

МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКОВ МЕГАГАМЕТОФИТА ТАБАКА, ИНДУЦИРОВАННАЯ ФИТОГОРМОНАМИ

Л.П. Лобанова, О.А. Бокова

Саратовский государственный университет,
кафедра генетики
E-mail: biofac@sgu.ru

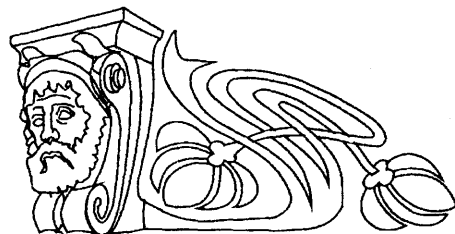
В условиях *in vitro* исследовалось влияние экзогенных фитогормонов на процессы формирования женского гаметофита табака. Показана зависимость цитологических событий мегагаметофитогенеза от концентрации фитогормонов. Отмечена определенная специфика реакций развивающегося гаметофита на ауксины (ИУК, 2,4-Д) и кинетин.

Modification variability of tobacco megagametophit tags induced by phitohormones

L.P. Lobanova, O.A. Bokova

The influence of exogenic phitohormones on the formation processes of female tobacco hametophit was studied *in vitro*. A relation between cytological megagametophitogenesis events and phitohormone concentrations was revealed. A certain specificity of developing gametophit reactions to auxins (IAC, 2,4-D) and kinetin is noted.

Структурная организация мегагаметофита или зародышевого мешка (ЗМ) во многом определяет процессы оплодотворения, формирования зародыша и эндосперма. В норме ЗМ большинства покрытосеменных растений характеризуется специфической морфофункциональной организацией. Аномальные изменения структуры ЗМ обусловлены изменением числа митотических делений при его формировании, нарушениями цитокинеза и дифференциации его клеток. Фенотипически это проявляется в изменении размеров и формы клеток, увеличении или уменьшении числа ядер, появлении ценоцитных и атипично дифференцированных ЗМ. При изучении вариабельности структуры ЗМ выделяют также группу «субнормальных» ЗМ, у которых сохраняется типичный план строения, но изменяется морфология клеток яйцевого аппарата [1]. В этом случае обра-



зуются либо яйцеклеткоподобные синергиды, либо синергидоподобные яйцеклетки, либо клетки синергид со смещенным расположением относительно друг друга. Субнормальные ЗМ представляют интерес в связи с возможными изменениями функции синергид и яйцеклетки.

Данных о влиянии фитогормонов на процесс развития женского гаметофита практически нет. И хотя в ряде работ по индукции гиногенеза *in vitro* зарегистрирована возможность развития ЗМ до зрелой стадии на средах с разными комбинациями фитогормонов [2—4], в них никогда не ставилась цель исследования мегагаметофитогенеза. Только в единичных работах отмечается, что присутствие в питательной среде цитокининов и ауксинов может вызвать изменение нормального хода развития ЗМ [5].

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния экзогенных фитогормонов на процессы формирования ЗМ табака: клеточные деления, цитокинез, 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 послужила линия *Nicotiana tabacum* RF-3. Выбор данной линии был обусловлен высокой константностью в проявлении цитологических признаков женс-



кого гаметофита. В полевых условиях произрастания у *RF*-формы формируются в основном нормальные 7-клеточные биполярные ЗМ, состоящие из 3-клеточного яйцевого аппарата, двухъядерной центральной клетки и трех антипод. Аномальные и «субнормальные» ЗМ встречаются с небольшой частотой в среднем равной 1,6% [6].

Исследование влияния фитогормонов на развитие ЗМ проводилось с помощью метода культивирования завязей *in vitro* [5]. Это позволило создать строго контролируемые условия, в том числе и гормональные.

Для культивирования брали завязи, содержащие ЗМ на одноядерной стадии развития. В качестве основной питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга. Семь вариантов питательных сред отличались только по содержанию фитогормонов: безгормональная, с ИУК в концентрации 2 и 10 мг/л, с 2,4-Д и кинетином в тех же концентрациях.

В каждом варианте исследовалась выборка из 100 ЗМ из 5–7 завязей. Процент аномальных ЗМ рассчитывался от общего числа проанализированных ЗМ ($n = 100$), а субнормальных — от числа ЗМ с типичной структурой, то есть « n минус аномальные ЗМ».

Результаты и их обсуждение

Через 3-е суток культивирования на всех средах одноядерные ЗМ достигали стадии зрелых ЗМ. На безгормональной среде 97–98% ЗМ имели нормальное строение. В единичных ЗМ типичного строения наблюдалось изменение дифференциации клеток яйцевого аппарата: появление синергидоподобных яйцеклеток и яйцеклеткоподобных синергид. В целом отмеченный на безгормональной среде спектр отклонений не отличался от обнаруженных у ЗМ, развитие которых осуществлялось *in vivo* [6].

При введении в состав питательной среды ауксинов и кинетина зарегистрировано увеличение числа отклонений. Результаты анализа зрелых ЗМ в зависимости от гормонального состава, концентрации и продолжительности культивирования приведены в таблице. Видно, что во всех вариантах повышение концентрации фитогормонов увеличивает количество нарушений в развитии ЗМ.

Действие ауксинов (ИУК и 2,4-Д) проявилось прежде всего в подавлении митозов. Результатом явилось увеличение числа ЗМ с числом ядер менее 8. Появление 2- и 4-ядерных биполярных ЗМ свидетельствует об остановке их развития на ранних стадиях. Появление моно- или аполярных ЗМ сопряжено с отсутствием крупной центральной вакуоли. В этом случае ядра не разделяются по полюсам

на две группы, а беспорядочно разбросаны в полости ЗМ или сгруппированы на одном конце. В таких ЗМ возможны асинхронные митозы, которые приводят к появлению ЗМ с нечетным числом ядер. У большинства аномальных ЗМ в вариантах с добавлением ауксинов наблюдается полное подавление цитокинеза и образование ценоцитных структур. Возможно, что все эти нарушения связаны с изменением цитоскелета, который является основой внутриклеточной структуры и внутриклеточной подвижности. В последнее время все больше накапливается данных о влиянии фитогормонов, в том числе и ауксинов, на ориентацию и переориентацию микротрубочек [7].

Повышенные концентрации ауксинов отчасти подавляют специфическую дифференцировку клеток яйцевого аппарата. Косвенным указанием на это служит появление в вариантах с ауксинами ЗМ, в которых размеры яйцеклеток и синергид уменьшены, а синергиды нередко различаются по размеру. Наиболее отчетливо влияние ауксинов на характер дифференцировки клеток яйцевого аппарата проявляется в увеличении числа синергидоподобных яйцеклеток. Однако наряду с четкими синергидоподобными яйцеклетками встречаются яйцеклетки, в которых ядро занимает промежуточное положение между апикальным и базальным положениями. Зарегистрирована также зависимость числа нарушений в дифференцировке клеток яйцевого аппарата от продолжительности культивирования: на 5-е сутки количество аномально дифференцированных клеток было выше, чем через 3-е суток. Последнее указывает на возможность вторичных изменений в дифференцировке яйцеклетки. Возможно, что перемещение ядра в клетке обусловлено отмеченной выше, способностью ауксинов вызывать переориентацию микротрубочек и микрофиламентов цитоскелета, от которых зависит процесс циклоза [7]. В литературе также имеются данные о стимуляции скорости этого процесса ауксинами [8].

Влияние кинетина на формирование структуры женского гаметофита менее выражено, чем ауксинов. Это проявляется в снижении количества как аномальных, так и субнормальных ЗМ. Кинетин также подавляет митозы и цитокинез, но среди аномальных ЗМ возрастает доля с образованием клеточных перегородок.

В вариантах с кинетином, по сравнению с контролем, число нарушений в дифференцировке клеток яйцевого аппарата повышено незначительно. Этот результат не совпадает с данными, полученными ранее для линии табака БГ-6, об увеличении яйцеклеткоподобных синергид под действием кинетина (Еналеева, Лобанова, неопубл.). И хотя



нельзя исключить, что эти межлинейные различия обусловлены особенностями генотипов линий, необходимо провести дополнительные исследования, поскольку данный тип отклонений представляет интерес и как контрастный действию ауксинов, и как перспективная модификация структуры ЗМ для получения гаплоидов и полиэмбрионов.

Таким образом, в ходе данной работы установлена зависимость определенных цитологических событий мегagamетофитогенеза от

присутствия фитогормонов. Изменения морфологической структуры ЗМ были обусловлены нарушением одного или нескольких процессов: митотических делений, поляризации, цитокинеза, клеточной дифференциации. Отмечена также определенная специфика реакций развивающегося ЗМ на ауксин и кинетин. Не исключено, что, используя фитогормоны, их разные концентрации и сочетания, можно активно вмешиваться в эмбриональные процессы, изменяя их ход.

Частота структурных изменений в зрелых зародышевых мешках табака, развитие которых проходило под влиянием различных фитогормонов

Фитогормоны	Концентрация, мг/л	Срок культивирования, сут.	Всего аномальных ЗМ, %	Нарушение признаков ЗМ, %						
				число ядер		отсутствие цитокинеза (ценоцитные ЗМ)	дифференцировка			
				меньше 8	больше 8		несколько клеток 8-ядерного ЗМ	яйцеклетки (синергидоподобные)	синергид (яйцеклеткоподобные)	линейное расположение синергид
Б/Г**		3	3	1	0	1	2	2	2	1
		5	2	1	0	0	1	1	3	0
ИУК	2	3	10	7	1	3	1	3	2	4
		5	7	7	0	5	2	5	4	0
	10	3	28	28	0	25	0	8	5	3
2,4-Д	2	5	3	3	0	3	0	4	1	1
		10	3	26	25	1	21	0	3	0
	5	10	10	0	5	0	8	2	5	
Кинетин	2	3	5	5	0	2	0	3	3	4
		10	3	4	3	0	1	1	2	2
	5	10	8	1	5	0	1	2	4	

* В одном ЗМ возможно нарушение нескольких признаков.

** Безгормональная питательная среда.

Библиографический список

1. Еналеева Н.Х. Изменчивость цитологической структуры мегagamетофита // Физиология растений. 2003. Т.50, №3. С. 398–403.
2. Zhou C., Yang H.-Y. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture // Plant Sci. Lett. 1981. V. 20. P. 231–237.
3. Бугара А.М., Русина Л.В. Культура неоплодотворенных завязей и семян in vitro как способ получения гаплоидных растений // Физиология и биохимия культ. раст. 1988. Т. 20, №5. С. 219–230.
4. Van Geyt J., Speckmann G. J., D'Halluin K., Jacobs M. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Theor. Eppl. Genet. 1987. V. 73. P. 920–925.
5. Lobanova L., Enaleeva N. The development of embryo sacs in in vitro ovaries of *Nicotiana tabacum* L. // Plant Science. 1998. V. 132. P. 191–202.
6. Колесова А.Ю., Белашов С.Ю., Еналеева Н.Х. Эмбриологическое и морфологическое исследование форм табака с ранним зацветанием // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2002. Вып. 1. С. 80–86.
7. Клячко Н. Л. Фитогормоны и цитоскелет // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 3. С. 475–480.
8. Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W. Hormone-cytoskeleton interactions in plant cells // Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones / Eds. K.L. Libbenga, M. Hall, P.J.J. Hooykaas. Leiden, 1999. P. 363–386.