

## Литература

1. Атабекова А.И. Цитология растений / А.И. Атабекова, Е.И. Устинова // М.: Колос, 1980.— С. 105–176.
2. Кучеренко Л.А. Каллусогенез, выход и характеристика регенерирующих растений риса в культуре тканей в зависимости от гормонального состава индукционной среды // Доклад РАСХН, 1993.— №4.— С. 3–6.
3. Круглова Н.Н. Морфогенетический потенциал спорогенных клеток пыльника злаков / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, О.А. Сельдиминова // 2008.— С. 21.
4. Либберт Э. Физиология растений // М.: Мир, 1976.— С. 353–370.
5. Методические указания “Анатомия риса” // ВНИИ риса, 1982.— 110 с.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений // М.: Колос.— 1974.— 284 с.
7. Тутаюк В.Х. Анатомия и морфология растений // М.: Высшая школа, 1980.— 315 с.
8. Шевелуха В.С. Морфогенез в каллусных тканях // Сельскохозяйственная биотехнология, 1996.— С. 29–35.
9. Фурст Т.Г. Методы анатомо-гистологического исследования растительных тканей // М.: Наука, 1979.— С. 42–115.
10. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия // М.: Мир, 1969.— С. 109–445.

## Резюме

Применение анатомических и гистохимических методов позволяет детально разобраться в структурах исследуемой ткани. Благодаря этим методам выявлены этапы развития андроклинового каллуса риса и определены пути морфогенеза в нем.

Application of anatomical and histochemical methods allows to understand the structures of studied tissue in detail. Thanks to these methods stages of development of rice androclinium callus were found out and the ways of morphogenesis in it were determined.

**ЗАХАРОВА Е.В.<sup>2</sup>, ВОРОНКОВ А.С.<sup>1</sup>, СКОРОБОГАТОВА И.В.<sup>2</sup>, КОВАЛЕВА Л.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35, e-mail: kovaleva\_l@mail.ru

<sup>2</sup>Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева

## ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *IN VITRO* ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: УЧАСТИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

Имеющиеся немногочисленные сведения о регуляции прорастания пыльцевых зерен на поверхности рыльца и росте пыльцевых трубок в тканях столбика свидетельствуют о сложных перестройках в гормональной системе пестика (Kovaleva and Zakharova, 2003). Исследования, проведенные ранее на модельной системе, *in vitro* прорастающих пыльцевых зернах петунии (*Petunia hybrida* L.), показали, что динамика эндогенного содержания каждо-

го из фитогормонов и эффекты экзогенных фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок характеризовались индивидуальной спецификой (Ковалева и др., 2005). Экзогенные ИУК, АБК и гиббереллин  $A_3$  стимулировали, а синтетический цитокинин 6-БАП ингибировал прорастание и рост мужского гаметофита. Ингибитор транспорта ИУК (2,4-хлорфенокси-2 метилпропионовая кислота) полностью подавляла, а ингибиторы синтеза АБК (флуридон) и гиббереллинов (паклобутразол) тормозили прорастание мужского гаметофита.

Целью данной работы было выяснение вопроса о потенциальном участии цитоскелета в гормональной регуляции прорастания и роста мужского гаметофита петунии.

Актиновый цитоскелет пыльцевой трубки является основным компонентом, участвующим в направленном токе цитоплазмы и вместе с ней органелл и везикул, обеспечивающих апикальный рост (Steer and Steer, 1989; Vidali and Hepler, 2001). Актиновый цитоскелет существует в равновесии между мономерной формой (G-актин) и полимерной формой (F-актин). Быстрое превращение одной формы в другую является обязательным условием для его функционирования. Переориентация структур цитоскелета на разных стадиях роста пыльцевых трубок предполагает, что они отвечают на внутри- и внеклеточные сигналы. Актиновый цитоскелет, наряду с секреторным аппаратом (везикулярным транспортом), является структурой, в которой, по-видимому, сходится большая часть сигнальных путей пыльцевой трубки. Известно, что есть целый ряд путей передачи сигналов, с которыми связаны актиновый цитоскелет и рост пыльцевой трубки, в том числе  $Ca^{2+}$ , показатель степени кислотности среды, обратимое фосфорилирование белков, фосфоинозитиды, фосфолипиды и Rop GTPases (Malho et al., 2006).

### **Материалы и методы**

Растения выращивали в условиях почвенной культуры в оранжерее и вегетационном домике Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Свежесобранную пыльцу культивировали при 26 °С на среде, содержащей 0,4 М сахарозу, 1,6 мМ  $H_3BO_3$ , 1,3 мМ  $Ca(NO_3)_2$ , 0,9 мМ  $KNO_3$  и 0,8 мМ  $MgSO_4$ .

За прорастанием пыльцы и ростом пыльцевых трубок следили на флуоресцентном микроскопе Axio Imagedge D1, снимки получали с помощью камеры Axio Cam MRC. Измерения длины пыльцевых трубок выполняли в программе AxioVizion 4.5.

Содержание фитогормонов (АБК — абсцизовая кислота, ГК — гибберелловая кислота, ЦК — цитокинины, ИУК — индолилуксусная кислота) определяли методом ВЭЖХ в одной навеске пыльцы (Скоробогатова и др., 1999). Навеску растительного материала заливали охлажденным 80%-ным раствором метанола в воде в соотношении 1:20 и оставляли при 4 °С в холодильнике на две недели. Затем растительную массу отфильтровывали, а раствор метанола упаривали до водного остатка, который затем подкисляли

1%-ным раствором HCl до pH 2–3. Подкисленный водный остаток очищали трехкратной экстракцией гексаном в соотношении 1:1. Гексановые экстракты отбрасывали, а к водному остатку добавляли 1%-ный раствор антиоксиданта (неозон Д — 1 мл на пробу). Все пробы доводили до одного объема дистиллированной водой. Затем эти растворы трижды экстрагировали на качалке этилацетатом в соотношении 1:1 (30 мин при 200 об/мин). Этилацетатные вытяжки объединяли и после их высушивания досуха выпариванием использовали для определения ГК, АБК и ИУК. Оставшийся после экстракции водный осадок доводили 20%-ным раствором КОН до pH 8 и два раза экстрагировали бутанолом, насыщенным водой (30 мин при 200 об/мин). Бутанольную фракцию высушивали испарением и использовали для определения ЦК. АБК, ИУК и цитокинины анализировали методом ВЭЖХ, ГК — по методу Frankland and Wareing (1960) с использованием салата сорта “Берлинский”, обладающего высокой чувствительностью к данному фитогормону.

### **Результаты и обсуждение**

В серии экспериментов мы исследовали действие ингибитора полимеризации F-актина латрункулина Б на прорастание, рост и эндогенный уровень фитогормонов в *in vitro* прорастающих пыльцевых трубках петунии.

Установлено, что прорастание и рост мужского гаметофита чувствительны к латрункулину Б. Ингибитор полимеризации актина, в зависимости от его концентрации, оказывал различные эффекты. Латрункулин в концентрации 100 нМ, связываясь с актиновыми филаментами, приводил к их деполимеризации до мономерного актина после 20 минут воздействия, вследствие чего прорастание пыльцевых зёрен полностью блокировалось. В концентрации 2 нМ латрункулин приводил к блокированию прорастания пыльцевых трубок, при их прорастании наблюдали потерю униполярности. Низкая концентрация ингибитора (0,2 нМ) не приводила к ингибированию роста пыльцевых трубок, а лишь замедляла его.

В опытах по изучению эффектов латрункулина на эндогенное содержание фитогормонов мы использовали пыльцу, прорастающую на среде без латрункулина (контрольный вариант) и с латрункулином в концентрации 0,2 нМ (опытный вариант). Содержание фитогормонов (ИУК, АБК, гиббереллинов и цитокининов) определяли в пыльце и среде культивирования в трех точках: 0, 1 и 4 часа культивирования. Пыльцу отделяли от среды на бумажном фильтре (для нулевой точки — 3–5 минутное смачивание пыльцы). Как показали результаты, прорастание пыльцы на среде с ингибитором полимеризации актина сопровождалось изменением динамики содержания фитогормонов (рис.).

В первой точке (0 часов) латрункулин не успевал повлиять на структуру актина мужского гаметофита и, как следует из данных, представленных на графиках, не выявлено какой-либо разницы в уровнях всех исследованных гормонов в опытном варианте (с латрункулином) по сравнению с контрольным (без латрункулина). Следует отметить, что за очень короткое время смачивания пыльцы (3–5 минут) ИУК, АБК и гиббереллины активно выхо-

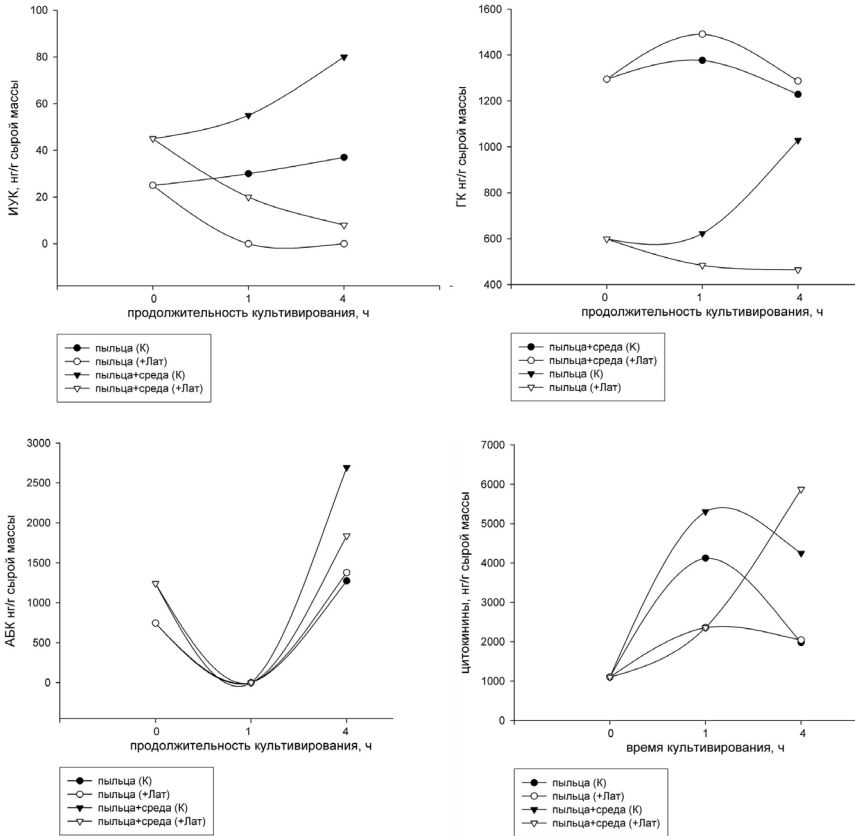


Рис. 1. Динамика содержания фитогормонов в прорастающем мужском гаметофите петунии на среде без латрункулина (контроль) и с 0,2 нМ латрункулина Б (опыт)

дили из нее в среду культивирования, где их концентрация была сопоставима с их содержанием в пыльце. Цитокинины, напротив, практически не выходили из пыльцевых зерен, и их концентрация в среде была очень низкой.

Культивирование пыльцы в течение одного часа на среде в присутствии латрункулина, очевидно, приводило к нарушению citoархитектуры актинового цитоскелета мужского гаметофита и, как следствие, к последующему ингибированию его роста. Торможение роста сопровождалось резким (до нуля) падением содержания ИУК в пыльцевых зернах, в отличие от контрольного варианта, где рост пыльцевых трубок сопровождался резким подъемом уровня ИУК. В содержании других гормонов каких-либо значительных различий между контрольным и опытным вариантами не наблюдали.

При дальнейшем культивировании, через 4 часа длина пыльцевых трубок на среде с латрункулином была в 5 раз меньше длины пыльцевых трубок, растущих на среде без латрункулина. В опытном варианте продолжалось снижение общего уровня ИУК (в отличие от контрольного варианта). Уровень гиббереллинов в опытном варианте заметно снижался в пыльцевых зернах, но возрастал в среде культивирования, в результате их общий уровень в опытном варианте сохранялся на уровне контроля. Концентрация зеатина в пыльце контрольного и опытного вариантов была одинаковой, но в среде культивирования она возрастала.

Таким образом, проведенные исследования выявили взаимосвязь функционирования актинового цитоскелета мужского гаметофита с гормональной регуляцией. Если при культивировании пыльцы на среде без латрункулина мы наблюдали увеличение содержания ИУК в течение 4 часов, как в самой пыльце, так и среде культивирования, то на среде с латрункулином содержание ИУК в пыльцевых зернах падало до нуля на фоне постоянного ее снижения в среде культивирования. Следовательно, резкое снижение темпов роста пыльцевых трубок на среде с латрункулином, очевидно, обусловлено нарушением полимеризации актинового цитоскелета и падением содержания эндогенной ИУК, играющей центральную роль в поддержании апикально-направленного роста пыльцевых трубок.

#### Литература

1. Steer M.W., Steer J.L. Pollen tube tip growth // *New Phytol.*— 1989.— 111.— P. 323–358.
2. Vidali L., Hepler P.K. Actin and pollen tube growth // *Protoplasma.*— 2001.— 215.— P. 64–76.
3. Vidali L., McKenna S.T., Hepler P.K. Actin polymerization is essential for pollen tube growth // *Mol. Boil. Cell.*— 2001.— 12.— P. 2534–2545.
4. Malho R., Liu Q., Monteiro D., Rato C., Camacho L., Dinis A. Signalling pathways in pollen germination and tube growth // *Protoplasma.*— 2006.— 228.— P. 21–30.
5. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal control of pollen-pistil interactions at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *petunia* (*Petunia hybrida* L.) // *Sex. Plant. Reprod.*— 2003.— 16.— P. 191–196.
6. Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапова П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменения содержания фитогормонов в проростках ячменя в онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост. // *Агрохимия.*— 1999.— 8.— С. 49–53.
7. Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Минкина Ю.В., Тимофеева Г.В., Андреев И.М. Прорастание и рост *in vitro* мужского гаметофита петунии чувствительны к действию экзогенных фитогормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // *Физиология растений.*— 2005.— 52.— С. 584–590.

#### Резюме

Ингибирование роста пыльцевых трубок петунии на среде культивирования в присутствии ингибитора полимеризации актина латрункулина Б сопровождалось резким (до нуля) падением эндогенного содержания ИУК, что свидетельствует о роли этого фитогормона в поддержании полярного роста мужского гаметофита.

Інгібування росту пилкових трубок петунії на середовищі культивування в присутності інгібітору полімеризації актину латрункуліна В супроводжувалося різким (до нуля) падінням ендogenous змісту ІОК, що свідчить про роль цього фітогормону в підтримці полярного росту чоловічого гаметофіту.

The inhibition of petunia pollen tube growth on the culture medium at presence of latrunculin B, inhibitor of actin polymerization, would be accompanied sharp (to zero) by falling of IAA contain that testifies to a role of this phytohormone in maintenance of polar growth of male gametophyte.

**КАРПЕЧЕНКО К.А.\***, **КАРПЕЧЕНКО Н.А.\***, **ЗЕМЛЯНУХИНА О.А.\***,  
**ДЖАНГИРОВ М.Ю.\*\***, **СКРЫПНИК И.А.\*\***

\* ФГУП «НИИ лесной генетики и селекции» (НИИЛГиС),  
Россия, 394087, Воронеж, ул.Ломоносова, 105, e-mail: oz54@mail.ru

\*\* ФГУ «НИИ горного лесоводства и экологии леса» (НИИ горлесэкологии),  
Россия, 354002, Сочи, Курортный пр., 74, nikiforovdn@mail.ru

### **ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО И ДУБА СКАЛЬНОГО *IN VITRO***

В настоящее время отмечается деградация и массовое усыхание дубрав, что стало глобальным явлением и отмечено практически во всех ареалах многих видов дуба по всему миру. В этой связи встает проблема лесовосстановления дубрав, которая затруднена периодичностью плодоношения и трудностями закладки лесосеменных плантаций.

Основные проблемы при закладке ЛСП дуба:

- плодоношение с 15–60-летнего возраста;
- интенсивное плодоношение раз в 4–5 лет;
- затруднено определение генетической ценности плюсовых деревьев и их семенного потомства;
- отторжение значительной части прививок от подвоя.

Целью настоящей работы является изучение минерального состава питательных сред и гормональных добавок на регенерацию, размножение и укоренение микрочеренков *Q. robur* L. (дуб черешчатый) и *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (дуб скальный).

#### **Материалы и методы**

*Объекты исследования.* Желуди дуба черешчатого были собраны осенью 2009 г. в санатории им. Горького (1 дерево), в парке “Динамо” (2 дерева) (г. Воронеж). Желуди дуба скального были присланы осенью 2009 г. из НИИ горного лесоводства (г. Сочи).

Желуди проращивали в условиях 16-часового фотопериода, в лесной почве, взятой в окрестностях НИИЛГиС.

*Стерилизация растительного материала.* По достижении достаточной длины для 3–4 сегментов проростки желудей отрезали и стерилизовали.