

Herr J. M., Jr. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. Vol. 58, N 8. P. 785-790.

Webber I.M. Cytological features of *Nicotiana glutinosa* haploids// Journ Agric. Research.- 1933.- 47, N 11.- P. 845-867.

УДК 581.3 + 581.4:

ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМ ТАБАКА С РАННИМ ЗАЦВЕТЕНИЕМ

А.Ю. Колесова, С.Ю. Белашов, Н.Х. Еналеева

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Табак является одним из наиболее удобных объектов для проведения экспериментальных исследований по эмбриологии и генетике растений. Наличие значительного количества семян в завязи, обильное цветение и успешно применяемые методы экспресс-анализа, основанные на ферментативной мацерации и просветлении семян, позволяют проводить массовый анализ зрелых зародышевых мешков (ЗМ) и наблюдать их развитие. Кроме того, для табака разработаны методы культивирования изолированных завязей и семян в условиях *in vitro*, что дает возможность для проведения опытов по воздействию физических и химических факторов на развитие женского гаметофита.

У большинства сортов и линий *Nicotiana tabacum* L. жизненный цикл составляет 4-5 месяцев, и их массовое цветение обычно начинается через 2 месяца после высадки рассады в открытый грунт, что ограничивает время проведения экспериментов при выращивании растений в поле. В связи с этим представляют интерес формы табака с укороченным жизненным циклом, в частности, недавно выделенные в Исследовательском центре табака университета Северной Каролины (США) формы RF (rapid flowering). Согласно приведенному описанию (McDaniel, 1999), их жизненный цикл составляет около 11 недель, и цветение начинается в среднем через 53-55 дней после посева семян (при выращивании растений в оранжерее). Взрослые растения характеризуются небольшими размерами, что облегчает их содержание в оранжерее и расширяет возможности проведения экспериментальных работ с этой культурой.

Цель настоящей работы заключалась в изучении морфологических и цитозембриологических особенностей RF-форм в условиях Саратова и оценки перспектив их использования в качестве модельных объектов для эмбриогенетических исследований.

Материал и методы

Объектом изучения служили две формы табака RF1 и RF3, семена которых были любезно предоставлены профессором Verne Sisson университета Северной Каролины (США). Для сравнения была использована гомозиготная линия БГ-6, полученная в отделе генетики и цитологии Ботанического сада СГУ. Исследовалось по 5 растений каждого генотипа.

Семена изучаемых форм проращивали в чашках Петри и высаживали в конце марта в ящики в теплице на расстоянии 5x5 см. В начале июня рассада была высажена в открытый грунт.

Измерение растений и подсчет числа листьев проводили в сентябре. Морфологический анализ цветков (по 15 для каждого растения) проводили на вторые сутки после их распускания. Для эмбриологического исследования ЗМ завязи 5 предварительно кастрированных цветков с подвявшими венчиками фиксировали в ацетоалкоголе (1:3), после чего методом ферментативной мацерации (Еналеева и др., 1972) готовили суспензионные препараты. Анализ пыльцы проводили ацетокарминовым методом. При этом подсчитывали количество морфологически нормальных и аномальных (слабоокрашенных и пустых) пыльцевых зерен (ПЗ). Для каждого растения исследовалась выборка из 100 ЗМ и 300 ПЗ из 3 пыльников разных цветков.

Полученные данные обрабатывались статистически; достоверность различий определялась с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

Морфологическая характеристика растений и цветков. Растения обеих RF-форм зацветали вскоре после высадки рассады в открытый грунт в начале июня. Через месяц после посадки (в начале июля) наступало их массовое цветение. У растений контрольной линии БГ-6 цветение начиналось в конце июля (массовое цветение приходилось на август).

По сравнению с контролем растения RF-форм были значительно ниже по высоте. У RF1-растений высота в среднем составила 93,0 см, у RF3 – 103,8 см (в контроле этот показатель был равен 151,0 см). Число листьев у RF-форм также было меньше, чем у линии БГ-6 (табл. 1).

Несмотря на незначительные размеры, RF-формы обильно цвели. При постоянном обрывании коробочек их цветение продолжалось до октября, при этом за вегетационный период на них формировалось от 1000 до 1500 цветков; на растениях линии БГ-6 образовывалось около 1000 -1300 цветков.

Сравнительный морфометрический анализ цветков выявил статистически достоверные различия между RF-формами и контрольными растениями по ряду параметров (табл. 1). Так, RF1-растения превосходили контроль по длине цветка, в то время как RF3-растения не отличались от контрольных по этому показателю. У обеих RF-форм диаметр цветка и трубочки был меньше, а индекс цветка (отношение длины к диаметру) и длина завязи, напротив, - больше, чем у линии БГ-6. Растения RF3 отличались от контрольных также меньшим диаметром завязи и большим значением индекса завязи, вычисляемым как отношение длины к диаметру. У RF1-формы диаметр завязи был больше, а индекс завязи существенно не отличался от такового в контроле.

Таблица 1. Морфологическая характеристика растений и цветков линии БГ-6 и RF-форм

Форма	Высота растения, см	Количество листьев	Длина цветка, мм	Диаметр цветка, мм	Индекс цветка	Диаметр трубочки, мм	Длина завязи, мм	Диаметр завязи, мм	Индекс завязи
БГ-6	151,0±7,7	25,8±0,7	49,7±0,2	32,6±0,2	1,52±0,02	39,1±0,5	7,30±0,09	4,60±0,17	1,60±0,03
RF1	93,0±5,2*	10,6±0,5*	52,9±0,5*	29,0±0,2*	1,83±0,01*	36,8±0,3*	8,08±0,15*	4,80±0,03*	1,68±0,02***
RF3	103,8±3,7*	15,6±1,3*	49,7±0,3***	29,0±0,1*	1,71±0,01*	34,7±0,2*	8,16±0,09*	4,13±0,04*	2,00±0,02*

* различия между данной формой и линией БГ-6 достоверны на 1%-ном уровне значимости

*** различия не достоверны

Эмбриологическая характеристика. Цитозембриологический анализ показал, что у RF-форм, как и у растений линии БГ-6, формируются в основном нормальные 7-клеточные ЗМ, состоящие из трехклеточного яйцевого аппарата, центральной клетки и 3 антипод. RF-формы практически не отличались от контрольных растений по расположению ядер и клеток в ЗМ (табл. 2).

Яйцевой аппарат в подавляющем большинстве случаев имел типичное строение, то есть, состоял из двух синергид с базально расположенными ядрами и яйцеклетки с апикальным положением ядра (табл. 2).

Ядра центральной клетки (два или одно вторичное) чаще всего (87,5 – 100%) находились в микропиллярной части клетки около яйцевого аппарата, значительно реже – в центре клетки или в халазальной части около антипод. Во многих ЗМ отмечалось слияние полярных ядер. У контрольных растений слияние происходило в среднем в 73,9% ЗМ, у RF1 и RF3-форм – в 60,5 и 40,4% ЗМ соответственно.

Антиподальный аппарат, состоящий, как правило, из трех клеток, варьировал по своей морфологии. В проведенных ранее работах по эмбриологии табака было обнаружено три морфологических типа антиподального аппарата (Еналеева и др., 1986), обозначенных как: 1) “розетка” – все клетки антипод соприкасаются друг с другом; 2) “линейный”, когда клетки располагаются цепочкой вдоль продольной оси ЗМ; 3) “гомологичный яйцевому” – антиподальный комплекс по своей морфологии напоминает яйцевой аппарат. У всех трех изученных форм антиподы наиболее часто располагались по типу “розетка”, лишь в единичных ЗМ встречались “линейные” и “гомологичные яйцевому” типы. В части ЗМ антиподы отсутствовали. Средние частоты встречаемости ЗМ без антипод у RF1 и RF3-форм (14,1 и 16,2% соответственно) были достоверно выше, чем у контрольной линии (7,7%).

Помимо ЗМ нормального строения, у всех растений с небольшой частотой (1-5%) встречались аномальные ЗМ. В основном это были так называемые “субнормальные” ЗМ (Еналеева, 2001) с яйцеклеткоподобной синергидой. Также были обнаружены ЗМ клеточного строения с увеличенным и уменьшенным числом ядер; ЗМ с нормальным числом ядер, равным 7-8, аномально дифференцированные; субнормальные ЗМ с синергидоподобной яйцеклеткой и ценозитный ЗМ с числом ядер меньше 7. У RF1 и RF3-форм средние частоты встречаемости аномальных ЗМ оказались равными 2,4 и 1,6% (в контроле – 4,0%).

Проведенный анализ пыльцы показал, что частота формирования аномальных ПЗ у разных растений варьирует от 4,0 до 8,3% (табл. 3) и в среднем составляет 6,8 и 4,9% у RF1 и RF3-форм, в контроле – 6,2%.

Таблица 2. Результаты анализа ЗМ линии БГ-6 и RF-форм

Форма	№ расте- ния	Количество (%) ЗМ												без антипод ядрами	со слив- шимися поляр- ными ядрами
		с расположением ядер						с формой антиподального							
		синергид		яйцеклетки		центральная клетка		"розет- ка"		аппарата*		"гомоло- гичный яйцево- му"			
		апка- льно- базаль- ным	базаль- алика- льным	базаль- ным	около яйце- вого аппарата	около яйце- вого аппарата	в центре анти- под	около анти- под	"линей- ный"	"линей- ный"					
БГ-6	1	1,0	100,0	100,0	0	87,5	8,3	4,2	97,9	2,1	0	0	3,1	79,2	
	2	2,1	99,9	100,0	0	90,7	8,3	1,1	97,9	2,1	0	0	4,1	83,5	
	3	1,0	99,0	100,0	0	97,0	2,0	1,0	97,7	2,3	0	0	14,3	71,4	
	4	3,0	97,0	100,0	0	98,0	2,0	0	99,0	1,0	0	0	8,0	62,0	
	5	2,0	99,0	99,0	1,0	100,0	0,0	0	100,0	0	0	0	9,2	73,5	
Среднее значение		1,8	98,6	99,8	0,2	94,6	4,1	1,3	98,5	1,5	0	0	7,7	73,9	
RF1	1	0	100,0	100,0	0	94,9	5,15	0	97,9	2,1	0	0	26,8	49,5	
	2	0	100,0	100,0	0	100,0	0	0	100,0	0	0	0	22,5	72,5	
	3	2,0	98,0	100,0	0	99,0	1,0	0	100,0	0	0	0	5,0	47,0	
	4	2,0	98,0	100,0	0	99,0	1,0	0	98,0	1,0	1,0	0	8,0	66,0	
	5	2,0	98,0	100,0	0	98,0	2,0	0	99,0	1,0	0	0	8,1	67,7	
Среднее значение		1,2	98,8	100,0	0	98,2	1,8	0	99,0	0,8	0,2	0,2	14,1	60,5	
RF3	1	0	100,0	100,0	0	99,0	1,0	1	99,0	0	1,0	0	20,2	55,6	
	2	0	100,0	100,0	0	99,0	1,0	0	99,0	0	1,0	0	16,3	33,7	
	3	0	100,0	99,0	1,0	97,0	3,0	0	100,0	0	0	0	16,2	18,2	
	4	2,0	98,0	100,0	0	100,0	0,0	0	99,0	0	1,0	0	17,0	51	
	5	0	100,0	100,0	0	99,0	1,0	0	98,0	1,0	1,0	0	11,1	43,4	
Среднее значение		0,4	99,6	99,8	0,2	98,8	1,2	0,2	99,0	0,2	0,8	0,8	16,2	40,4	

* в ЗМ с тремя антиподами

Таблица 3. Частота встречаемости аномальных ЗМ и ПЗ у растений линии БГ-6 и RF-форм

Форма	№ растения	Количество (%) аномальных	
		ЗМ	ПЗ
БГ-6	1	4,0	8,0
	2	5,0	7,3
	3	3,0	6,3
	4	3,0	4,0
	5	5,0	5,3
Среднее значение		4,0	6,2
RF1	1	3,0	8,3
	2	2,0	6,3
	3	2,0	7,3
	4	2,0	6,3
	5	3,0	6,0
Среднее значение		2,4	6,8
RF3	1	1,0	4,0
	2	2,0	5,3
	3	2,0	4,7
	4	2,0	5,0
	5	1,0	5,7
Среднее значение		1,6	4,9

В результате проведенного исследования установлено, что все исследованные формы табака характеризуются определенными морфологическими и эмбриологическими особенностями. RF-формы отличались от контрольной линии меньшей высотой растений, морфометрическими параметрами цветка и его отдельных частей.

Особенности в строении ЗМ заключались в более высокой частоте образования ЗМ без антипод и меньшей частоте слияния полярных ядер у RF-форм по сравнению с контролем. Известно, что данные признаки ЗМ в значительной степени зависят от его "возраста", так как слияние полярных ядер происходит на определенном этапе онтогенеза ЗМ, а антиподы зрелого ЗМ могут дегенерировать. В то же время отсутствие антипод в ЗМ может быть связано и с так называемым явлением "депрессии халазального полюса ЗМ" (Романов, 1971), выражающемся в подавлении делений и дегенерации халазальных ядер на этапе формирования ЗМ. В проведенных ранее работах по эмбриологии табака (Еналеева и др., 1986) значительное варьирование количества ЗМ со слившимися полярными ядрами и без антипод, обнаруженное у разных растений, объяснялось "разновозрастностью" завязей. Однако в нашем случае различия между RF-формами и контролем по этим показателям не могут быть связаны лишь с

различиями в возрасте завязей, поскольку у RF-форм при увеличении числа ЗМ без антипод наблюдалось уменьшение количества ЗМ со слившимися полярными ядрами. Наблюдаемые нами различия, по-видимому, обусловлены метаболическими особенностями семяночек изученных форм.

У исследованных растений наблюдались вариации по местоположению ядер и клеток в ЗМ, однако их количественная выраженность у разных форм существенно не различалась.

Частота встречаемости аномалий в строении женского и мужского гаметофитов у всех проанализированных растений была невысокой (соответственно от 1 до 5% и от 4,0 до 8,3%), и полученные значения соответствуют таковым у изученных ранее сортов и линий табака (Еналеева и др., 1986; Еналеева, 2001).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что RF-формы характеризуются ранним зацветанием, обильным цветением и значительно меньшими, по сравнению с контрольной линией, размерами растений. Эти показатели в сочетании с высокой константностью в проявлении цитологических признаков женского и мужского гаметофитов позволяют оценить данные формы как перспективный материал для дальнейших исследований в области экспериментальной эмбриологии и генетики растений.

ЛИТЕРАТУРА

Еналеева Н. Х. Спектры аномальных зародышевых мешков у растений *Nicotiana tabacum* L. разных сортов и линий // Известия Саратовского государственного университета. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2001. - Сер. Биол., Вып. спец. - С. 189-195.

Еналеева Н. Х., Лобанова Л. П., Тырнов В. С. Изучение зародышевых мешков реституционных диплоидов табака, полученных из андроклиных гаплоидов в культуре тканей // Апомиксис и цитозембриология растений. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1986. - Вып. 6. - С. 62-74.

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.

Романов И. Д. Типы развития зародышевых мешков покрытосеменных растений // Проблемы эмбриологии / Под ред. Зосимовича В. П. - Киев: Наук. думка, 1971. - С. 72-112.

McDaniel C. N. Rapid flowering *Nicotiana tabacum* L. // Sex. Plant Reprod. 1999. - №12. - P.123-124.