

14. Колесников С.А., Болдырев М.И. Совершенствование защитных мероприятий в шиповниковом агроценозе от вредителей генеративных органов // Аграрная наука и практика: проблемы и перспективы: мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 270-летию со дня рождения великого русского агронома А.Т. Болотова (Россия, Калининград, 20–23 октября 2008) / под ред. Е.С. Роньжиной, С.А. Романенковой. – Калининград, 2009. – С. 123–144.
15. Колесников С.А., Болдырев М.И. Видовой состав фитофагов шиповника // Агро XXI. – М.: Агрорус, 2007. – № 7–9. – С. 13–15.
16. Колесников С.А. Роль хищных жужелиц в экологизированной системе защитных мероприятий на шиповнике // Реалии XXI века в свете учения Вернадского: тез. докл. 5-й Межрегион. науч.-практ. конф. – Тамбов: Изд-во Першина Р.В., 2007. – С. 138–141.
17. Barber H.S. Traps for cave-inhabiting insects // J. Elish. Mitchell. Science Soc. – 1931. – S. 259–266.
18. Renkonen O. Statistisch-okologische Untersuchungen uber die terrestrische Kaferwelt der finnischen Bruchmoore // Ann. Zool. Soc. Zool. – Bot. Fenn. Vanamo, 1938. – Bd. 6. – 231 s.
19. Renkonen O. Die Carabiden – und Staphyliniden – Bestande eines Seeufers in S-W Finnland // Ann. Ent. Fenn. – 1944. – Bd. 9. – № 1–2. – S. 10–33.
20. Freude H., Harde K.W. & Lohse G.A. Die Kafer Mitteleuropas. – 1976. – Bd. 2. Adepfaga I. – Krefeld: Cocks & Evers Verl. – 302 s.
21. A Checklist of the Ground-Beetles of Russia and Adjacent Lands (Insecta. Coleoptera. Carabidae) / O.L. Kryzhanovskij, I.A. Belousov, I.I. Kabak [et al.] // Pensoft Publishers. – Sofia-Moskov, 1995. – 271 p.



УДК 57.085.23

А.Н. Иванова, Т.И. Голованова, Н.В. Новоселова

#### РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА В МОРФОГЕНЕЗЕ ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*Larix sibirica*)

В ходе исследования выявлено, что на морфогенез генеративных органов лиственницы сибирской оказывают влияние факторы внешней среды: низкие положительные температуры стимулируют воздействие на скорость прохождения материнскими клетками процесса мейоза.

**Ключевые слова:** морфогенез, лиственница сибирская (*Larix sibirica*), низкие положительные температуры, микроспороциты, мейоз.

A.N. Ivanova, T.I. Golovanova, N.V. Novoselova

#### THE TEMPERATURE FACTOR ROLE IN THE MORPHOGENESIS OF THE SIBERIAN LARCH (*Larix sibirica*) GENERATIVE ORGANS

The study revealed that the morphogenesis of the Siberian larch generative organs is influenced by the environmental factors: low positive temperatures stimulate the impact on the rate of mother cell passage of the meiosis process.

**Key words:** morphogenesis, Siberian larch (*Larix sibirica*), low positive temperatures, microsporocytes, meiosis.

---

**Введение.** Со времени открытия андрогенеза *in vitro* у пасленовых английскими учеными S. Guha, S. Maheshwari прошло около 36 лет [15]. С этого момента началось триумфальное шествие этого уникального феномена по исследовательским программам, в результате выполнения которых обнаруживались возможности спорофитного пути развития в культуре изолированных пыльников у многих видов растений. Получение D. Clapham [11, 12] гаплоидных растений ячменя из культивируемых пыльников позволило исследователям выявить потенциальные возможности растительного организма и вместе с тем в более короткие сроки получать новые линии и сорта растений.

Способность молодых микроспор растений воспроизводить в условиях *in vitro* целостный организм открывает большие возможности экспериментального получения гаплоидных растений. Гаплоиды являются

уникальным и перспективным объектом для клеточной селекции и генетической инженерии растений. Этой проблеме посвящено множество экспериментальных работ и обзорных статей [5, 8, 13, 14].

К настоящему времени накоплен значительный фактический материал по различным аспектам изучения этого явления у представителей различных семейств покрытосеменных растений. Однако не разработана эффективная система массового получения гаплоидов при культивировании мужских генеративных органов, не решены проблемы индукции и регенерации. Остаются неясными механизмы, обуславливающие смену программы развития микроспор с нормального пути созревания на вегетативный путь развития, через эмбриоидо- и каллусогенез в гаплоидное растение. Крайне мало данных по изучению морфогенеза мужских генеративных органов голосеменных.

Ряд исследователей отмечают, что непосредственными причинами морфогенеза являются физиолого-биохимические процессы, происходящие в индивидуальном развитии организма в определенных условиях внешней среды [1–3, 5–9, 11, 16, 17].

Одним из важнейших абиотических факторов, определяющих этапность онтогенеза и влияющих на фенотипическое проявление конкретного генотипа растения, являются низкие положительные температуры. Имеются данные о влиянии температурного фактора на становление полярности растительного организма, данный фактор используют как стрессор индукции андроклинии у покрытосеменных растений [8, 14].

**Цель работы.** Рассмотреть действие низких положительных температур как важный фактор культивирования мужских генеративных органов, при котором происходит высокий выход эмбриоидов.

**Объекты и методы.** В качестве объектов исследования использовали 30–35-летние деревья лиственницы сибирской, произрастающие на территории экспериментальной базы Института леса «Погорельский бор».

У опытных деревьев *Larix sibirica* собирали мужские гаметофиты (микростробиллы) с сентября 2003 по май 2004 г. Экспериментальные деревья были разделены на две группы по фенотипическим и морфологическим данным. В первую группу вошли деревья, пораженные лиственничной почковой галлицей, которые отличались от здоровых замедленным ростом и изреженной кроной (рис. 1, а). У таких деревьев, как было показано И.Н. Третьяковой [10], идет нарушение мужской сексуализации, то есть превалируют женские шишки. Во вторую группу вошли деревья, не пораженные лиственничной почковой галлицей (рис. 1, б).

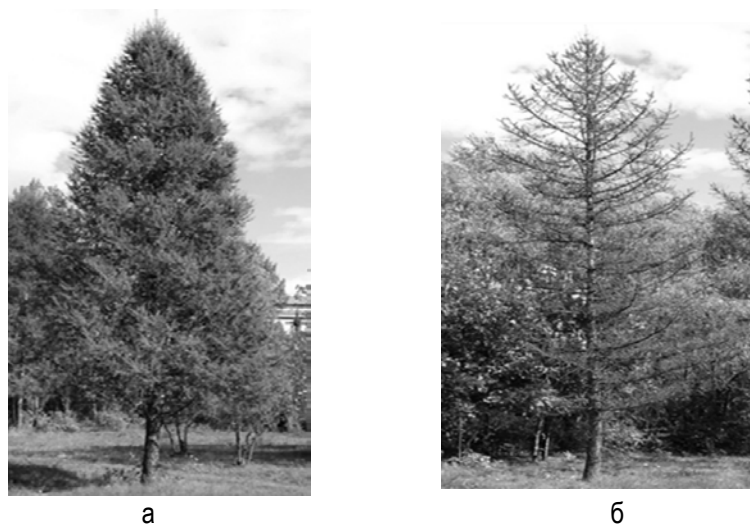


Рис. 1. Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.): а – не пораженная лиственничной почковой галлицей; б – пораженная лиственничной почковой галлицей

Собранные мужские генеративные органы помещали на модифицированную среду Мурасиге-Скуга [16].

В ходе работы снимали показатели: время прорастания микроспор, размеры пыльцевой трубки; время прохождения мейоза; морфологические особенности материнских клеток микроспор на каждой стадии развития.

Эксперимент проводился в двух вариантах:

1. Часть мужских генеративных органов, собранных с поврежденных и неповрежденных деревьев, помещали в холодильник на трое суток, где температура поддерживалась в пределах + 4 С°, после чего переносили на среду MS.

2. Другую часть мужских генеративных органов, собранных с поврежденных и неповрежденных деревьев, сразу же помещали на модифицированную среду MS.

Схема проведения эксперимента представлена на рисунке 2.

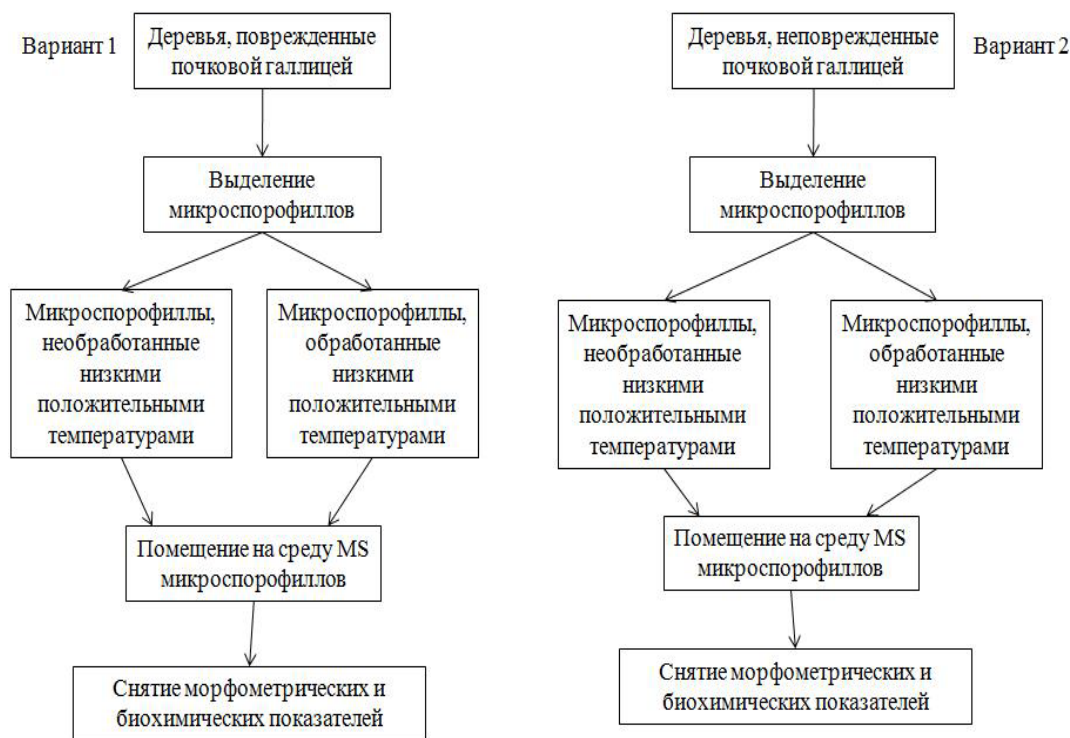


Рис. 2. Схема проведения эксперимента

**Результаты и обсуждение.** Данные по влиянию температурного фактора на развитие микроспороцитов *Larix sibirica in vitro* представлены в таблице 1. Необходимо отметить, что для анализа использовали материнские клетки микроспор, которые находились на различных стадиях развития: в осенне-зимний период – на стадии профазы I, в весенний период в микроспороцитах обнаруживалась сильная асинхронность прохождения мейоза (табл. 1), что характерно для хвойных.

Таблица 1

**Влияние низких положительных температур на развитие микроспороцитов *in vitro*, собранных в разные периоды развития микростробил *Larix sibirica***

Дерево	Месяц	Сутки	Метафаза I	Анафаза I	Телофаза I	Интерфаза	Тетрады	Микроспоры
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Микростробилы, не обработанные низкими положительными температурами +4 С°</b>								
нП	Октябрь	3	11,2	78,2	10,6			
		5		0,1	99,9			
		7			0,1	10,2	89,7	
	Декабрь	3	62,4	37,6				
		5	0,7	52,1	47,1	0,1		
		7				0,3	21,9	77,8
		14					0,1	99,9
Апрель	3						100	

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
П	Октябрь	3	35,6	64,4					
		5		0,7	52,1	47,1	0,1		
		7				0,3	21,9	77,8	
		14					0,1	99,9	
	Декабрь	3	78,2	11,2	10,6				
		5		0,1	75,3	24,6			
		7					10,3	89,7	
		14						100	
	Апрель	3						100	
	<b>Микростробилы, обработанные низкими положительными температурами +4 С°</b>								
нП	Октябрь	3		9,6	67,3	23,1			
		5				89,2	10,8		
		7					10,3	89,7	
	Декабрь	3		8,4	67,3	24,3			
		5					81,3	18,7	
		7					19,1	80,9	
	Апрель	3						100	
	П	Октябрь	3		9,1	67,7	23,2		
			5				99,9	0,1	
7							2,9	97,1	
Декабрь		3		7,2	92	0,8			
		5				0,2	87,7	12,1	
		7					14,7	85,3	
Апрель		3						100	

В культуре *in vitro* в октябре месяце у непораженных деревьев большое количество материнских клеток микроспор находилось в анафазе I, а на 7-е сутки культивирования появляются тетрады, на долю которых приходится около 90 %. В декабре, когда лиственница сибирская находилась в состоянии физиологического покоя, распределение микроспороцитов по фазам несколько иное. На 3-и сутки большее количество микроспороцитов находилось на стадии метафазы I, однако на 14-е сутки было обнаружено 100 %-е образование микроспор, покрытых тонкой экзиной. У растений, пораженных лиственничной почковой галлицей, было отмечено в осенне-зимний период неравномерное распределение микроспороцитов по отдельным фазам мейоза, и образование микроспор проходило медленнее (табл. 1).

В весенние сроки культивирования у не пораженных и пораженных деревьев лиственничной почковой галлицей у микроспороцитов происходило быстрое завершение мейоза.

Большой интерес представляют данные по обработке микростробил низкими положительными температурами. В литературе встречаются исследования, где низкие положительные температуры способствовали получению высокого выхода андрогенных культур у пшеницы [5]. В.Ю. Горбуновой впервые обнаружено: «... дифференциальная экспрессия транскриптов, накапливающихся в микроспорах в ответ на воздействие пониженных положительных температур на пыльники яровой мягкой пшеницы поздней стадии микроспорогенеза. Эта спорофитная генетическая информация реализуется в перестройке веретена деления первого митоза и появлении микроспор с двумя равными ядрами, что характеризует начало прямого андрогенеза *in vitro*» [4].

В наших исследованиях показано, что пониженные положительные температуры оказывали стимулирующее воздействие на прохождение клетками процесса мейоза, микростробилы которых были собраны в осенне-зимний и весенний периоды. Следует отметить, что у микростробил, собранных в данный период, уже на 3-е сутки культивирования микроспороциты находились в анафазе I в отличие от клеток, микростробилы которых не были обработаны низкими положительными температурами.

Несмотря на то, что на 7-е сутки образованы микроспоры как у непораженных, так и у пораженных деревьев, в их размерах были отмечены существенные различия (табл. 2).

Размеры микроспороцитов и микроспор

Дерево	Месяц	Сутки	<i>in vivo</i>	Метафаза I	Анафаза I	Телофаза I	Интерфаза	Тетрады	Микроспоры
<b>Микростробилы, не обработанные низкими положительными температурами +4 С°</b>									
нП	Октябрь	3	37,76 ±0,22	39,17±0,17	56,06 ±0,24	76,01±0,21			
		5			54,01±0,21	75,31± 0,18			
		7				76,13±0,19	84,21±0,31	91,52 ±0,21	
	Декабрь	3	37,92 ±0,20	38,19±0,17	54,6±0,33				
		5		38,92±0,24	56,40±0,59	75,68±0,18	85,53±0,16		
		7					85,43±0,19	92,01±0,26	101,3±0,15
	Апрель	3	51,27 ±0,16						91,59±0,21
		5						101,08±0,15	
		7						115,1±0,31	
П	Октябрь	3	34,48 ±0,17	37,76 ± 0,2	41,36±0,21	52,28±0,33			
		5			50,21±0,29	60,01±0,36	75,61±0,23	89,75±0,27	
		7					76,12±0,12	90,20±0,31	99,89±0,21
	Декабрь	3	35,76 ±0,19	38,4±0,19	39,63±0,25	60,3±0,59			
		5			54,7±0,27	73,47±0,18	76,09±0,18		
		7						90,56±0,26	91,60±0,38
	Апрель	3	49,92 ±0,12						89,79±0,23
		5						98,09±0,38	
		7						102,12±0,26	
<b>Микростробилы, обработанные низкими положительными температурами +4 С°</b>									
нП	Октябрь	3	37,76 ±0,22		69,82±0,23	85,46±0,36	90,06±0,28		
		5					91,87±0,21	95,3 ± 0,12	
		7						96,89±0,27	110,63±0,27
	Декабрь	3	37,92 ±0,20		65,78±0,34	78,26±0,18	89,61±0,18		
		5					95,41±0,21	109,56±0,31	
		7					19,1	120,31±0,15	
	Апрель	3	51,27 ±0,16						93,76±0,28
		5						101,31±0,21	
		7						124,3±0,15	
П	Октябрь	3	34,48 ±0,17		50,43±0,19	74,89±0,29	80,91±0,21		
		5				76,5±0,31	82,84±0,20	89,03±0,25	
		7						90,95±0,21	100,8±0,33
	Декабрь	3	35,76 ±0,19		60,11±0,33	77,23±0,59	80,59±0,25		
		5					80,65±0,21	85,36±0,23	100,15±0,24
		7						85,95±0,29	100,23±0,38
	Апрель	3	49,92 ±0,12						90,12±0,33
		5						99,89±0,59	
		7						106,39±0,38	

Размеры микроспороцитов, образованных от микростробил не обработанных низкими положительными температурами деревьев, не пораженных листовенной почковой галлицей, в метафазе I на 3-е сутки отличались от размеров микроспороцитов пораженных деревьев. Существенную разницу наблюдали у непораженных и пораженных деревьев на 5-е и 7-е сутки культивирования. Особенно значительные отличия проявились в анафазе I и телофазе I (табл. 2). Образованные микроспоры имели тонкую экзину и к 14-м суткам культивирования образовывали двухклеточное пыльцевое зерно, которое прорастало с образованием пыльцевой трубки.

Наиболее существенную разницу в размерах микроспороцитов наблюдали у деревьев, обработанных низкими положительными температурами: в осенне-зимний и весенний периоды на 3-е сутки культивирования их размеры составили: у деревьев, не пораженных листовенной почковой, – 69,82 мкм, а у пораженных – 60,11 мкм. Такая же закономерность наблюдается и на 5- и на 7-е сутки культивирования. У микроспор, полученных таким путем, наблюдаются тонкая экзина и деполяризация клетки.

Таким образом, низкие положительные температуры оказывают положительное влияние не только на прохождение мейоза, но и на размер образованных микроспор.

У микроспор, образованных в осенне-зимний период, наблюдается образование одноклеточного пыльцевого зерна, которое образует пыльцевую трубку на 14-е сутки культивирования (рис. 3, а), а в дальнейшем – ценоцит (рис. 3, б).

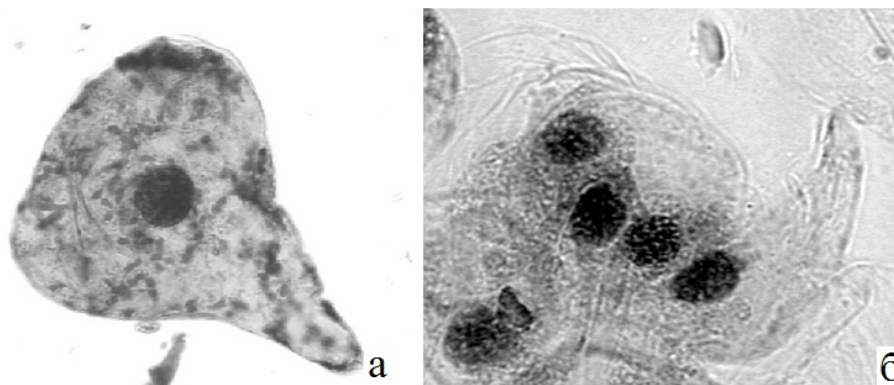


Рис. 3. Образование пыльцевой трубки на 14-е сутки культивирования и на 21-е сутки ценоцита

У микроспор, полученных в апреле месяце, на 14-е сутки от момента инокуляции микроспорофиллов на среду *in vitro* в образованных микроспорах отмечены равные митотические деления с образованием сначала двух равных ядер, а затем двух равных клеток (рис. 4).

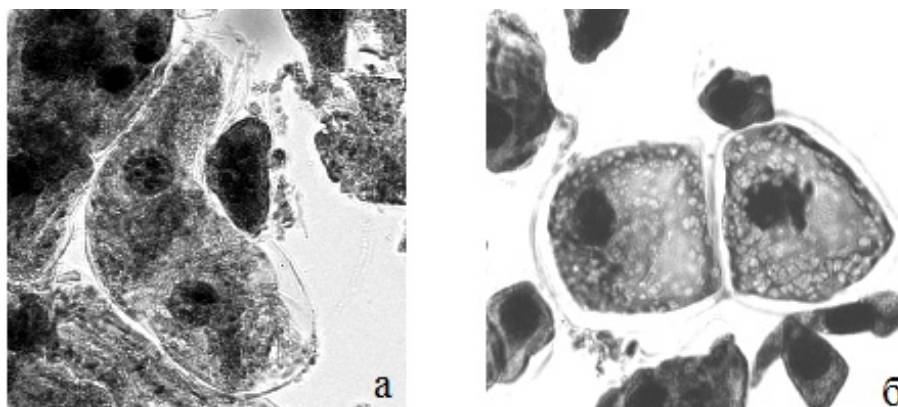


Рис. 4. Митотическое деление микроспоры *in vitro*

Следовательно, низкие положительные температуры оказывают положительное влияние не только на прохождение мейоза, но и на переход от гаметофитного пути на спорофитный. Это объясняется тем, что в результате действия температур подавляется процесс гаметофитной программы развития и запускается тем самым спорофитная программа.

### Литература

1. Белоусов Л.В. Биологический морфогенез. – М.: Изд-во Москов. ун-та, 1987. – 338 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. – М.: Наука, 1984. – С. 42–54.
4. Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у яровой мягкой пшеницы: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 2000. – 48 с.

5. Круглова Н.Н., Куксо П.А. Начальный этап индукции андроклинии // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – № 5. – С. 462–471.
6. Медведев С.С. Физиология растений. – СПб.: БХВ-Петербург, 2013. – 512 с.
7. Математическое моделирование морфогенеза растений / Г.Г. Лазарева, В.В. Миронова, Н.А. Омелянчук [и др.] // Сиб. журн. вычисл. матем. – 2008. – 11:2. – С. 151–166.
8. Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов // Журн. СФУ. Сер. Биология. – 2010. – № 3 (2). – С. 3–23.
9. Теоретические и математические аспекты морфогенеза / отв. ред. Л.В. Белоусов. – М.: Наука, 1987. – 295 с.
10. Особенности формирования генеративных органов листовенницы сибирской и их морфогенетический потенциал / И.Н. Третьякова, Ю.Н. Баранчиков, Л.В. Буглова [и др.] // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – № 5. – С. 472–480.
11. Balaji Enugutti, Charlotte Kirchhelle, Kay Schneitz. On the genetic control of planar growth during tissue morphogenesis in plants *Protoplasma*. – June 2013. – Vol. 250. – Issue 3. – P. 651–661.
12. Clapham D. In vitro development of callus from the pollen of *lolium* and *Hordeum* // Z. Pflanzenzüchtg. – 1971. – V. 65. – № 4. – P. 285–292.
13. Clapham D. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro // Z. Pflanzenzüchtg. – 1973. – V. 69, № 2. – P. 142–155.
14. Dale R. Walters and Linda Paterson, Parents lend a helping hand to their offspring in plant defence // *Biol Lett*. – 2012. – Jun 13.
15. Guha S., Maheshwari, S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* // *Nature*. 1964. – Vol. 204. – № 4957. – P. 497.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. – 1962. – 15 (3). – P. 473–497.
17. Lahiri Kotisree; Mukhopadhyay Madhumita J; Mukhopadhyay Sandip Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Mucuna pruriens*//*Journal of Tropical Medicinal Plants*. – 2012. – Vol. 13. – P. 43.

