

4. *Круглова Н. Н., Куксо П.А.* Стрессовая индукция андроклинии // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. № 3. – С. 256-272.
5. *Кудоярова Г.Р.* Иммуноферментный анализ регуляторов роста: применение в физиологии растений и экологии / Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1990. 132 с.
6. *Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И.* Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений, 1986. Т. 33. № 6. С. 1221-1227.
7. *Deutsch F., Kumlehn J., Zeigenhagen B., Fladung M.* Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture / Physiologia plantarum. – 2004. – V. 120. – P. 613-622.
8. *Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S., Eriksson T.* The development of somatic embryogenesis in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science. – 1985. – V. 38. – P. 53–59.
9. *Malabadi R. B., Van Staden J.* Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices; of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. – 2005. – V. 25. – P. 11-16.
10. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – №4. – P. 473-497.
11. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 p.

Резюме

Инициация соматического эмбриогенеза у хвойных видов – лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проводилась с использованием зиготических зародышей на разных стадиях их развития и сегментов вегетативных побегов, андроклинии из микроспор и недозрелых мужских гаметофитов. Культивирование велось на среде MS и ½ MS, ½ LV и MSG, DCR и K₉₉ с гормонами 2,4-Д, 6-БАП, ИМК и АБК в разных концентрациях. Образование морфогенного и андрогенного каллусов требует гормональной регуляции. Успешность соматического эмбриогенеза и андроклинии у хвойных видов связана с генотипом дерева и зависит от стадии развития эксплантов.

Induction of somatic embryogenesis in Siberian coniferous species - Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) has been conducted from zygotic embryos on different stages and segments of vegetative shoots, androgenesis in vitro from microspores and immature male gametophytes. Culturing was made on MS, ½ MS, ½ LV, MSG, DCR and K₉₉ nutrition media with hormones 2,4-D, 6-BAP, IBA and ABK in different concentrations. The formation of morphogenic and androgenic callus depend on hormonal regulation. Success of somatic embryogenesis procedure of Siberian coniferous species connected with tree genotype and depends on stage of explants development.

ТРУХАНОВЕЦ Н. Л., МОЗГОВА Г. В.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси
220072 Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Trukhanovets@igc.bas-net.by

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА АЛЬБИНОСНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

В ходе естественного развития микроспоры растений проходят несколько этапов дифференцировки и превращаются в пыльцевые зерна. Однако при создании определенных условий в культуре клеток и тканей *in vitro* они могут развиваться по пути формирования гаплоидных зародышей. Такой андрогенетический путь развития называется также пыльцевым эмбриогенезом. Индукция пыльцевого эмбриогенеза

часто сопровождается формированием альбиносных растений с различной частотой, в зависимости от генотипа. Это явление довольно обычно для злаков и значительно снижает выход растений-регенерантов у многих хозяйственно-ценных культур [1]. Явление альбинизма, возникающее в культуре пыльников, исследовалось главным образом в плане поиска условий предобработки донорных растений и пыльников с целью снижения доли альбиносных регенерантов [2, 3]. Наиболее существенные нарушения, приводящие в культуре пыльников к формированию мутантного фенотипа должны касаться, прежде всего, процессов синтеза хлорофилла и изменения структуры пластид – основных органелл, связанных с явлением альбинизма, поскольку в их строении происходит синтез хлорофилла и связанный с фотосинтезом метаболизм [4].

Поэтому целью нашей работы было выполнить с использованием различных современных методов сравнительные комплексные исследования процессов, сопровождающих формирование зеленых и альбиносных растений-регенерантов в культуре пыльников пшеницы. Для достижения этой цели, в качестве экспериментальной модели были выбраны дигаплоидные линии пшеницы. Полностью гомозиготное состояние ядерных генов у таких растений позволяет сузить спектр изменчивости, обусловленный гетерозиготностью по генам, участвующим в контроле формирования морфогенетических процессов в культуре клеток и тканей и более четко выявить процессы, связанные с формированием альбиносных растений.

Материалы и методы.

Материалом для исследований служили двадцать три дигаплоидные линии мягкой пшеницы, полученные в лаборатории генетики морфогенеза ИГиЦ НАНБ методом культуры пыльников межсортовых гибридов первого поколения. Двенадцать из них – от скрещивания различных яровых сортов *T. aestivum*, две – от скрещивания ярового сорта Диамант и озимой линии Фло, семь – от скрещивания озимой линии Фло и сорта Диамант и две дигаплоидные линии с ядерным геномом сорта Мироновская 808 и цитоплазмой *T. Turgidum*.

Растения выращивали на экспериментальном поле БОС Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Предобработку пыльников, их культивирование и регенерацию растений проводили в соответствии с ранее описанными методиками [5]. Оценивали следующие параметры: частота индукции эмбриогенеза (от числа посаженных пыльников); частота регенерации зеленых растений, частота регенерации альбиносных растений (от числа эмбриоидов); доля альбиносных растений.

Для электронно-микроскопических исследований отрезки листьев фиксировали в 6,5% глутаральдегиде с последующей дофиксацией в 2,0% осмиевой кислоте. Обезвоживали по общепринятой методике и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме *LKB* и контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу. Срезы исследовали на электронном микроскопе *JEM 100CX*.

Результаты и обсуждение.

На первом этапе работы нами проводились эксперименты по индукции пыльцевого эмбриогенеза и регенерации растений в культуре пыльников двадцати трех дигаплоидных линий пшеницы. Выполненные исследования выявили широкую изменчивость дигаплоидных линий по признакам, характеризующим способность растений к индукции пыльцевого эмбриогенеза. Так, например, частота индукции эмбриогенеза варьировала от 0 до 79,21%. Для проведения цитологических исследований были отобраны четыре линии, полученные методом культуры пыльников межсортовых гибридов первого поколения от скрещивания различных яровых сортов *T. aestivum*. Данные линии отличались наиболее высокими совокупными показателями, характеризующими способность к эмбриогенезу и регенерации в культуре пыльников, и являлись контрастными между собой по данным признакам (табл. 1).

Таблица 1

Параметры, характеризующие процессы эмбриогенеза и регенерации в культуре пыльников дигаплоидных линий пшеницы, %

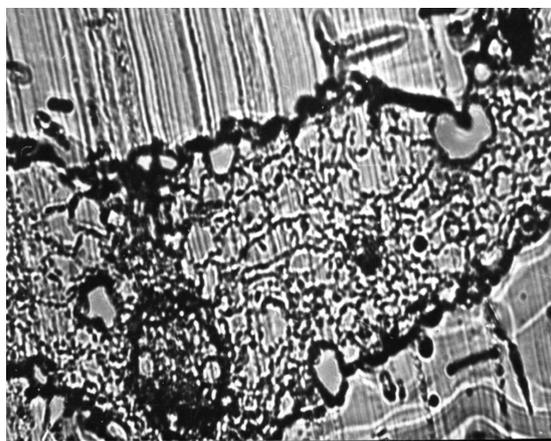
Дигаплоидная линия	Частота индукции эмбриогенеза	Частота регенерации зеленых растений	Частота регенерации альбиносных растений	Доля альбиносных растений
Dh 83 (<i>Ci</i> x <i>Di</i>)	79,21 ± 1,10 <i>a</i>	0,93 ± 0,29 <i>a</i>	1,11 ± 0,32 <i>a</i>	54,55 ± 10,62
Dh 64 (<i>Kt</i> x <i>Sk</i>)	15,90 ± 1,07 <i>b</i>	6,42 ± 1,79 <i>b</i>	9,09 ± 2,10 <i>b</i>	58,62 ± 9,15
Dh 60 (<i>Sk</i> x <i>Kr</i>)	20,77 ± 0,80 <i>c</i>	3,90 ± 0,83 <i>b</i>	4,46 ± 0,89 <i>c</i>	53,33 ± 7,44
Dh 38 (<i>Di</i> x <i>In</i>)	11,54 ± 0,72 <i>d</i>	3,10 ± 1,15 <i>b</i>	9,29 ± 1,93 <i>b</i>	75,0 ± 8,18

Примечание: Различия достоверны для генотипов обозначенных разными буквами (*a*, *b*, *c*, *d*) при $P < 0,01$. Сорта, использованные при создании различных линий: *Ci* – Циано, *Di* – Диамант, *Kt* – Кумт, *Sk* – Скала, *Kr* – Красноярская, *In* – Инеа.

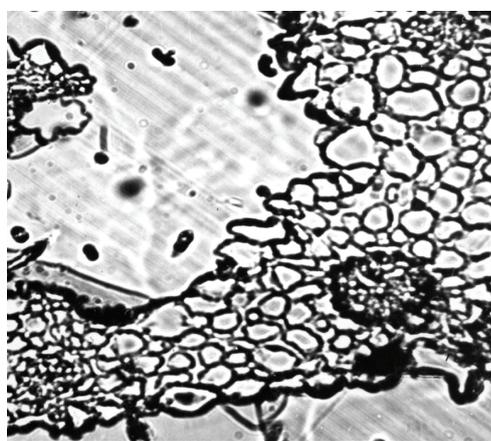
Из представленных данных видно, что все отобранные линии характеризовались повышенным выходом альбиносных растений по сравнению с зелеными. Вместе с тем, у линий *Dh* 60 (*Sk* x *Kr*) и *Dh* 83 (*Ci* x *Di*) соотношение зеленых и альбиносных растений-регенерантов приближалось к расщеплению 1:1. У *Dh* 64 (*Kt* x *Sk*) выход альбиносных растений несколько превышал выход зеленых и составил 59% от общего числа растений. Дигаплоидная линия *Dh* 38 (*Di* x *In*) отличалась от всех высоким выходом альбиносных растений (75,0%). Эти данные соответствуют тому, что частота альбинизма у злаков находится в зависимости от генотипа [6].

Одной из причин различий по частоте регенерации альбиносных растений у дигаплоидных линий могли быть изменения в геноме хлоропластов, возникшие в ходе создания этих линий. Поэтому нами предполагалось, что у них могли возникнуть генетические различия по цитоплазматическим генам, которые в последствии могли приводить к дифференциальной экспрессии генов, участвующих в детерминации регенерации зеленых и альбиносных растений-регенерантов.

Сравнительные исследования структуры листьев и ультраструктурной организации клеток зеленых и альбиносных растений-регенерантов показали, что листья зеленых растений, полученных в культуре пыльников, характеризовались нормальным развитием клеток листа и хлоропластов. Клетки имели типичное для мезофилла листа строение, в них содержались ядра, митохондрии, аппарат Гольджи, хлоропласты. Хлоропласты четырехнедельных хлорофильных растений имели развитую строму с плотными гранами и большим количеством межгранных тилакоидов (Рис1 а, б).



a



б

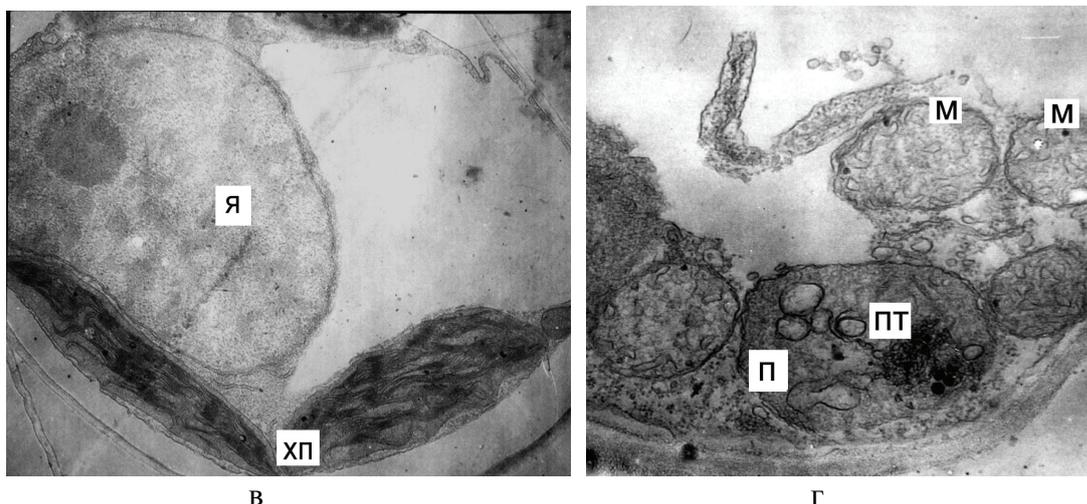


Рис. 1. Поперечный срез листа зеленых (а) и альбиносных (б) растений-регенерантов дигаплоидной линии Dh 83 (Сi x Di), первичное увеличение 120х. Ультраструктурная организация клеток листа зеленых (в) и альбиносных (г) растений-регенерантов дигаплоидной линии Dh 60 (Sk x Kr), возраст - 14 дней, первичное увеличение 14000х: Я – ядро, ХП – хлоропласт, П – пластида, ПТ – проламеллярное тело, М – митохондрии.

Вместе с тем, у альбиносных растений происходили заметные нарушения развития уже на уровне анатомической структуры листа. Они, в частности, выражались в том, что формировалось меньшее количество проводящих пучков, в состав которых входило существенно меньше клеток. Клетки мезофилла листа четырехнедельных альбиносов были значительно крупнее клеток зеленых растений, и в них не обнаруживалось содержимое (Рис 1 в, г).

Более существенные различия были выявлены при исследовании ультраструктурной организации клеток листьев альбиносных растений. В целом изменения в клетках растений-альбиносов напоминали процесс ускоренного старения клеток. Характерный признак этого явления – усиленное накопление пластоглобул в хлоропластах [7]. Кроме того, клетки проростков были сильно вакуолизированы, и вакуолизация усиливалась по мере роста листа; клетки содержали тонкий пристенный слой цитоплазмы. Происходило сокращение числа органелл, органеллы встречались группами. Наряду с этими изменениями было отмечено сохранение митохондрий с развитой системой крист, что может свидетельствовать о дыхательной активности растений-альбиносов. В альбиносных растениях двух- и трехнедельных проростков пластиды были редкими, в основном содержали проламеллярные тела, одиночные тилакоиды, многочисленные пластоглобулы, собранные в группы. Тем не менее, в них обнаруживались рибосомы, в отличие от ранее полученных другими исследователями данных [8]. Это может свидетельствовать о сохранении целостности белок-синтезирующей системы пластид в клетках безхлорофильных растений. В четырехнедельных листьях альбиносов содержались одиночные пластиды с просветленной стромой и редкими группами мелких пластоглобул, происходила гибель клеток.

Анализ полученных нами результатов и их сравнение с имеющимися литературными данными позволяют предположить то, что блок в развитии пластид в хлоропласты в альбиносном растении может происходить уже при введении микроспор в культуру на стадии переключения изначально гаметофитной программы развития на спорофитную. Тогда у генотипов, характеризующихся высокой частотой регенерации, либо выходом только альбиносных растений, дифференцировка пластид по пути развития амилопласта в ходе формирования мужского гаметофита должна происходить

раньше, чем у генотипов, формирующих зеленые растения с высокой частотой. Различия в соотношении зеленых и альбиносных растений могут быть обусловлены также несинхронностью прохождения микроспорогенеза в пределах выборки растений.

Таким образом, ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает, на наш взгляд, о том, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная дегградация пластид и ускоренное старение клеток.

Литература

1. *Caredda S. and Clement C.* Androgenesis and albinism in Poaceae: influence of genotype and carbohydrates// *Anther and Pollen: from biology to biotechnology*.- Berlin, 1999. – P. 211–229.

2. *Kasha K. J., Hu T. C., Oro R., Simion E., Shim Y. S.* Production of haploids in cereals// *Journal of Experimental Botany*. 2001. Vol. 52. P. 1227–1238.

3. *Cistuñ L., Ramos A., Castillo A. M.* Influence of anther pretreatment and culture medium on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars// *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1999. – Vol. 55. – P. 159–166.

4. *Reinbothe S., Reinbothe C.* Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms// *Plant Physiol*. –1996. –Vol. 111.– P. 1–7.

5. *Мозгова Г. В.* Изменение хлоропластного генома и структурных белков фотосинтетического аппарата альбиносных растений, полученных методом культуры пыльников пшеницы // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларуси. –2004. – Т. 2. – С. 40–45.

6. *Larsen E. T., Tuveesson I. K. D., Andersen S. B.* Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley anther culture// *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – Vol. 82. – P. 417–420.

7. Атлас ультраструктуры растительных тканей. / Под ред. М. Ф. Даниловой и Г. М. Козубова. Петрозаводск, 1980. 456 с.

8. *Sunderland N., Huang B.* Barley anther culture: the switch of program and albinism// *Hereditas Suppl.* – 1985. –Vol. 3. – P. 27–40.

Резюме

Ультраструктурный анализ клеток альбиносных растений-регенерантов на разных стадиях развития указывает на то, что в их клетках развитие пластид блокируется на ранних этапах, в них не происходит формирование гранально-ламеллярной мембранной системы, а затем идет постепенная дегградация пластид и ускоренное старение клеток.

An ultrastucture analysis of albino regenerant plant cells at various developmental stages indicates that plastid development in their cells is blocked at early stages. Granal-lamellar membrane system is not formed and then gradual plastid degradation and rapid cell senescence proceed.

ЯРУЛЛИНА Л.Г., СУРИНА О.Б., МАКСИМОВ И.В.

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71; тел. (347)2356088; e-mail: phyto@anrb.ru*

ТЕХНОЛОГИЯ *IN VITRO* В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ПАТОГЕНАМ

Метод культуры *in vitro* открывает широкие возможности для изучения молекулярных и клеточных механизмов иммунитета растений, таких как первичные