в антиподах и яйцеклетке, т.е. по градиенту вдоль продольной оси ЗМ, а, в-третьих, подтверждает в целом нестабильное поведение генеративных структур у *F. rubra* и может рассматриваться как ещё одно указание на наличие склонности к гаметофитному апомиксису у данного вида, так как полиплоидизированное состояние яйцеклетки может служить импульсом к её активации к партеногенетическому развитию.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 05-04-49001).

Литература

- Крайнов К.Е., Миндубаева А.Х., Еналеева Н.Х. Исследование качества пыльцы у некоторых сортов овсяницы красной в условиях г. Саратова // Бюллетень ботанического сада СГУ. Вып. 4. Саратов, 2005. С. 221-228.
- Куприянов П.Г. Способ приготовления препаратов зародышевых мешков. А. с. № 919636 // Бюлл. изобр. 1982. № 14. С. 7.
- Куприянов П.Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. Саратов, 1989. 160 с.
- Куприянов П.Г., Жолобова В.Г. Уточнение понятий нормальной и дефектной пыльцы в антморфологическом методе // Апомиксис и цитозембриология растений. Саратов, 1975. Вып. 3. С. 47-52.
- Мальцев А.В. Изучение репродуктивной биологии овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) при интродукции // Итоги интродукции и селекции травянистых растений на Урале. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2001. С. 225-240.
- Паушева А.Г. Практикум по цитологии растений. М., 1980. 304 с.
- Шишкинская Н.А., Юдакова О.И. Новый подход к использованию антморфологического метода для диагностики апомиксиса у злаков // Бюллетень ботанического сада СГУ. Вып. 2. Саратов, 2003. С. 180-187.
- Шишкинская Н.А. Юдакова О.И., Тырнов В.С. Популяционная эмбриология и апомиксис у злаков. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2004. 148 с.
- Mariani A.; Roscini C.; Basili F.; Paoletti R.; Rosafio M.C. Cytogenetic study of forage grasses and legumes // Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses = Légumineuses pour cultures fourragères, pâturages et autres usages en région méditerranéenne. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2000. P. 79-83.
- Fairey, N. A. and Lefkovitch, L. P. 1996. Crop density and seed production of creeping red fescue (*Festuca rubra* L. var. *rubra*). 2. Reproductive components and seed characteristics. Can. J. Plant Sci. 76: 299-306.
- Fairey, N. A. and Lefkovitch, L. P. 1996. Crop density and seed production of creeping red fescue (*Festuca rubra* L. var. *rubra*). 1. Yield and plant development. Can. J. Plant Sci. 76: 291-298.
- Зуева, 1999;
- Herben T, Krahulec F, Hadincova V, Pechackova S, Wildova R (2003): Year-to-year variation in plant competition in a mountain grassland. Journal of Ecology 91: (1) 103-113