

Симпозиум 6

**КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**IN VITRO REACTIVITY OF SUBENDEMIC PLANT SPECIES
ERIGERON NANUS SCHUR
- PRELIMINARY DATA -**

R. Blindu, I. Holobiuc
Institute of Biology, Bucharest
E-mail: *robibl2001@yahoo.com*

Erigeron (*Asteraceae* family) represents a genus of about 200 species. The genus has a cosmopolitan distribution with the highest species diversity in North America. Some species are used as:

- ornamental plants;
- food plants by the larvae of some *Lepidoptera* species (*Bucculatrix angustata*, *Coleophora squamosella* – exclusively feeds with *E. acris*);
- medicinal plants (*E. breviscapus*, *E. annuus*).

In Europe, *Erigeron nanus* Schur (*E. hungaricus* (Vierh.) Pawl.) is a rare plant species in Czech, Poland, Romania and vulnerable in Slovenia (IUCN1997). According to different authors, *Erigeron nanus* Schur is cited like a target plant species for Europe concern, vulnerable/rare, sub-endemic taxon and Carpathian endemic.

E. nanus is a perennial, hemicriptophyte, 2-5-(15) cm, having flowering period between VII-IX months, sporadic in alpine and subalpine zone, growing on the rocky substrate. There are few papers about taxonomy, morphology and conservation of this species.

The diminishing of the genetic resources of the plants strongly imposed the development of new conservation techniques. Advances in biotechnology, especially in the area of *in vitro* culture techniques provide some important tools for the conservation and the management of the plant genetic resources. *In vitro* techniques represent a viable *ex situ* conservation method; allow the increase of the multiplication rate and the obtaining of a healthy material.

The aim of this study is to establish an efficient micro propagation protocol for *ex situ* conservation.

The *in vitro* culture was started using mature seeds. The sterilization of the seeds was made with HgCl₂ 0.1 % (for 8 minutes). The seeds were inoculated on MS medium added with 10g/l sucrose (Murashige&Skoog, 1962). From the germinated seeds were obtained plantlets used as explants source. After 4 weeks, fragments of different plant organs (petiole, leaf, root, and uninodale segments) were cultured on different media variants.

For the evaluation of *in vitro* reactivity it was registered:

- The germination seed capacity (%),
- The rate of responsive explants (%),
- The number of regenerates/ inoculums.

It was used different treatments for the seed germination in sterile and non-sterile conditions. *In vitro* conditions, the rate of germination was increased (72.66 %) than in non-sterile condition (20 %).

All the tested explants had a good reactivity (100 %). Using MS basal salts added with different levels and balances of hormones were induced regenerative and non regenerative calli.

Our results showed that the regenerative pathway is indirect morphogenesis. The rate of regeneration is low (2-5 shoots/explant). The shoots were obtained on the media variant added with NAA 1mg/l and zeatin 1mg/l.

For an efficient *ex situ* conservation program it is necessary to improve the efficiency of the plant regeneration and to establish medium- and long- term preservation protocols.

To maintain the genetic stability of the shoots regenerated during *in vitro* culture, it is desirable that the regenerative way to be direct morphogenesis or direct embryogenesis.

POLYPHENOL OXIDASE ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH NOODLE QUALITY PARAMETERS IN CHINESE WINTER WHEAT CULTIVARS

Ge Xiuxiu¹, Yang Qijian¹, Yu Tongquan^{1,2}

¹ Biotechnology Institute

² New Technology Key Laboratory of Agricultural Application, Beijing Agricultural University, Beijing, China

E-mail: yangqijian@hotmail.com

The enzyme monophenol monooxygenase, most commonly known as polyphenol oxidase (PPO) (EC 1.14.18.1), but also as phenol oxidase, phenolase, catechol oxidase, catecholase, tyrosinase, etc., is widely distributed in plants. Its presence in wheat is well documented, and indeed, high PPO levels in wheat cultivars are thought to be responsible for darkening wheat-based end products such as chapattis, Middle Eastern flatbreads, steamed bread), and noodles. PPO is believed to be involved in the oxidation of phenolic acids (ferulic, sinapic, and vanillic, among others) to quinones; the quinones, in turn, react with the amines and thiol groups, or undergo selfpolymerization to produce dark or brown products.

Most of the PPO in wheat seed is located in the bran, especially the aleurone layer. The enzyme is formed very early in kernel development and decreases as the kernel matures. Wheat flour retains, on average, 3 % of the PPO activity in wheat grain.

Given that 12 PPO isozymes have been reported for wheat,

hexaploid wheat genotypes are likely to have more than one PPO gene. Udall (1997) identified a QTL marker for wheat PPO activity, as well as the restriction fragment length polymorphism (RFLP) marker Xcdo373, located on wheat chromosome 2, which accounted for over 40 % of the variation in PPO activity in all regression models, indicating the possible presence of a gene affecting PPO activity. It has been shown that genes located in homoeologous group 2 of the wheat chromosome play a major role in PPO activity. Flour PPO activity increases as the flour extraction rate increases. Wheat flours varying widely in quality parameters but having similar extraction rates show similar PPO levels as a percentage of total PPO. Flour protein content has been found to be negatively associated with flour PPO activity, presumably because of reactivity of phenolic side groups in the proteins. Baik et al. (1994) found that for a single cultivar, small kernels contained less PPO (on a weight basis and, especially, on a kernel basis) than large kernels. Differences among kernels of various sizes for a single cultivar were smaller than differences in PPO among kernels of comparable size among various cultivars. PPO activity was affected by both cultivar and growing location. Variation in wheat flour PPO activity among growing locations was greater than variation among genotypes. Large seed-to-seed variation was observed for PPO activity in spring wheat and triticale cultivars with L-tyrosine and catechol as substrates. Durum wheat cultivars generally show very low PPO activity, probably as a result of a potent PPO-inhibiting component in durum bran, whereas hexaploid wheat cultivars vary in the amount of PPO activity.

To determine whether discoloration could be improved by genetically reducing PPO levels, diverse winter wheat cultivars and advanced lines collected from Chinese winter wheat regions were used in this study. Grain PPO activity in 164 and 260 cultivars and advanced lines from the 2000-01 and 2001-02 cropping seasons, respectively, was evaluated, and 83 cultivars were used to determine the association between flour PPO activity and processing quality parameters and noodle color. Additionally, 16 hard and 13 soft wheat cultivars were used to investigate the effects of genotype, environment, and their interactions on grain and flour PPO activity. Significant differences in grain and flour PPO activity were observed in Chinese winter wheat populations. Grain PPO activity ranged from 1.93 to 12.00 $A_{475}/g/min \cdot 10^3$ in the 2000-01 season, and from 1.19 to 12.00 $A_{475}/g/min \cdot 10^3$ in the 2001-02 season, while flour PPO activity ranged from 0.22 to 3.74 $A_{475}/g/min \cdot 10^3$. Grain and flour PPO activities were influenced by genotype, location, and their interactions; however, variation in grain and flour PPO activities among locations proved lower than variation among genotypes, except for soft wheat flour PPO. Flour PPO activity was related to L^* of flour and ΔL^* values of

noodle sheets stored fresh for 24 h, with correlation coefficients (r) of -0.50 and 0.56 , respectively. Grain hardness, milling yield, and Farinograph water absorption were significantly correlated with flour PPO activity, with r values of 0.58 , 0.46 , and 0.42 , respectively. In conclusion, reducing PPO activity through genetic improvement could contribute significantly to enhancing noodle color of Chinese wheat cultivars.

* Supported by project of ministry of Scientific and Technological between Russia and China (№ CR10-B-28) and Beijing Science Flat-roof Foundation.

THE INFLUENCE OF SOME MICROSTRUCTURED CARBON MATERIALS ON *SEQUOIA SEMPERVIRENS* (D. DON.) ENDL. *IN VITRO* SYSTEMS

R. Stoiculescu, G. Cogalniceanu, A. Brezeanu
Institute of Biology of Romanian Academy, Bucharest
E-mail: ralluukka@yahoo.com

Sequoia sempervirens (D. Don) Endl. is a member of the genus *Sequoia*, in the cypress family *Cupressaceae*. It is an evergreen, long-lived, monoecious tree living for up to 2.000 years, and is the tallest tree in the world, reaching up to 112 m in height, and 7 m diameter at the base. It is one of California's most valuable timber species, which reproduces both sexually and asexually.

The present experimental research has been mainly focused to develop an efficient method for the stimulation of woody plants growth (*S. sempervirens*) by using microstructured carbon materials (CCM) as additives for optimization. They are known in the scientific literature as nano-composites (GICs). The field of materials is presently under an impressive development, being a top field in scientific research and can provide interesting physical systems with complex and intriguing properties.

Effects of microstructured carbon materials treatment on *S. sempervirens in vitro* culture were investigated starting from the hypothesis that CCM can induce effects on the plant culture, similar to those induced by active carbon such as: the absorption of some organic and inorganic components at nutritive medium level, absorption of impurities at agar level, absorption of catabolites having inhibitor effect on growth processes, pH effects, etc.

In the present study the source of inoculum was represented by 3 cm long shoots apex from *S. sempervirens* stock culture. There were tested four experimental models represented by: C- control (MS medium supplemented by 0.2 mg/l kinetin); A- (MS medium in addition of 0.2 mg/l kinetin and microstructured carbon material A 2 g/l); B-

(MS medium supplemented by 0.2 mg/l kinetin and 2 g/l microstructured carbon material B) and CA (MS medium supplemented by 0.2mg/l active carbon). The microstructured carbon material A represents expanded graphite obtained from intercalated compound with H_2SO_4 , with a surface area of 158 m²/g. The microstructured carbon material B- represents a mainly microporous expanded graphite from $FeCl_3$, with a surface of 10 m²/g.

For all the experimental models was used 8 g/l agar. The medium was distributed in Sigma tubes, each one containing 10 ml medium. The culture cultivation period was represented by 3 periods of time, 30 days each one, in controlled conditions of light and and temperature. At the end of each time growing period were measured parameters such as humid weight and seedlings length/experimental treatment.

After 90 days the experiments demonstrated, in base of biological parameters measurement, the stimulated growth effect of the A, B, CA medium models chosen, on *S. sempervirens* seedlings length, comparing to the control medium (C). After the treatment period, there were more significant positive effects, on *sequoia* seedlings growth stimulation, on CA medium than on A, B medium models. The result led to conclusion that the possible stimulator effect of microstructured carbon material A an B can achieve after periods longer than 90 days. In the same time, looking for the 2 parameters of interest, we can conclude that the effect of the microstructured carbon material A and B is not toxic, does not inhibit the morphological processes of plant growth. The use of new CCM compounds that would stimulate biological processes and thus optimize biotechnological protocols is an important step both in the study of materials science and in the field of plant biotechnologies.

DISTRIBUTION OF CHLOROPLAST – NUCLEAR COMPLEXES (PNCS) IN PLANT CELLS

T. Selga, M. Selga, V. Pavila
Faculty of Biology, Riga 1586atvia
E-mail: turs.selga@lu.lv

While the nucleus and chloroplasts in plant cells are known since the 19th century, plastid – nuclear complexes as one of the most typical structures in plant cells reminded un-described, evidently, it was too obvious to be recognised. The communication between the cytosol and organelles has been much studied in plant cells, while the nature of direct interaction of nuclei and chloroplasts are still a challenge to research.

Here we show by the use of several microscopy methods and

techniques that different compact plastid – nuclear complexes (PNCs) are permanent structures of cells in gymnosperms and the angiosperms. All cells types of epidermis in an onion bulb, tobacco, cucumber, pea, rye, may-lily leaves and needles of scotch pine and juniper, from expanding till yellowing contained the particular daisy-shape PNCs, in which are involved only some of the cell chloroplasts, while all the rest chloroplasts are scattered in the cortical cytoplasm.

Not all cells contain PNCs. Majority of cells contain PNC but the frequency of occurrence is unclear yet. Plastids are not visible as a part of complex if they are located on the top or bottom of nucleus. To elucidate frequency of occurrence further observations with 3D reconstruction of nuclei are required.

Laser scanning confocal microscopy proved the real regular existence of compact PNCs in the mesophyll tobacco leaves. Observing mesophyll cells and epidermis of yellowing leaves we observed that chloroplasts involved in PNC were bigger with brighter chlorophyll fluorescence. Free chloroplasts loosed chlorophyll fluorescence faster and became dark red or yellow-green.

The time-lapse study show, that the interaction of organelles in the PNCs takes place by their interrelated movement in diverse amplitude and frequency. Three populations of chloroplasts form the PNC. First group was fixed to the nuclear envelope and oscillates together with nucleus. Second group was attached to nucleus by short (approximately 0.5 μm long) joints and changed distance to nucleus during oscillation. Third group are far from the nucleus, at least few micrometers. These chloroplasts actively move towards or apart from the nucleus with velocity of 1 μm per second.

TEM studies showed accidentally developed PNC in young leaf palisade parenchyma cells, but in the large cells of full-grown leaves the PNC is evident on condition if the ultrathin section was cutted flatwise the nucleus which is located in the thin layer of cytosol between plasmalemma and tonoplast.

The nucleus frequently embraces a chloroplast in its inward bend, or by outward curve presses to a chloroplast, creating direct multi-membrane contact sites.

The ER – mediated junctions develop bit by bit between the touching chloroplast and nucleus, between a lot of small curves of the nuclear external membrane richly covered by ribosomes and contacting chloroplast.

Evidently, the PNCs provide beneficial exchange of substances between the chloroplasts and nucleus, thus inhibiting formation of gerontoplasts during the senescence of cells.

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ДВУХ
ВИДОВ ПОЛИСЦИАСА: *POLYSCIAS FRUTICOSA* (L.) HARMS
И *POLYSCIAS FILICIFOLIA* BAILEY

Obtaining and study of plant suspension cell culture of two *Polyscias*:
species *P. fruticosa* (L.) Harms and *P. filicifolia* Bailey (*Araliaceae*)

Е.С. Астафьева¹, А.В. Носов², Н.Д. Черняк², А.М. Носов¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

² Институт физиологии растений им. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: mushilda@mail.ru

Культура клеток высших растений представляет собой экспериментально созданную популяцию соматических клеток, и является одним из способов получения ценного растительного сырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности. Представители рода *Polyscias* издавна пользуются популярностью у жителей тропических стран как лекарства и добавки к пище. В настоящее время установлена антiterатогенная, антимуtagenная, антибактериальная, тонизирующая и кардиотропная активность экстракта *P. filicifolia*. Очень близкий к *P. filicifolia* вид, *P. fruticosa*, также обладает лекарственными свойствами, но изучен гораздо меньше, чем *P. filicifolia*. Получена культура клеток *P. filicifolia* и на ее основе создана пищевая добавка «Витаг-мал». Культура клеток *P. fruticosa* до сих пор получена не была.

Цель данной работы – получение культур клеток двух видов полисциаса: *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa*, изучение их ростовых и цитогенетических характеристик.

В качестве эксплантов использовали сформированные листья среднего яруса интактных растений.

Культуры получали на среде Мурасиге и Скуга с добавлением гидролизата казеина, инозита, агара, сахарозы (либо сахарозы с глюкозой) и различных комбинаций фитогормонов (кинетин, БАП, НУК, 2,4-Д, ИУК). Суспензионные культуры клеток получали двумя способами: из каллусных культур и непосредственно из листовых эксплантов.

При изучении ростовых параметров суспензионных культур определяли сухой и сырой вес биомассы, число клеток, агрегированность, жизнеспособность. Для выяснения биологической активности использовали метод определения антирадикальной активности с применением ДФНГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) и метод хемиллюминометрического определения общей антиокис-

лительной активности. Цитофотометрический анализ проводили на давленных препаратах, после окрашивания по Фельгену, с некоторыми изменениями классической методики.

В результате работы были получены хорошо растущие, с высокой жизнеспособностью суспензионные культуры клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*. Сопоставление двух способов их получения (из каллусов и непосредственно из эксплантов) показало существенные преимущества второго из них.

В присутствии в среде кинетина в культурах наблюдали соматический эмбриогенез, причем проэмбриогенные структуры были способны к пролиферации в течение длительного времени. НУК в различных соотношениях с цитокинином активно стимулировал ризогенез в каллусных и суспензионных культурах клеток. Полученные в культурах корни были способны к пролиферации и к обратной дедифференциации в суспензионную культуру. Микроскопический анализ показал, что корни *in vitro* не содержали секреторных каналов в отличие от корней и листьев интактных растений; их анатомическое строение соответствовало первичному строению корня. Показано, что из ризогенных каллусных культур легко получают растения-регенеранты.

Экстракты из биомассы полученных линий обладали антиоксидантной и антирадикальной активностью; было установлено снижение биологической активности биомассы клеток суспензионной культуры в процессе выращивания.

Анализ количества ДНК в полученных нами линиях обоих видов *Polyscias* показал, что основная доля клеток в культурах – диплоидные, отмечен небольшой процент тетраплоидных клеток. В растениях *in vitro* тетраплоидные клетки не были обнаружены. В культурах клеток обоих видов *Polyscias* имели место потери ДНК клетками. В коллекционных культурах клеток *P. filicifolia* процент тетраплоидных клеток был гораздо выше, чем во вновь полученных линиях. Коллекционные штаммы *P. filicifolia* до и после криосохранения существенно не отличались по количеству ДНК, последнее подтверждает, что криосохранение не оказывает влияния на содержание ДНК в клетках.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ДВУХ МЕТОДОВ ОЧИСТКИ ПЛАЗМАЛЕММЫ И ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ
ДЛЯ ОЦЕНКИ ОРИЕНТАЦИИ ВЕЗИКУЛ**

**The comparative analysis of two plasma membrane purification methods
and chemicals applied for vesicle orientation estimation**

А.Ю. Батов, О.В. Воронина, А.В. Архипенко, Д.Г. Приамурский,
Л.В. Плотникова, С.С. Медведев
Биологический НИИ Санкт-Петербургского государственного
университета, г. Санкт-Петербург, Старый Петергоф
E-mail: batov49@mail.ru

Ранее для очистки везикул плазмалеммы использовали градиент плотности сахарозы. При этом получались везикулы плазмалеммы и с нормальной ориентацией (как в клетке), и вывернутые. Ларсон с коллегами (Larsson et al., 1994) предложил метод очистки везикул плазмалеммы с помощью двухфазной системы (декстран/ПЭГ), дающий преимущественно нормально ориентированные везикулы. Однако детального сопоставления двух методов очистки плазмалеммы не проводилось.

Задачи исследования:

1. Сравнить пассивный транспорт ионов K^+ и Na^+ , а также генерацию мембранного потенциала на везикулах плазмалеммы, очищенных в градиенте плотности сахарозы и с помощью двухфазной системы (декстран/ПЭГ).
2. Оценить влияние антибиотика аламетицина и детергента *brij-58* на пассивный транспорт ионов K^+ и Na^+ и генерацию мембранного потенциала на везикулах плазмалеммы.
3. Оценить влияние способа очистки везикул плазмалеммы на активность H^+ -АТФазы.
4. Определить ориентацию везикул плазмалеммы с использованием аламетицина и детергента *brij-58*.

Объект исследования – везикулы плазмалеммы из клеток корней 4-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида F_1 Нарт 150.

Очистку везикул плазмалеммы проводили с помощью градиента плотности сахарозы (1.13/1.17) и в двухфазной системе (декстран/ПЭГ). Ориентацию везикул определяли по АТФ-гидролитической функции H^+ -АТФазы с использованием каналогенного препарата аламетицина и детергента *brij-58*. Загрузку везикул ионами калия осуществляли с помощью осмотического шока. Пассивный транспорт ионов и генерацию мембранного потенциала у везикул оценивали с помощью потенциал-чувствительного зонда diS-C₃-(5) ($\lambda_{\text{возб.}}$ – 570 и $\lambda_{\text{фл.}}$ – 668 нм).

Установлено, что везикулы плазмалеммы, очищенные с помощью двухфазной системы и в градиенте плотности сахарозы были замкнуты и обладали слабой пассивной проницаемостью для ионов K^+ и Na^+ . Пассивный транспорт ионов в данных условиях не зависел от ориентации мембран везикул.

Выявлены различия в действии аламетицина и *brij-58*. Обработанные аламетицином и *brij-58* везикулы также обладали слабой пассивной проницаемостью для ионов K^+ и Na^+ . Они не реагировали на повышение концентрации аламетицина и *brij-58*, соответственно, но давали ответ на введение в систему другого реагента. Отмечено, что *brij-58* взаимодействует как с мембранной фракцией, так и с зондом.

Оценка ориентации мембран везикул показала, что везикулы плазмалеммы, полученные очисткой в градиенте плотности сахарозы, содержали около 50 % инвертированных везикул. Очистка в двухфазной системе приводила к повышению количества нормально ориентированных везикул.

Оба препарата (аламетицин и *brij-58*), которые были использованы для оценки ориентации мембран везикул, давали сходные результаты. Однако при обработке *brij-58* количество неорганического фосфата, образующегося в ходе АТФазной реакции, было выше, чем в варианте с аламетицином.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-49619.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ АНДРОКЛИНИИ *IN VITRO* У ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ

Problems and perspectives of Siberian larch androgenesis *in vitro*

А.С. Белоруссова, И.Н. Третьякова
Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск
E-mail: culture@ksc.krasn.ru

Открытие в 1960-х гг. прошлого столетия такого уникального явления, как андрогенез (андроклиния) *in vitro* повлекло за собой активные исследования в данной области. Андроклиния представляет собой процесс перехода мужских спорогенных клеток растений (микроспор и пыльцевых зерен) с гаметофитного пути, в результате которого формируется мужской гаметофит, на спорофитный путь развития, в результате которого возможно получение гаплоидных растений-регенерантов в культуре *in vitro*. К сожалению, несмотря на длительную историю изучения данного феномена, основные успехи в области андроклинии были сделаны у покрытосеменных растений, тогда как голосеменные остаются не ох-

важными подобными исследованиями.

Лиственница сибирская, являясь основным лесообразователем хвойных лесов Восточной Сибири и имея немалое промышленное значение, представляет собой уникальный объект для изучения андроклинии у хвойных. Некоторые физиологические свойства, такие как листопадность, характер вегетационных процессов и др. сближает ее с представителями покрытосеменных растений.

Известно, что для перехода спорогенных клеток на спорофитный путь развития необходимо выполнение определенных условий, основными из которых являются стрессовое воздействие в начале культивирования и подбор необходимых условий культивирования, в чем и заключалась цель настоящих исследований.

Для индукции андроклинии у лиственницы сибирской использовались базальные среды K_{99} , 1/2 MS и MS с гормонами 2,4-Д (0.2-0.4 мг/л), ИУК (0.4-3.2 мг/л) и 6-БАП (0.2-1 мг/л), а также различными их сочетаниями. Для оценки влияния концентрации NH_4NO_3 применялась среда MS, модифицированная по содержанию этого компонента. Стрессовым фактором служила обработка микростробиллов низкими положительными температурами (3 °C) в течение 3-5 сут. перед введением в культуру.

Проведенные исследования выявили достоверное влияние состава питательных сред на индукцию андроклинических культур у лиственницы сибирской. Показатели интенсивности прироста каллусной массы и процента эксплантов, формирующих андроклинический каллус, были выше на средах K_{99} и 1/2 MS.

Кроме того, было обнаружено, что особое влияние на культивирование эксплантов оказывала концентрация ионов NH_4^+ (входящих в состав NH_4NO_3). Снижение концентрации NH_4^+ в два-три раза положительно влияло на развитие андроклинических культур лиственницы сибирской, в то время как на исходной среде MS экспланты погибали в течение одной-двух недель культивирования.

Гормональный состав питательных сред оказывал не менее важное воздействие на индукцию андроклинии у лиственницы сибирской. Так, при культивировании микростробиллов на среде, содержащей только ауксин (2,4-Д), происходило активное разрастание микропорифиллов, при этом формирование андроклинического каллуса отмечалось у 27 % эксплантов. Образование каллуса на среде, содержащей ИУК, не наблюдалось. При культивировании микростробиллов лиственницы сибирской на средах, содержащих и ауксины и цитокинины, развитие эксплантов происходило более интенсивно, и помимо разрастания микропорифиллов, происходило формирование каллуса у 60 % эксплантов.

Цитологический анализ подтвердил более успешное протека-

ние андроклинии на средах, содержащих сочетание ауксинов и цитокининов. Так, на среде, содержащей только ауксин, происходило формирование эмбриоидов непосредственно из микроспор, тогда как на средах обоих гормонов эмбриоиды появлялись не только непосредственно из морфогенной микроспоры, но и после формирования андроклинного каллуса. Строение зародышей микроспориального происхождения также различалось в зависимости от гормонов, входящих в состав питательных сред. Чрезвычайно интересно отметить, что в случае использования 2,4-Д происходило формирование зародышей, которые по морфологическим признакам были схожи с зародышами покрытосеменных растений. Этот факт создает целый спектр интереснейших проблем, решение которых возможно на цитологическом и генетическом уровнях. При использовании 2,4-Д в сочетании с 6-БАП происходило формирование зародышей, схожих с зиготическими и соматическими зародышами листовницы. Такие зародыши, по нашему мнению, более перспективны для получения растений-регенерантов листовницы сибирской.

Таким образом, в настоящих исследованиях впервые было показано влияние состава питательных сред на протекание андроклинии у листовницы сибирской. Индукция андроклинного каллуса и получение зародышей микроспориального происхождения создает большие перспективы для получения растений-регенерантов данного вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов: РФФИ № 06-04-08040-офи_а, ККФН № 16G-074, РФФИ-ККФН № 07-04-96810-р_енисей_а.

РОЛЬ ПРОТОНОВ И АФК В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА КОРНЕВОГО ВОЛОСКА *ARABIDOPSIS THALIANA*

Extracellular protons and ROS regulate tip growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs

Т.Н. Бибикова¹, Г. Мончаузен², С. Гилрой²

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: tbibik@yahoo.com

² Penn State University, Pennsylvania

Рост корневых волосков происходит только в апикальной части клетки. Клеточная стенка апекса волоска сохраняет способность к растяжению всего пять-десять минут. Задачей настоящего исследования было изучение факторов, влияющих на растяжимость клеточной стенки корневого волоска. С помощью электро-

физиологических и флюоресцентных методов было показано, что апикальный рост корневого волоска сопровождается периодическими изменениями внеклеточной концентрации протонов в области растущего кончика. Протонные токи сопровождались увеличением рН среды в области апекса корневого волоска. Искусственное уменьшение внеклеточного рН вызывало разрыв корневого волоска, тогда как увеличение внеклеточного рН ингибировало апикальный рост. Одновременно с осцилляторными изменениями в концентрации протонов, были обнаружены осцилляторные изменения во внеклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК) в субапикальной области корневого волоска. Уменьшение концентрации внеклеточных АФК под действием антиоксидантов приводило к разрыву корневого волоска, а увеличение концентрации внеклеточных АФК ингибировало апикальный рост. Эти наблюдения позволяют предположить, что увеличение концентрации внеклеточных АФК и уменьшение концентрации протонов снижают растяжимость клеточной стенки апекса корневого волоска. Осцилляции АФК не наблюдались вокруг волосков мутанта *rhd-2*, в котором не экспрессируется NADPH оксидаза ATRVON C. Корневые волоски этого мутанта разрываются в момент перехода от инициации к апикальному росту. Однако если мутант выращивается в среде с повышенном рН ($\text{pH} > 6$), у него развиваются нормальные корневые волоски. Полученные данные позволяют заключить, что осцилляторные изменения во внеклеточной концентрации протонов и АФК участвуют в регуляции роста корневого волоска, влияя на растяжимость клеточной стенки корневого волоска.

**ДИНАМИКА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА
В ПРОЦЕССЕ ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА
*NICOTIANA TABACUM L.***

**Membrane potential dynamics during pollen germination
in *Nicotiana tabacum L.***

М.А. Брейгина, Н.П. Матвеева, И.П. Ермаков

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

E-mail: plantphys@biophys.msu.ru

Прорастание пыльцевого зерна – важнейший процесс, обеспечивающий половое размножение цветковых растений. Формированию пыльцевой трубки предшествует комплексный процесс активации всех клеточных процессов, включая дыхание, везикуляр-

ный транспорт, трансмембранный транспорт ионов и метаболитов и биосинтетические процессы. Роль транспортных систем плазмалеммы и ионных потоков в активации пыльцевого зерна последнее время интенсивно изучается, однако данные по этому вопросу далеко не полны и местами противоречивы.

Наибольший интерес представляет вопрос о роли в прорастании пыльцевого зерна H^+ -АТФазы плазматической мембраны и анионных каналов – двух взаимосвязанных систем, которые занимают центральное место в ионной регуляции жизнедеятельности любой растительной клетки и контролируют величину потенциала на мембране. Ранее мы показали, что необходимым условием появления пыльцевых трубок являются активация протонной помпы и сдвиг внутриклеточного рН в щелочную область, а также активация систем анионного транспорта через плазматическую мембрану вегетативной клетки. Однако данные о динамике мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна, равно как и данные о влиянии на этот показатель трансмембранного анионного транспорта, в доступной литературе отсутствуют. Именно эти вопросы исследовали в настоящей работе с использованием количественной флуоресцентной микроскопии. Применение данного методического подхода позволило исследовать динамику мембранного потенциала, начиная с самых ранних стадий активации, которые оставались вне поля зрения исследователей из-за принципиальных ограничений традиционного подхода с использованием микроэлектродного метода.

Для определения величины мембранного потенциала использовали флуоресцентный краситель DiBAC₄(3) (бис-(1,3-дибутилбарбитуровой кислоты) триметин оксонол), который проникает в клетку в зависимости от величины мембранного потенциала. Измерение интенсивности флуоресценции проводили посредством компьютерного анализа микроизображений пыльцевого зерна и пыльцевой трубки. Используя метод Krasznai с соавторами (1995), рассчитывали абсолютные величины мембранного потенциала (мВ). В качестве полностью деполяризованного контроля использовали пыльцевые зерна или трубки, фиксированные параформальдегидом. В работе использовали моторизованный микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT (Zeiss), оснащенный цифровой камерой AxioCam HRC (Zeiss), с программным обеспечением AxioVision 4.2 (Zeiss).

Проведено комплексное исследование динамики мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна. Обнаружено, что в ходе его активации происходит гиперполяризация плазматической мембраны вегетативной клетки. Потенциал мембраны пыльцевой трубки характеризовался еще более высоким значением. В целом эти данные хорошо согласуются с результатами изме-

рений внутриклеточного рН в прорастающем пыльцевом зерне и трубке. Изменение обоих показателей в процессе прорастания можно рассматривать как прямое следствие активации протонной помпы.

С применением ингибиторного анализа показано, что подавление анионного транспорта вызывает блок прорастания и одновременно ингибирует процессы зацелачивания цитоплазмы и гиперполяризации плазматической мембраны вегетативной клетки. Вместе с тем аналогичное воздействие на пыльцевую трубку вызывало снижение скорости роста и деполяризацию мембраны.

Совокупность полученных данных выявляет взаимосвязь изменений мембранного потенциала, внутриклеточного рН и активности анионного транспорта в процессе прорастания пыльцевого зерна. В то же время результаты работы ставят вопрос о механизмах взаимодействия различных систем ионного транспорта, включая ионные транспортеры плазматической мембраны и мембран оргanelл, а также H^+ -АТФазу плазмалеммы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-49370-а).

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ ВИДОВ ШЕЛКОВИЦЫ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

The peculiarities of the *Morus* cultivation *in vitro*

А.А. Брилкина, О.Ю. Уткина, Н.Х. Потапенко

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород

E-mail: annbril@bio.unn.ru

Шелковица или тутовое дерево (род *Morus*) – одно из древнейших культурных растений. Растения этого рода успешно применяются в плодоводстве, ландшафтном дизайне. Особая их ценность состоит в том, что они являются единственной кормовой культурой в шелководстве. Для культивирования шелковицы в условиях средней полосы необходимо выявить или получить растения, переносящие многочисленные неблагоприятные факторы, такие как низкие температуры, загрязнение почвы и другие. Метод микрореклонального размножения может с успехом справиться с этой задачей, кроме того, он не заменим для ускоренного размножения древесных культур.

Целью работы являлся подбор условий стерилизации и компонентов питательной среды для введения растений шелковицы в культуру *in vitro*.

Объектом исследования послужили семена и растения шелко-

вицы белой, культивируемые в ботаническом саду ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Семена и участки стебля (1 см) с одной почкой промывали в проточной воде в течение 30 мин., затем подвергали стерилизации по следующей схеме: 70 % спирт – 5 мин., 10 % белизна – 5 мин., 3 % H_2O_2 или 0.8 % нитрат серебра – 5 мин., дистиллированная вода. Стерилизованный материал высаживался в пробирки со средой Мурассиге и Скуга (МС). В случае культивирования семян в среду добавлялись фитогормоны – БАП или кинетин в концентрации 1 мг/л, в случае почек – эти же фитогормоны в концентрации 2 мг/л и антиоксиданты – глутатион или аскорбиновую кислоту по 100 мг/л. Инкубацию растений осуществляли при освещении 3 клк с фотопериодом 16 часов, при температуре 24-27 °С.

Анализ полученных в ходе эксперимента с семенами результатов показал, что введение растений шелковицы в культуру *in vitro* с помощью семян следует проводить на среде без фитогормонов, а в качестве заключительного стерилизующего раствора лучше использовать нитрат серебра. В данном случае прорастание семян происходит уже через неделю (с пероксидом водорода – через две) и формирование хорошо развитой корневой системы.

При использовании в качестве эксплантов почек нитрат серебра также оказался более эффективным стерилизатором. Наибольшее количество почек, из которых появлялись листья, было отмечено на среде с аскорбиновой кислотой без фитогормонов или в присутствии кинетина. Несмотря на то, что почки после стерилизации активировались, при пересадки на свежую питательную среду они не росли и погибали.

Для оптимизации состава питательной среды для роста растений шелковицы в условиях *in vitro* растения, полученные из проросших стерильных семян, разрезали на черенки с одним или двумя листьями и высаживали на среду МС. В качестве источника углерода, помимо сахарозы, использовали глюкозу или фруктозу в концентрации 30 г/л и добавляли фитогормоны БАП или кинетин (2 мг/л). Во время эксперимента выявлено, что среда МС с добавлением сахарозы в сочетании с БАП или кинетином является не подходящей для роста шелковицы, так как в этих случаях происходит гибель эксплантов. Оптимальной для культивирования всех используемых видов шелковицы в культуре *in vitro* оказалась среда МС без фитогормонов, с глюкозой. На этой среде растения достигали максимальной длины, имели наиболее развитую корневую систему и более зеленую окраску листьев.

**КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ГЕРМПЛАЗМЫ ЧЕРНОЙ СМОРОДИНЫ
(*RIBES NIGRUM* L.) ПРИ СВЕРХНИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ****Cryopreservation of black currant's (*Ribes nigrum* L.)
germplasm at superlow temperatures****В.Г. Вержук, Н.Г. Тихонова, О.А. Тихонова**Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова, г. Санкт-Петербург
E-mail: verzhuk@yandex.ru, alexvirz@rambler.ru

Необходимость сохранения генофонда культурных и дикорастущих видов растений в настоящее время ставит перед человечеством задачу по уменьшению и ликвидации потерь генетических ресурсов растений путем создания генных банков, включая криосохранение при сверхнизких температурах.

Для вегетативно размножаемых плодовых растений сохранение и восстановление исходных генотипов вполне возможно путем их криоконсервации и помещения в среду жидкого азота. Однако еще не отработаны приемы и методы криосохранения по многим плодовым культурам, большинство работ в этом направлении носит противоречивый характер и весьма ограничен.

В нашей работе приведены результаты влияния длительного хранения в стрессовых режимах сверхнизких температур (–183... –186 °С) на вегетирующие части растений черной смородины (побеги, почки, пыльцу) с применением криопротекторов.

Криоконсервацию побегов и почек смородины проводили на сорте Бинар (черенки длиной 6-8 см, имеющие две-три почки и отделенные от черенка почки с тонким слоем коры и древесины). Во время исследований черенки подсушивали при –5 °С, доводили их влажность до 28-35 % и замораживали методом программного замораживания с начальной скоростью 0,5 °С/мин. до –30 °С, затем 1°/мин. до –90 °С, после чего помещали в жидкий азот на хранение. Почки также подсушивали и перед замораживанием обрабатывали криопротекторами, проникающими во внутрь клетки (ДМСО, этиленгликоль) и обволакивающими (полиэтиленгликоль, сахароза, трегалоза), которые действуют снаружи, осмотически вытягивая воду – PVS-4, PVS-3, Towill. Защитная роль криопротекторов состояла в том, чтобы на разрабатываемых нами этапах замораживания уменьшить повреждения клеток от осмотического и механического стресса. Почки в криопротекторах выдерживали один час при +20° С, замораживая их в пробирках методом витрификации в азотной шуге. Пыльцу для консервации в период цве-

тения собирали, подсушивали и методом прямого погружения в азот ставили на хранение. После хранения опытный материал размораживали в водяной бане при $+37^{\circ}\text{C}$. Затем почки после промывания от криопротекторов проращивали на питательной среде Мурасиге-Скуга (MS), а черенки – в стаканчиках с водой и ставили весь материал в световую комнату на проращивание при $+21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Жизнеспособность пыльцы определяли проращиванием ее в искусственной среде, содержащей 15 %-ный раствор сахарозы на 0.5 %-ном растворе агар-агара. Изучение оплодотворяющей способности пыльцы после хранения в жидком азоте проводили по традиционной методике селекционных скрещиваний. Контролем служила завязываемость ягод при опылении свежесобранной пыльцой.

Результаты исследований показали, что после длительного хранения в азоте (черенки и почки хранились 10 месяцев, пыльца – больше двух лет) были получены жизнеспособные черенки и почки, хотя процент гибели наблюдался еще большой. Прорастание листьев на черенках отмечено на 10-12 день после размораживания. В каждой из трех повторностей из 10 замороженных черенков, сохраняемых в азоте, после размораживания жизнеспособными оказались два-три черенка (20-30 %). Почки смородины, обработанные криопротекторами PVS-4, PVS-3 и Towill, начали прорасти через 10-11 дней и показали различную жизнеспособность. Из всего набора криопротекторов процент выживаемости почек по четырем повторностям оказался больше у почек обработанных криопротектором PVS-4 (40-45 %), затем с PVS-3 (30-40 %) и с Towill (30 %).

Анализ полученных данных показал, что при опылении пыльцой, хранившейся в жидком азоте, завязываемость ягод во всех вариантах скрещивания была высокой и составила 94.3-100.0 %. Наибольший процент образования плодов (100 %) наблюдался в комбинациях Triton \times Risager и Дочка \times Risager. При скрещивании сортов Дочка \times Лазурь, Triton \times Лазурь, Дочка \times Белоплодная завязываемость ягод также была высокой и составила 97.1, 94.3, 95.0 % соответственно. Сравнение полученных данных с контролем и исходными данными (проращивание пыльцы перед закладкой), показало, что оплодотворяющая способность пыльцы после хранения в жидком азоте не потеряла своих качеств, отличаясь лишь на 6.7 %. Это еще раз подтверждает результативность длительного хранения гермплазмы растений в среде жидкого азота, без снижения ее жизнеспособности.

**ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ – ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ РАСТЕНИЙ,
СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ ГОРМОНОВ ЛИНЬКИ НАСЕКОМЫХ
(МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ВЗГЛЯД К ПОНИМАНИЮ ФУНКЦИЙ)**

**Phytoecdysteroids – plant secondary metabolites structural analogous
to insect moulting hormones
(interdisciplinary outlook towards their functions)**

В.В. Володин

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар
E-mail: volodin@ib.komisc.ru

Фитоэктистероиды, представляющие собой полигидроксилированные стерины, структурно идентичные или близкие истинным гормонам линьки насекомых, обнаружены в растениях в 1960-х гг. XX в. К настоящему времени накоплен большой объем знаний о растениях-продуцентах этих соединений вторичного обмена, установлено структурное многообразие и выявлена связь между структурой и гормональной активностью эктистероидов у насекомых-фитофагов. Выявлены особенности биосинтеза и высказаны некоторые идеи относительно понимания механизма его регуляции. Вместе с тем из-за сложности изучения эволюционно сложившихся взаимоотношений между растениями и насекомыми-фитофагами до сих пор остается дискуссионным вопрос о роли эктистероидов в жизни растений. На наш взгляд, важными предпосылками для решения этой проблемы является проведение междисциплинарных исследований, которые позволили бы ответить на следующие важные вопросы: 1) какие виды растений содержат эктистероиды и есть ли между ними филогенетические связи; 2) каков интервал концентраций эктистероидов у растений разных видов и существует ли порог концентрации, ниже которого эктистероиды не проявляют активность гормона линьки; 3) существует ли связь между распределением эктистероидов в системе целого растения и антифидантной стратегией видов; 4) как меняется чувствительность личинок насекомых-фитофагов разных видов по отношению к различным концентрациям эктистероидов и модификации их структуры; 5) каковы особенности образования эктистероидов в культурах дедифференцированных клеток растений вне организменного контроля, и участвуют ли эти соединения в ростовых процессах у растений?

Для ответа на поставленные вопросы нами разработана методология междисциплинарных исследований, основанная на методах хемосистематики и разнообразных методических приемах использования физико-химических (хроматографических), иммуно-

логических (радиоиммунный и иммуноферментный) методах анализа растительного материала, биотестов на личинках различных видов насекомых-фитофагов и культурах клеток В П *Drosophila melanogaster*, использовании техники культуры ткани и клеток растений.

Изучение распределения экдистероидов среди растений проведено нами во флоре европейского Северо-Востока России. В отличие от работы с делектусами это позволило нам выявить не только филогенетические связи между видами-продуцентами, но и связи между распространением и систематической и географической структурами флоры, а также с комплексом действующих на данной территории экологических факторов. Исследования показали, что экдистероиды присущи большому числу видов покрытосеменных растений, причем содержание экдистероидов у растений разных видов варьирует в очень широком интервале концентраций: от предельно малых (менее 0.1 мкг/г) до необычно высоких (более 1000 мкг/г). На внутрисемейственном уровне виды с высоким содержанием экдистероидов закономерно встречаются в определенных трибах. Впервые показано, что следовые концентрации экдистероидов (обнаруживаемые только с помощью РИА) присущи большинству покрытосеменных растений. В докладе будет обсуждена различная роль экдистероидов, находящихся в следовых и гормонально-активных концентрациях, в жизни растений. На примере растений различных форм жизни в докладе показана детерминированность характера распределения экдистероидов в системе целого растения биоморфологическими особенностями видов, отражающими антифидантную стратегию растений. В экспериментах по скармливанию диеты, содержащей биомассу растений, экстракты или индивидуальные экдистероиды, личинкам трех видов полифагов показан вклад экдистероидов в детеррентные свойства растений – продуцентов экдистероидов, а также различная чувствительность личинок разных видов к концентрации экдистероидов и их тонкой структуре. Полученные данные укладываются в представления о коэволюции и адаптации насекомых-фитофагов и растений, эволюции биосинтеза экдистероидов в направлении отбора гормонально более активных структур. Эксперименты на культурах клеток растений видов, исходно различающихся по содержанию экдистероидов, показали, с одной стороны, их не одинаковую реакцию на уровень биосинтеза экдистероидов при введении в культуру клеток, а с другой стороны, возможность его физиолого-биохимической регуляции (экзогенные фитогормоны, индукторы цитохрома-Р-450, метилжасмонат). На основании полученных данных высказана гипотеза о двойственных функциях экдистероидов в растениях: экологическая (защита от насекомых-фитофагов в

умеренных и высоких концентрациях) и физиологическая (участие в ростовых процессах у растений в концентрациях менее 10 мкг/г, ниже порога их обнаружения рецепторами насекомых).

**«КЛЮЧ» ДЛЯ КРИОУСТОЙЧИВОСТИ
КАЛЛУСА САХАРНОГО ТРОСТНИКА (*SACCARUM OFFICINARUM* L.)**

«Key» for cryoresistance of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus

О.Н. Высоцкая, А.Ю. Степанова, Ю.И. Долгих, А.С. Попов

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

E-mail: cryoclone@ppras.ru

Сохранение ценного растительного материала в криобанке является эффективным биотехнологическим приемом, однако семена и образцы тканей и органов растений далеко не всегда способны выживать после криогенного воздействия. Для сохранения различного растительного материала в жидком азоте (-196°C) разработаны разнообразные методы, которые могут стабильно обеспечивать посткриогенное восстановление образцов. Однако даже с помощью наиболее совершенных и надежных способов невозможно обеспечить сохранение в криобанке неустойчивого растительного материала. Особенно часто подобные ситуации возникают при попытках сохранять в жидком азоте культивируемые *in vitro* клетки, ткани и органы растений. Иногда удается исправить данную ситуацию с помощью изменения условий культивирования, использования специфических регуляторов роста растений и закаливания образцов на питательных средах с повышенным содержанием сахаров и при пониженной температуре. Однако существуют такие растительные материалы, которые даже специальные приемы не могут сделать криоустойчивыми, поскольку геном тех растений, из которых они были получены, не воспринимает доступные нам в настоящее время приемы повышения криоустойчивости. В данной ситуации возникает необходимость исследования физиологических особенностей этих растений для выявления причин их неустойчивости к криогенному воздействию и определения способов устранения препятствий для криосохранения этих растений. Одним из наиболее действенных и современных способов можно считать отбор клонов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды (высокие концентрации NaCl, обезвоживание или же к отсутствию кислорода). Существуют данные о негативном влиянии недостатка кислорода на посткриогенное восстановление растительного материала, что может существенно снижать показатель криоустойчивости. Для изу-

чения вклада устойчивости к аноксии в криоустойчивость растительного материала использовали два клона каллуса сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.): устойчивый к аноксии и неустойчивый к аноксии, полученные в лаборатории генетики культивируемых клеток отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН. После специальных обработок (метод криосохранения с помощью дегидратации, разработанный в группе криосохранения растений отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН) оба этих каллуса были заморожены в криоампулах прямым погружением в жидкий азот (-196°C). После оттаивания образцы каллуса помещали на агаризованную питательную среду для восстановления и культивировали в темноте. После жидкого азота 80 % каллусов, устойчивых к аноксии, были восстановлены, а неустойчивые к аноксии каллусы восстановить не удалось. Из полученных данных следует, что устойчивый каллус сахарного тростника с большим успехом выживает после жесткого криогенного воздействия, а неустойчивый к аноксии каллус не способен переносить ни собственно криогенное замораживание, ни высушивание. Важно отметить, что именно с помощью направленной селекции был получен устойчивый к аноксии каллус, который обладает комплексной устойчивостью к высушиванию и криогенному замораживанию. Возможно подобные селекционные достижения позволят нам в будущем целенаправленно преобразовывать недостаточно криоустойчивый, но ценный растительный материал в криоустойчивые клоны, которые можно будет надежно сохранять в криобанках. Кардинальные различия в криоустойчивости каллусов сахарного тростника свидетельствуют о том, что именно устойчивость к аноксии является ключевым свойством, необходимым для выживания растительных тканей после криосохранения.

**СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ БИОТИЧЕСКОГО И АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА
КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ, ИНИЦИИРОВАННЫЕ
ИЗ КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА**

**Comparative effect of biotic and abiotic stress
on callus cultures initiated from contrasting varieties of flax**

Е.А. Гончарук, М.В. Молунова, Е.А. Калашникова
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: phenolic@ippras.ru

В условиях естественного роста растения подвергаются комплексному воздействию различных стрессовых факторов и на сегодняшний день к наиболее «значимым» из них можно отнести тяжелые металлы и ультрафиолетовое излучение. Известно, что

важными компонентами защиты клеток от стрессовых воздействий являются фенольные соединения. От уровня их накопления во многих случаях зависит способность растительных клеток и тканей «выживать» в стрессовых условиях.

В связи с этим целью нашей работы являлось сравнение действия УФ-Б радиации и кадмия на накопление фенольных соединений в каллусных культурах льна-долгунца, характеризующегося высокой чувствительностью к экологическим факторам.

Для инициации каллусов использовали стерильные проростки двух сортов льна с различной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды: сорт Ленок – высокоустойчивый, сорт Славный – низкоустойчивый. Каллусы выращивали в условиях 16-часового фотопериода на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2,4-Д (1 мг/л) и сахарозу (20 г/л). При изучении действия кадмия его добавляли к основной питательной среде в концентрации 15 мг/л, которая, как показали наши предварительные исследования, являлась «пороговой» для каллусных культур льна. При изучении действия УФ-Б радиации культуры в течение всего периода выращивания (30 дней) освещались ртутной лампой ПРК (2 часа ежедневно). Для определения суммарного содержания фенольных соединений (ФС) использовали этанольные экстракты, полученные из свежей каллусной массы.

Культуры льна-долгунца представляли собой каллусы желто-зеленого (за счет формирования в них хлорофилл-содержащих клеток) цвета с высокой способностью к ризогенезу.

В случае действия стрессовых факторов (УФ-Б лучи или кадмий) значительных изменений в морфологии каллусов не наблюдалось, хотя прирост биомассы во всех случаях снижался. У культуры, иницированной из сорта Ленок, содержание сухого вещества не менялось, тогда как у культуры, иницированной из сорта Славный – увеличивалось (при действии кадмия или УФ-Б радиации на 22 и 60 % соответственно).

Исследование содержания ФС показало, что как кадмий, так и УФ-Б радиация повышали биосинтетическую способность каллусных культур. При этом во всех случаях наибольшее накопление ФС происходило на 15-й день культивирования (середина пассажа); когда их уровень в два и три раза превышал таковой контроля соответственно для кадмия и УФ-Б лучей. К концу пассажа у культур сорта Славный содержание ФС снижалось до уровня контроля при воздействии кадмия, но оставалось по-прежнему высоким в облученных клетках. У культур сорта Ленок в конце пассажа содержание ФС оставалось на уровне контроля при действии кадмия, а при воздействии УФ-Б радиации даже снижалось (на 19 %).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о

том, что каллусные культуры, полученные из сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к стрессовым факторам, в условиях *in vitro* почти не отличаются реакцией на действие абиотического (кадмий) и биотического (УФ-Б лучи) стресса. При этом УФ-Б лучи в большей степени активируют синтез ФС, чем кадмий. Предполагается обсудить роль ФС в адаптации клеток растений к этим стрессовым воздействиям.

**ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ
ПРОЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ
В ТКАНЯХ ГИПОКОТИЛЕЙ ГРЕЧИХИ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* MOENCH.**

**Histological study of pecc formation in hypocotyl tissues
of buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench.**

Е.А. Гумерова, Н.И. Румянцева

Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, г. Казань

E-mail: gumerova@mail.knc.ru

Разработанный нами способ регенерации гречихи *in vitro* показал, что процесс образования соматических зародышей из гипокотилей проростков является непрямой и осуществляется через стадию развития проэмбриональных клеточных комплексов (ПЭКК).

При осуществлении процесса экспланты последовательно культивировали на средах с различным содержанием 2,4-Д (I – 8.0 мг/л, 8 сут.; II – 1.0 мг/л, 4 нед.). В процессе культивирования в тканях эксплантов развивались шарообразные структуры, состоящие из мелких, плотно прилегающих друг к другу клеток - проэмбриональные клеточные комплексы.

Гистологические исследования показали, что ПЭКК на эксплантах возникали из прокамбиальных клеток обкладки сосудистых пучков. Уже на четвертые сутки культивирования эксплантов на среде II наблюдали активацию делений в этой области, а на шестые – был ясно виден образующийся в тканях ПЭКК. Поверхность ПЭКК состояла из двух-трех рядов рыхло расположенных слущивающихся клеток; глубже находились тесно прилегающие друг к другу меристематические клетки с большими ядрами и плотно окрашиваемой цитоплазмой. Середина ПЭКК заполнена сильно вакуолизированными клетками. Такое строение характерно для ПЭКК других растений.

По мере развития ПЭКК происходило выпячивание его на поверхность экспланта, у его основания формировались ряды крупно вакуолизированных клеток.

Доказательством того, что образуемые эксплантами структуры

не являются зачатками корней, служит: 1) отсутствие сосудистых связей между тканями экспланта и ПЭКК; 2) то, что ПЭКК иногда наблюдали в питательной среде еще до момента их появления на эксплантах. Можно предположить, что развитие таких ПЭКК происходило из клеток, отделяющихся от эксплантов в процессе культивирования. Проследить происхождение этих клеток не удалось. Внешний вид и внутреннее строение ПЭКК, образовавшихся на экспланте, и ПЭКК, образовавшихся из клеток, находящихся в среде, были практически идентичны.

Таким образом, гипокотили гречихи можно отнести к тем эксплантам, у которых клеточные деления и последующий органогенез инициируются не в эпидермальных и субэпидермальных слоях клеток, а из клеток, находящихся в тесном контакте с камбием.

При дальнейшем культивировании эксплантов на среде регенерации (6-БАП – 2.23 мг/л; ИУК – 0.175 мг/л, 3 нед.) и безгормональной среде наблюдали разрастание тканей ПЭКК и развитие на их поверхности соматических зародышей. Гистологический анализ соматических зародышей показал наличие двух меристематических центров, апикального и корневого, соединенных сосудистыми пучками.

ВЛИЯНИЕ *TRICHODERMA HARCIANUM* НА ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ СМОЛЕВКИ

Influence of *Trichoderma harcianum* on the cell-wall polysaccharides composition in campion callus culture

Е.А. Гюнтер

Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

E-mail: gunter@physiol.komisc.ru

Исследован полисахаридный состав клеточных стенок каллусной культуры смолевки обыкновенной при совместном культивировании *in vitro* с фитопатогенным грибом *T. harcianum*. Инокуляцию каллуса проводили на восьмые сутки и сокультивировали с мицелием на протяжении четырех суток. Процентное содержание пектина в растительных клетках в совместной культуре увеличивается в 1.4 раза по сравнению с контролем (неинфицированные клетки), тогда как выход арабиногалактана не изменяется. При исследовании моносахаридного состава полисахаридов показано, что основными составляющими пектина являются галактуроновая кислота (56-60 %), галактоза и арабиноза, содержание которых не изменяется после инфицирования каллуса. Остатки

рамнозы, ксилозы, маннозы и глюкозы содержатся в небольшом количестве. При совместном культивировании с фитопатогеном в пектине из каллуса увеличивается содержание остатков глюкозы в 2.3 раза, которые, вероятно, являются компонентами сопутствующей каллозы, синтезируемой растительными клетками в качестве защитной реакции в ответ на атаку патогена. Остатки галактозы и арабинозы являются доминирующими моносахаридами в составе внутриклеточного арабиногалактана каллуса, тогда как остатки рамнозы, ксилозы, маннозы и глюкозы являются минорными. При совместном культивировании с фитопатогеном в моносахаридном составе арабиногалактана наблюдаются существенные изменения, в частности, снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в 2 и 1.3 раза, соответственно, а также увеличение в 5.7 раз количества остатков маннозы. В питательной среде обнаружен внеклеточный арабиногалактан, выделяемый каллусом. Моносахаридный состав этого полисахарида является близким в опытных и контрольных вариантах, за исключением увеличенного в 7.8 раз содержания остатков маннозы при сокультивировании каллуса и патогена. Таким образом, подобрана удобная модель совместной культуры каллуса с фитопатогеном для изучения модификаций клеточных стенок растений при взаимодействии с фитопатогенными грибами и создания средств защиты растений.

Работа поддержана грантами поддержки ведущих научных школ, Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

**ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ
В КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ОДНОЛЕТНЕГО КУЛЬТУРНОГО (*TRITICUM
AESTIVUM* L.) И МНОГОЛЕТНЕГО ДИКОРАСТУЩЕГО (*ELYMUS SIBIRICUS* L.)
ЗЛАКОВ**

**Fatty acid composition of membrane lipids in callus culture
tissues of annual cultivated (*Triticum aestivum* L.)
and perennial wild (*Elymus sibiricus* L.) crops**

Л.В. Дударева, В.Н. Шамаков, Е.Г. Рудиковская, Н.А. Соколова, А.В. Назарова
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск
E-mail: laser@sifibr/irk/ru

Работа проводилась в рамках изучения возможности вовлечения геномов дикорастущих злаков, обитающих в суровых климатических условиях, в конструирование новых форм пшеницы. Известно, что устойчивость растений к низким температурам зависит от структуры и химического состава мембранных липидов, в том числе от содержания и степени ненасыщенности жирных кислот.

Изучали жирнокислотный состав липидов каллусов пшеницы и холодоустойчивого дикорастущего злака – пырейника сибирского. Каллусы инициировали из зрелых зародышей пшеницы и пырейника на модифицированной среде Мурасигэ-Скуга с добавлением 2,4-Д (6 мг/л) и 2 % сахарозы. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Для идентификации использовали библиотеку масс-спектров NIST и времена удерживания стандартных соединений.

Установлено, что содержание главных жирных кислот в тканях недифференцированных каллусов пшеницы и пырейника имеет некоторые отличия, особенно заметные для линолевой (18:2n-6) и линоленовой (18:3n-3) кислот. Для пшеницы этот показатель составил 19.85 ± 1.50 % и 3.72 ± 0.50 %, а для пырейника – 27.60 ± 2.15 % и 4.53 ± 0.12 % соответственно. Однако в целом индекс ненасыщенности, характеризующий общее содержание полиеновых жирных кислот в ткани различался незначительно и составлял 1.28 для пырейника и 1.32 для пшеницы. Более заметные различия в содержании ненасыщенных жирных кислот наблюдали между недифференцированной и дифференцированной (имеющей зоны вторичной дифференцировки) тканями. Так, для дифференцированной ткани пырейника содержание линолевой и линоленовой кислот увеличилось, по сравнению с недифференцированной тканью до 38.6 ± 1.8 % и до 9.12 ± 0.8 % соответственно. Индекс ненасыщенности изменился с 1.28 до 1.57. Другими словами, относительно высокое содержание полиеновых жирных кислот в культуре ткани пырейника сибирского по сравнению с пшеницей проявлялось на стадии вторичной дифференцировки.

ЦИТО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕННОГО АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА ПШЕНИЦЫ

Cyto-physiological peculiarities of wheat morphogenic androclonic callus

Д.Ю. Зайцев

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, г. Уфа
E-mail: kruglova@anrb.ru

Андроклиния, или андрогенез *in vitro* – феномен образования в условиях культуры *in vitro* способного к репродукции гаплоидного растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника. Один из путей массового получения регенерантов – формирование в культуре *in vitro* морфогенных каллусов, клетки которых способны к дальнейшему морфогенезу *in vitro* и регенерации растений, в отличие от неморфогенных каллусов, клетки

которых не обладают такой способностью.

В литературе обсуждаются вопросы, касающиеся морфологии андроклинных каллусов, коррелирующей с их морфогенной и регенерационной способностью. Известны работы, посвященные сравнительному физиолого-биохимическому анализу различных типов андроклинных каллусов. В то же время исследований, касающихся сравнения гистологического статуса морфогенных и неморфогенных андроклинных каллусов, сравнительно немного. Выявлено, что в получении того или иного типа андроклинного каллуса определяющую роль играет гормональный состав индукционной питательной среды для культивирования пыльников (баланс между концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в составе индукционной среды Potato II и содержанием эндогенной ИУЖ в пыльниках в момент инокуляции).

В культуре пыльников *in vitro* линии Фотос, в зависимости от концентрации экзогенной 2,4-Д, формируется три типа каллусов.

I тип каллуса формируется на индукционной среде с низкой концентрацией 2,4-Д (1.0 мг/л). Такой каллус характеризуется белым матовым цветом, плотной компактной структурой и узловатой формой. При светооптическом анализе такого каллуса выявлено несколько зон, состоящих из массы однородных меристематических клеток, имеющих тонкие оболочки и центрально расположенные ядра. На среде для регенерации Blaydes в таких каллусах отмечались различные пути морфогенеза, поэтому такой тип каллуса был определен как морфогенный.

Культивирование *in vitro* пыльников на индукционной среде с концентрацией 2,4-Д в 2.0 мг/л вело к образованию каллуса II типа – желтого цвета, мягкой, рыхлой обводненной структуры, неопределенной формы. Согласно данным световой микроскопии, в таком каллусе выделялись две зоны клеток – небольшая центральная, представленная мелкими клетками округлой формы, как правило, без ядер, и обширная периферическая, состоящая из крупных паренхимных клеток неправильной формы, также без ядер. Гипертрофированные межклетники периферической зоны определяют рыхлость этого типа каллуса. Основная особенность II типа каллуса – отсутствие у составляющих его клеток признаков, характерных для меристематических клеток. При переносе на среду для регенерации клетки этого типа каллуса дегенерируют, поэтому такой каллус отнесен к неморфогенному.

Особый интерес вызывают каллусы III типа, полученные при использовании индукционной среды с концентрацией 2,4-Д в 1.5 мг/л. Такие каллусы имели морфологическое сходство и с каллусами I типа (белый цвет), и с каллусами II типа (мягкая, рыхлая обводненная структура, неопределенная форма). Гистологическим анализом в их составе выявлено три зоны клеток: I) состо-

яла из мелких клеток с относительно крупными ядрами, II) представлена округлыми клетками с мелкими ядрами; III) состоящая из клеток неправильной формы и различного размера без ядер, с хорошо развитыми межклетниками. Было предположено, что часть клеток, возможно, имеет морфогенетический потенциал для дальнейшего развития. При переносе такого каллуса в первые же сутки после появления на поверхности пыльников на свежую индукционную среду прежнего состава (второй пассаж) в нем отмечалось появление обширных зон клеток, по строению подобных меристематическим клеткам каллуса I типа. При переносе такого каллуса после второго пассажа на среду для регенерации в нем были выявлены различные пути морфогенеза. Поэтому III тип каллуса был определен как потенциально морфогенный.

Полученные данные могут представлять интерес для биотехнологов, так как в абсолютном большинстве проанализированных литературных источников отмечается появление двух контрастных типов каллусов – рыхлого обводненного и плотного узловатого, причем последний используется как морфогенетически перспективный, а первый отбраковывается. Наши данные заставляют пересмотреть уже сложившееся представление о неморфогенной природе рыхлых каллусов. Более того, рыхлый эмбриогенный каллус вызывает большой интерес исследователей, поскольку, с одной стороны, сохраняет регенерационную способность в течение длительного времени, а с другой – является ценным источником клеточных суспензий и протопластов, также обладающих регенерационной способностью.

Исследование поддержано грантами РФФИаофи-а № 05-04-08114, РФФИ-Агидель № 05-04-97911, грантом программы «Ведущие научные школы РФ» № НШ-4834.2006.4, ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала Республики Башкортостан».

СТРУКТУРА ЦИТОМАТРИКСА ПРОТОПЛАСТОВ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

The cytomatrix structure of plant – cell protoplasts

В.В. Ильчуков, М.К. Соколова, О.И. Соколов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов

E-mail: vvilchukov@ibppm.sgu.ru

Изучение структуры и функций цитоматрикса (цитоскелета) растительной клетки является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений клеточной биологии. Протопласты клеток растений используются для исследования многих физиологи-

ческих процессов, в том числе и роли цитоматрикса и составляющих его компонентов в функциональной активности и морфологии растительной клетки.

Целью представленной работы была визуализация структуры цитоматрикса и его актиновой составляющей в протопластах, полученных из клеток каллусной ткани моркови (*D. sativum* Hoff.), мезофилла листьев табака (*N. rustica* L) и черных русских бобов (*Vicia faba* L.) методами иммунохимии, флуоресцентной и электронной (трансмиссионной и сканирующей) микроскопии.

Ранее нами было показано, что субкортикальный цитоматрикс протопластов клеток каллусной ткани моркови представляет собой развитую систему. Его толщина достигает 1-2 мкм. Показано, что в его формировании принимает участие актиновый цитоскелет. Предполагается, что наличие развитого слоя субкортикального цитоскелета в протопластах клеток моркови определяется не только его участием в обеспечении функциональной активности плазмалеммы, но и в механическом поддержании формы клеток. Известно, что клетки каллусных тканей имеют менее развитую клеточную оболочку.

Протопласты клеток мезофилла листа табака обладают менее развитым слоем субкортикального цитоскелета. Как правило, внутриклеточная организация протопластов табака и бобов не имеет сложных структурных образований. Наблюдаемые нами образования округлой формы, по-видимому, являются репликами внутриклеточных органелл (хлоропластов), которые теряются при подготовке препаратов протопластов для сканирующей электронной микроскопии. На «тенях» протопластов с использованием методов трансмиссионной электронной микроскопии и маркера фаллоидин – коллоидное золото выявляется диффузная сеть филаментов актиновой природы. На некоторых препаратах протопластов клеток листа табака обнаруживаются участки с интенсивной посадкой маркера. Возможно они представляют собой субкортикальные участки организации мембранных пор, наличие которых показано нами на поверхности протопластов. В то же время результаты, полученные с применением флуоресцентных маркеров, показывают наличие в субкортикальной зоне развитой системы «тяжей» актиновой природы.

Визуализация структуры цитоматрикса хлоропластов в СЭМ показывает, что она представлена отдельными короткими тяжами, которые соединяют хлоропласты в единую систему. С помощью маркеров фаллоидин – коллоидное золото и родамин – фаллоидин показано наличие вокруг хлоропластов кольца и диффузно рассеянной сети, образованной филаментами F-актина. Локализация актин-содержащей сети вокруг хлоропластов подтверж-

даются и применением метода тройного иммуномечения на основе полученных нами фаговых миниантител к актину (комбинаторная фаговая библиотека овцы). В отличие от интактных клеток растений в протопластах нам не удалось обнаружить длинные тяжи актиновой природы.

В ходе подготовки протопластов для СЭМ, на некоторых препаратах нами обнаружено, что с крупными органеллами (по-видимому, ядрами) ассоциированы структуры в виде «ленты» (шириной до 3 мкм) или же в виде шнуровидных образований. Визуализация актинового цитоскелета протопластов с применением флуоресцентных маркеров также показывает присутствие развитой системы филаментов вокруг ядра – «ядерная корзинка». Используемыми методическими приемами нам не удалось обнаружить характерную для растительных клеток диффузную сеть актиновых филаментов вокруг ядра.

Таким образом, в ходе проведенной работы нами выявлено три относительно независимых друг от друга структуры актинового цитоматрикса протопластов клеток растений: субкортикальный, связанный с хлоропластами и ядром.

МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO*

Morphogenesis in isolated microspores of cereal crops *in vitro*

К.М. Искакова, Б.Б. Анапияев, З.П. Сапахова, Е.А. Жанбырбаев
Институт биологии и биотехнологии, г. Алматы
E-mail: bak_anapiyayev@mail.ru

Мягкая пшеница является основной стратегически важной культурой, которая обеспечивает продовольственную безопасность государства. Казахстан входит в десятку крупных производителей пшеницы, где основные пашни отведены под пшеницу. Несмотря на определенные успехи, основным препятствием возделывания яровой мягкой пшеницы являются неблагоприятные экологические условия окружающей среды. В настоящее время глобальное изменение экологических условий окружающей среды требует создания новых более адаптированных, устойчивых, высокоурожайных сельскохозяйственных культур. При использовании традиционных методов селекции для создания новых сортов важных сельскохозяйственных культур требуется в среднем 12-15 лет. Для сокращения этого срока более эффективным является использование биотехнологических методов. Использование гап-

лоидной биотехнологии для стабилизации расщепляющихся гибридов позволяет получать аналогичные результаты всего за один-два года. Более того, при использовании гаплоидной биотехнологии создаются уникальные возможности для проявления и закрепления рецессивных генов, которые могут нести очень полезные свойства. Поэтому впервые в Казахстане и Центральной Азии нами были начаты исследования по разработке гаплоидной биотехнологии важных зерновых культур риса (*Oriza sativa* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ячменя (*Hordeum vulgare* L.) и на основе культуры изолированных микроспор *in vitro*.

Рис является ценной зерновой культурой. В мировом земледелии он занимает второе место после пшеницы по посевным площадям, а также валовому сбору, и первое место по урожайности. Рис основной продукт питания для 3/5 всего населения планеты, а для 2/5 – продукт диетического питания. В Казахстане имеются большие возможности для развития рисосеяния: земельные площади и водные источники. На первом этапе были проведены исследования процессов морфогенеза и регенерации растений в культуре микроспор *in vitro*. В результате проведенных исследований была создана коллекция сортов, форм и гибридов риса. Изучены биометрические данные, хозяйственно-ценные признаки, урожайность и продуктивность указанных сортов и гибридов риса. Выделены генотипы риса, которые характеризуются продуктивностью и скороспелостью. Созданный коллекционный материал использовался в исследовании процессов морфогенеза и регенерации растений в культуре изолированных пыльников и микроспор риса *in vitro*. Донорные растения были выращены в условиях фитотрона и в полевых условиях Балхашского района Алматинской обл. (Акдалинский массив).

Исследованы генотипические особенности андрогенетического потенциала микроспор риса *in vitro*, возделываемых в Казахстане. На питательных средах N6, МС и Гамбург В₅ у исследованных сортов и коллекционных материалов частота процессов эмбриоидогенеза характеризовались как высокий, средний и низкий, тогда как у гибридов данный показатель составил высокий и средний степеней. Определены генотипы, способные формировать андроклинные эмбриоиды, оптимальные питательные среды и режим холодной предобработки. В результате проведенных исследований были получены андроклинные структуры, морфогенные каллусы и эмбриоиды. После пересадки эмбриоидов на среды для регенерации (МС, 05 мг/л ИУК) были получены растения-регенеранты риса *in vitro*.

Для культуры изолированных микроспор пшеницы были использованы отдаленные гибриды с участием *Triticum Kihara*, *Triticum spelta*, *triticum polonicum*, *Triticum turgidum*, *Triticum maca*,

Triticum monococcum, *Triticum timopheevi* и с *Triticum dicoccum*. Для быстрой генетической стабилизации расщепляющихся перспективных гибридов была использована усовершенствованная нами гаплоидная биотехнология на основе культуры изолированных микроспор пшеницы *in vitro*. Проведен скрининг гомозиготных линий пшеницы в инфекционном питомнике на устойчивость к ржавчинным болезням и отобраны наиболее устойчивые формы к бурой ржавчине.

В культуре изолированных микроспор ячменя *in vitro* были получены морфогенные каллусы, эмбриоиды и растения регенеранты. Андроклинные каллусы ячменя были использованы для изучения процессов морфогенеза и регенерации растений в процессе длительного культивирования *in vitro*.

Таким образом, в результате проведенных исследований были созданы модельные системы культивирования изолированных микроспор *in vitro* важных зерновых культур на примере пшеницы, риса и ячменя для использования в клеточной селекции, генетической инженерии и разработки гаплоидной биотехнологий ускорения селекционного процесса.

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)

Morphophysiological characteristics of sunflower callus tissue (*Helianthus annuus* L.)

Е.А. Калашникова, Н.Т. Хай

Российский государственный аграрный университет им. К.А. Тимирязева,
г. Москва

E-mail: kalash0407@mail.ru

Одной из сложных проблем биологии растений, до сих пор привлекающей пристальное внимание исследователей, является развитие целого растения из изолированной клетки. Последнее играет важную роль в морфогенезе, так как в его основе лежат такие процессы, как темп и ориентация клеточных делений, блокирование клеточного цикла, рост клеток и их дифференциация. Процессы морфогенеза индуцируются изменением в экспрессии генов и закреплением этих эпигенетических изменений клонированием перепрограммированной инициальной клетки.

Уже при своем возникновении ценность клеточных технологий связывали с возможностью регенерации целого растения, что обусловлено истинной тотипотентностью растительной клетки.

Регенерация побегов в культуре *in vitro* является необходимым и важным условием успешного проведения разнообразных клеточных и генноинженерных экспериментов. Поэтому большое внимание всегда уделяется изучению процесса индукции морфогенеза в клеточных культурах растений.

В условиях *in vitro* проблема регуляции дифференциации и морфогенеза носит определенный специфический характер, так как клетки в этих условиях лишаются тканевого и организменно-го контроля, который определяет их судьбу и дифференциацию в целом растении. Успех морфогенеза определяется генотипом исходного растения, эпигенетической характеристикой клеток экспланта и условиями выращивания, которые подчиняются контролю со стороны исследователя.

Объектом исследования служили семена подсолнечника трех генотипов (ВК 580, ВК 653, Кубанский 93), обладающие различной устойчивостью к склеротинии (*Sclerotinia sclerotiorum*). Семена любезно предоставлены сотрудниками ВНИИ масличных культур.

Работу проводили на сегментах гипокотилей и семядольных листьев, изолированных из пятидневных проростков подсолнечника, а также на зрелых зародышах. Все экспланты поверхностно стерилизовали 0.1 % раствором сулемы в течение 5-8 мин., после чего их промывали стерильной дистиллированной водой. Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей ауксины и цитокинины в различных концентрациях и соотношениях. В качестве цитокинина использовали кинетин в концентрации 0.5-3.0 мг/л, а в качестве ауксина – НУК 0.5-2.5 мг/л.

Исследование морфофизиологических характеристик каллусных культур различных генотипов подсолнечника показало, что они состоят из гетерогенных по форме и размерам клеток. Преимущественно это крупные клетки, овальной или сильно вытянутой формы, с большой вакуолью и маленьким ядром, как это характерно для большинства клеточных суспензионных, но не каллусных культур растений. В большей степени эти изменения проявлялись на каллусной культуре, полученной из различных первичных эксплантов и культивируемой на питательной среде, содержащей различные соотношения гормонов. Установлено, что увеличение как концентрации ауксинов (НУК 2.5 мг/л), так и концентрации цитокининов (кинетин 3.0 мг/л) в среде приводило к изменению морфофизиологических характеристик каллусных клеток. Как правило, ткань в этих вариантах состояла из сильно вакуолизированных и вытянутых по форме клеток, и эти характеристики не зависели от исследуемого генотипа и типа первичного

экспланта. Было сделано предположение, что такая вытянутая форма клеток связана с повышенным содержанием эндогенных гормонов, в частности, ауксинов в клетках первичного экспланта, а также в первичной и пересадочной каллусной ткани подсолнечника. Уменьшение концентрации гормонов в питательной среде, особенно ауксинов, приводило к формированию каллусной ткани, которая в основном состояла из клеток маленького размера округлой формы, способных в дальнейшем к морфогенезу.

Таким образом, в результате многоплановых экспериментов установлено, что оптимальной питательной средой для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани, способной в последствии к морфогенезу, является среда, содержащая НУК 1.0 мг/л и кинетин 2 мг/л.

**СРАВНЕНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ,
СОДЕРЖАНИЯ ВНУТРИКЛЕТочНОЙ H_2O_2
И АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
В КАЛЛУСАХ ДВУХ ВИДОВ ГРЕЧИХИ**

**Comparison of chromosomal variability, intracellular H_2O_2 content
and antioxidant enzymes activity in calli of two buckwheat species**

Г.В. Камалова, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева
Казанский институт биохимии и биофизики, г. Казань
E-mail: kam-guz@yandex.ru

С увеличением времени культивирования клетки *in vitro* могут терять способность к морфогенезу. Исследователи полагают, что механизм возникновения соматоклональной изменчивости, приводящей к быстрой утрате регенерационного потенциала культивируемых клеток, сходен со спонтанными мутациями и вызывается активными формами кислорода. Ранее нами было показано, что в отличие от каллусов гречихи татарской (*Fagopyrum tataricum*) («стабильные» культуры) морфогенные каллусы гречихи культурной (*F. esculentum*) («нестабильные» культуры) довольно быстро теряют регенерационную способность, которая коррелирует с изменением морфологических, цитогенетических и биохимических характеристик каллуса. Можно предположить, что культуры двух видов гречихи с различной способностью к морфогенезу могут иметь различный уровень антиоксидантной защиты и, соответственно, испытывать различное воздействие окислительного стресса, вызванного условиями культивирования. Цель нашей работы – изу-

чить хромосомную вариабельность, содержание внутриклеточной H_2O_2 и активности антиоксидантных ферментов – пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД) – в морфогенных (МК) и неморфогенных (НК) каллусах двух видов гречихи.

Проведенный цитогенетический анализ выявил, что морфогенные каллусы (МК) как *F. tataricum*, так и *F. esculentum*, представлены в основном диплоидными клетками с 16 хромосомами. Однако в МК *F. esculentum* диплоидных клеток было меньше, чем в МК *F. tataricum*, а уровень хромосомных aberrаций был значительно выше, чем в МК *F. tataricum*. НК обоих видов представляли собой миксоплоидные культуры и отличались значительным разбросом хромосомных чисел: от n до $8n$ и более. Более 90 % клеток НК составляли полиплоидные клетки. Уровень aberrаций в НК *F. esculentum* был выше, чем в НК *F. tataricum*.

Изучение содержания перекиси водорода в клетках каллусов показало, что ее количество в клетках неморфогенных каллусов больше, чем в клетках морфогенных каллусов. При этом уровень окислительного стресса, детектируемый по внутриклеточному содержанию H_2O_2 , был более высоким в МК *F. esculentum* по сравнению с МК *F. tataricum*. Выявлен факт значительного увеличения внутриклеточной H_2O_2 в новых клонах неморфогенных каллусов при сравнении их с родительскими линиями: в каллусах *F. tataricum* – в 7-30 раз, каллусах *F. esculentum* – в 1.5-14 раз.

Исследование активности растворимой пероксидазы и СОД в разных линиях МК и НК обоих видов гречихи показало, что общая активность пероксидазы в каллусах *F. tataricum* несколько выше, чем в каллусах *F. esculentum*, тогда как активность СОД была значительно выше в линиях *F. esculentum*. Важно отметить, что наибольшую активность пероксидазы наблюдали в неморфогенных культурах *F. tataricum*, тогда как наибольшую активность СОД в НК *F. esculentum*. Можно предположить, что высокое содержание внутриклеточной H_2O_2 в НК *F. tataricum* обусловлено оксидазной функцией пероксидазы, в то время как в НК *F. esculentum* – высокой активностью СОД.

Таким образом, установлено, что неморфогенные и «нестабильные» морфогенные культуры имеют более высокую цитогенетическую вариабельность и больший процент хромосомных нарушений по сравнению со «стабильными» морфогенными культурами, что коррелирует с более высоким содержанием внутриклеточной H_2O_2 .

Работа поддержана грантом НИОКР РТ № 03-3.6-29.

**ФАЗА РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ,
ОПТИМАЛЬНАЯ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ФОРМИРОВАНИЯ
МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА *IN VITRO***

**The phase of spring wheat embryo's development optimal
for induction of morphogenic callus forming *in vitro***

А.А. Катасонова

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, г. Уфа
E-mail: kruglova@anrb.ru

Пшеница традиционно считается трудным объектом для получения растений-регенерантов из культуры *in vitro* клеток, тканей и органов. В качестве экспланта для получения *in vitro* каллусной ткани с высокой регенерационной способностью у злаков перспективно использование незрелых зародышей. Для формирования морфогенных каллусов инокулируемые незрелые зародыши должны находиться в оптимальной фазе развития, которая характеризуется определенным цито-гистологическим статусом и содержанием эндогенных фитогормонов. В литературе указывается, в основном, либо длина зародыша, либо сутки после опыления, на которые незрелый зародыш извлекается из зерновки для инокуляции *in vitro*, при этом не указывается фаза развития зародыша. Как правило, четкое морфологическое и цито-гистологическое описание зародыша при инокуляции на питательную среду отсутствует. В связи с этим нами проведено цито-гистологическое изучение незрелых зародышей пшеницы с целью выявления фазы развития, оптимальной для получения морфогенного каллуса на питательной среде *in vitro*.

Объект исследования – растения яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Симбирка, перспективного для зоны Южного Урала. Незрелые зародыши извлекали из зерновок на 10-12-е, 15-17-е и 20-22-е сутки после опыления. Фенологическую фазу развития донорных растений определяли по периодизации Руденко (1962), этапы органогенеза – по периодизации Куперман (1977), фазы развития зародыша пшеницы – по периодизации эмбриогенеза злаков Батыгиной (1997). Цито-гистологическое изучение проводили по общепринятой методике (Паушева, 1988) с помощью световой микроскопии. Незрелые зародыши пшеницы, инокулированные на 10-12-е, 15-17-е и 20-22-е сутки после опыления, культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

В результате проведенных исследований показано, что донорные растения на 10-22-е сутки после опыления находятся в фенологической фазе молочной спелости семян, что соответствует XI

этапу органогенеза. На 10-12-е сутки длина незрелого зародыша составляет 0.6-0.7 мм. Согласно данным цито-гистологического анализа, зародыш имеет щиток и суспензор, а также хорошо развитый апекс побега и бороздку, разделяющую щиток и апекс побега. В целом, зародыш на 10-12-е сутки после опыления находится в начале фазы органогенеза. Культивирование *in vitro* такого зародыша ведет к формированию обводненного каллуса желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции, который постепенно дегенерирует на всех вариантах сред. На 15-17-е сутки после опыления длина зародыша составляет 0.9-1.0 мм. Зародыш имеет обособленный апекс побега, формирующийся колеоптиль в виде полого конуса со щелевидным отверстием в верхней части, в щитке такого зародыша происходит дифференциация прокамбия. Эндогенно в базальном полюсе зародыша обособляется зародышевый корень. Происходит заложение эпибласта, колеоризы и корневого чехлика. В целом, зародыш на 15-17-е сутки после опыления находится в завершении фазы органогенеза. Культивирование *in vitro* такого зародыша ведет к формированию каллуса плотной компактной консистенции, матового белого цвета, как правило, узловатой формы. В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что только в таком каллусе отмечается процесс органогенеза. На 20-22-е сутки после опыления длина зародыша составляет 2.5-2.7 мм. В зародыше хорошо представлены щиток, лигула, колеоптиль, эпибласт, колеориза, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и примордия первого листа. Такой зародыш со всеми сформированными органами, также находящийся в фазе органогенеза, относится к сформированным (Круглова, Сельдиминова, 2001). Культивирование *in vitro* такого зародыша ведет к формированию проростков пшеницы без каллусообразования. По-видимому, фаза развития незрелого сформированного зародыша пшеницы, приходящаяся на 20-22-е сутки после опыления, соответствует так называемой стадии автономности зародыша (Батыгина, 1987).

Таким образом, фаза развития незрелого зародыша, оптимальная для получения морфогенного каллуса, приходится на 15-17-е сутки после опыления, что соответствует фазе органогенеза (по периодизации Т.Б. Батыгиной). В этой фазе происходит обособление зачатков органов зародыша и их тканевая дифференциация. Все органы, в том числе и щиток, представлены активно развивающимися меристематическими клетками. Клетки эпидермиса щитка такого зародыша не покрыты плотной клеточной стенкой, что способствует тесному контакту с питательной средой и формированию *in vitro* морфогенного каллуса.

Исследование поддержано грантами РФФИ–офи-а № 05-04-08114, РФФИ–Агидель № 05-04-97911, грантом программы «Ведущие научные школы РФ» № НШ-4834.2006.4., ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала Республики Башкортостан».

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА
ПРИ ФОТОТАКСИСЕ У *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*****Identification of signal transduction elements in phototaxis
of *Chlamydomonas reinhardtii*****Д.И. Ковалева**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва
E-mail: KovalevaDI@mail.ru

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* обладает фототаксисом – способностью изменять направление движения клетки в зависимости от направления распространения света. На данный момент предполагаемая схема трансдукции сигнала при фототаксисе *C. reinhardtii* включает рецепторы – два идентифицированных родопсина CSRA и CSRB (*Chlamydomonas sensory rhodopsin A* и *B*) – фотовозбуждение которых вызывает два каскада быстрых электрических явлений в плазматической мембране клетки, что приводит к ее деполяризации. Изменение мембранного потенциала, вероятно, влияет на состояние кальциевых каналов или помп мембраны жгутиков, в результате чего повышается внутрижгутиковая концентрация кальция, что вызывает дифференциальный ответ двух жгутиков и поворот клетки. Молекулярные механизмы генерации фоторецепторных токов при возбуждении CSRA и CSRB остаются во многом неясными.

Для выяснения молекулярных механизмов генерации фоторецепторных токов при возбуждении родопсинов А и В необходимо идентифицировать элементы трансдукции сигнала от фоторецепторов. В результате сравнения свойств фоторецепторных токов при фототаксисе *C. reinhardtii* и в зрении у животных было выявлено сходство в изменении мембранного потенциала (деполяризация), кинетике (быстрое нарастание и быстрый спад), изменении рецепторного родопсина после фотоактивации (не происходит выщепление изомеризованного ретиналя) и времени регенерации (небольшой рефрактерный период) при фототаксисе у *C. reinhardtii* и в зрении у беспозвоночных животных, в отличие от позвоночных. Поэтому мы предположили, что цепи трансдукции сигнала фототаксиса и зрения беспозвоночных могут иметь общие элементы. Для выяснения природы этих элементов мы провели ингибиторный анализ фоторецепторных токов при фототаксисе *C. reinhardtii*. При этом использованы следующие ингибиторы: U-73122 (ингибитор фосфолипазы С), IBMX и папаверин (ингибиторы фосфодиэстеразы), рутений красный (ингибитор кальциевых TRP кана-

лов, генные модели которых были найдены нами в геноме *C. reinhardtii* в качестве каналов, вероятно, участвующих в фототаксисе), верапамил (ингибитор потенциал-зависимых кальциевых каналов внутренних мембран). Чтобы определить, какие из перечисленных компонентов участвуют в генерации фоторецепторных токов от двух родопсинов, необходимо разделить два фотоэлектрических каскада. Они различаются спектрально, по кинетике и световому насыщению. В результате анализа влияния ингибиторов на кинетику сигнала было показано, что ингибиторы потенциал-зависимых кальциевых каналов и фосфодиэстеразы подавляют только амплитуду сигнала, не влияя на его форму, что говорит о том, что кальциевые каналы внутренних мембран и фосфодиэстераза, вероятно, принимают участие в трансдукции сигнала фототаксиса после этапа деполяризации мембраны, общего для быстрого и медленного фоторецепторных токов от родопсинов CSRA и CSRB, соответственно. Ингибиторы фосфолипазы C и TRP-каналов не только уменьшают амплитуду сигнала, но и значительно увеличивают время пика, что говорит о преимущественном подавлении быстрого компонента сигнала. Следовательно, фосфолипаза C и TRP-каналы, вероятно, участвуют в цепи трансдукции сигнала, вызываемого фотовозбуждением родопсина A. Спектральное разделение действия ингибиторов на два фоторецепторных каскада на данном этапе оказалось неэффективным вследствие значительного перекрытия спектров поглощения CSRA и CSRB. При анализе влияния ингибиторов на форму световой кривой (зависимость амплитуды пика фоторецепторного тока от интенсивности светового стимула) было показано, что все перечисленные ингибиторы подавляют высокоинтенсивную фазу, обусловленную фотоэлектрическим каскадом от родопсина A, что согласуется с приведенными выше предположениями.

Таким образом, в результате ингибиторного анализа выявлено четыре элемента трансдукции сигнала при фототаксисе у *C. reinhardtii*, принимающих участие в передаче сигнала фототаксиса на разных этапах. Первая группа компонентов цепи трансдукции сигнала (потенциал-зависимые кальциевые каналы внутренних мембран и фосфодиэстераза) вовлечена в передачу сигнала от родопсинов A и B после этапа деполяризации мембраны, общего для двух сигнальных каскадов. Вторая группа компонентов (фосфолипаза C и TRP-каналы) участвует в трансдукции сигнала только от родопсина A.

КЛЕТОЧНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Cellular biotechnologies in selection of sugar beet

Ю.В. Коломиец

Национальный аграрный университет Украины, г. Киев

E-mail: julyja@zeos.net

Получение сортов сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенам – важная задача современной селекции. Широкий интерес у исследователей вызывают методы биотехнологии по получению растений-регенерантов из каллусных и суспензионных культур, которые прошли отбор в стрессовых условиях.

Цель нашей работы – разработать селективную систему для отбора клеток, устойчивых к *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Pseudomonas wieringae*, и получение из них устойчивых растений-регенерантов сахарной свеклы.

Объекты исследований – 12 генотипов сахарной свеклы. Для получения каллусных линий сахарной свеклы использовали модифицированную среду Мурасиге-Скуга (МС), дополненную 2.0 мг/л нафтилуксусной кислотой, 0.4 мг/л 6-бензиламинопурином и 2.5 мг/л аскорбиновой кислотой.

Для селекции использовали суспензию инактивированных (100 °С, 2.5 ч) клеток (ИК). Для получения устойчивых форм сахарной свеклы к *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* 8544 и *Pseudomonas wieringae* 7922 использовали три схемы селекции:

- 1) без обработки клеток сахарной свеклы мутагенами;
- 2) обработка γ -излучением 20 Гр;
- 3) обработка N-нитрозо-N-метилмочевинной 5 мМ.

Обработка γ -излучением и N-нитрозо-N-метилмочевинной индуцировала изменения в клетках, которые позволили стабильно расти этим клеткам на селективной среде с высокими концентрациями фитотоксических метаболитов. В этих вариантах на селективной среде было отмечено образование единичных колоний и стимулирование их роста уже через 2.5 недели культивирования, тогда как в вариантах без обработки эти процессы начинались только через четыре недели.

Культивирование каллусных клеток в селективных условиях на протяжении шести пассажей позволило отобрать устойчивые к ИК патогенов каллусные линии, которые были перенесены на питательные среды для регенерации. Только некоторые морфогенетические каллусы у исследованных генотипов были способны к регенерации растений. Среди полученных растений-регенерантов

10-20 % линий в зависимости от сорта и гибрида имели нормальное физиологическое развитие. Растения-регенеранты сахарной свеклы для укоренения высаживали на питательные среды МС, дополненные регуляторами роста – индолилмасляной кислотой, нафтилуксусной кислотой и селективным агентом.

Сублетальные концентрации ИК и N-НММ вызывают изменения уровня ploидности клеток каллусных линий, что привело к полиплоидизации тканей.

У растений-регенерантов, полученных после селекции на селективных средах, активность пероксидазы оказалась в 2-2.5 раза выше по сравнению с растениями контрольного варианта. При разделении изоферментов пероксидаз растений сахарной свеклы в 7.5 %-ном полиакриламидном геле выявлена их гетерогенность, которая проявлялась в появлении новых или исчезновении определенных изоформ пероксидазы.

Наибольшей устойчивостью характеризовались растения-регенеранты, полученные методом клеточной селекции на селективной среде с инактивированными клетками патогена и с использованием обработки N-нитрозо-N-метилмочевинной. У растений сахарной свеклы после селекции сахаристость и масса корнеплодов не снизились.

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

The morphogenic potential peculiarities of sunflower genotypes

А.Г. Комисаренко, С.И. Михальская, Л.Е. Сергеева

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Для достижения успешных результатов при разработке большинства современных сельскохозяйственных биотехнологических методов, в том числе генетических манипуляций, необходимо иметь стабильную систему регенерации.

Подсолнечник является ценной возделываемой культурой и привлекает внимание как источник продуктов питания, с одной стороны, и как перспективный продуцент биотоплива, с другой. Одновременно с этим подсолнечник считается одним из наиболее проблемных объектов генетической инженерии.

Несмотря на отдельные удачные попытки регенерации подсолнечника, элитные сорта и гибриды характеризуются низкой частотой, вариабельностью и воспроизводимостью этого события. Для решения данной проблемы работы ведутся, в основном, по трем направлениям: скрининг генотипов с высоким морфогенети-

ческим потенциалом, подбор перспективного эксплантата, оптимизация состава питательной среды и условий культивирования.

Нами был исследован морфогенетический потенциал трех генотипов подсолнечника: «Чумак», «Харьковский», «Заклык». Зрелые семена подсолнечника стерилизовали по отработанной ранее методике: высаживали на питательную среду Мурасиге-Скуге без фитогормонов и культивировали два-три дня при температуре 25-26 °С. После прорастания семядоли разделяли пополам и удаляли зародыш. В качестве первичных эксплантатов были использованы нижние части семядоли, которые повреждали, делая продольные надрезы. Эксплантаты высаживали на питательную среду с различным сочетанием и концентрацией компонентов.

Морфогенетический потенциал исследуемых генотипов подсолнечника оценивали по количеству полученных регенерантов и активности образования каллуса. Для всех испытуемых генотипов подсолнечника отмечен антагонизм между событием прямой регенерации и индукции каллусогенеза. Наиболее высокой регенерационной способностью обладал генотип «Харьковский», у которого прямая регенерация побегов составляла 86 %. При этом у данного генотипа отмечена низкая активность образования каллуса. Индукция побегообразования у генотипа «Заклык» составляла около 50 %, активность каллусогенеза была на том же уровне. Самую низкую регенерацию побегов давал генотип «Чумак», хотя он характеризовался наиболее высокой активностью образования каллусной массы.

Значительный процент регенерации был следствием образования множественных побегов. У генотипа Чумак на одном эксплантате образовывалось по два-три побега, а у генотипа Харьковский на отдельных эксплантатах – по пять и более. Многопобеговость наблюдалась одновременно или развивалась поочередно в течение пассажа (образование следующего регенеранта происходило после удаления предыдущего). Оба эти феномена актуальны, имея ввиду выращивание генотипов в условиях действия стрессового фактора (антибиотика), концентрация которого будет изменяться на протяжении периода культивирования.

Немаловажной характеристикой исследуемых генотипов является процент индукции ризогенеза, который составлял у генотипа «Чумак» 46.3, «Харьковский» – 18.6, «Заклык» – 23.5. Этот показатель не оказывал отрицательного воздействия на побегообразование.

Регенеранты всех генотипов после отчленения от первичного эксплантата укореняли на культуральной среде Мурасиге-Скуга без регуляторов роста. Из листьев регенерантов инициировали каллус, который можно было использовать в опытах по клеточной

селекции. У исследуемых генотипов уровень тотипотентности сохранялся вне зависимости от времени года. Отмеченные характеристики свидетельствуют в пользу перспективности их использования для генетической инженерии.

**ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В РАСТЕНИЯХ РОДА *RHODODENDRON* L.,
ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ**

**Biosynthesis of phenolic compounds in *Rhododendron* plants obtained
by clone micropropagation**

В.М. Костина, О.Г. Васильева¹, Н.В. Загоскина
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: phenolic@ippras.ru

¹ Главный ботанический сад им. Цицина РАН, г. Москва

Род *Rhododendron* L. – самый крупный в семействе Вересковых (*Ericaceae*). Он насчитывает более 1300 видов и около 1200 сортов, представленных вечнозелеными, полувечнозелеными и листопадными кустарниками и кустарничками. Среди его представителей множество видов относят к редким исчезающим и даже реликтовым растениям. Рододендроны успешно используются в качестве декоративных культур закрытого и открытого грунта, а также для озеленения крупных промышленных городов, в связи с их высокой газоустойчивостью. Кроме того, рододендроны являются источниками биологически активных веществ и широко используются в гомеопатии и традиционной народной медицине многих стран мира.

В настоящее время, помимо традиционных методов вегетативного размножения растений, все более успешно используется их клональное микроразмножение. Оно базируется не только на процессах морфогенеза и регенерации в условиях *in vitro*, но и на структурно-физиологической адаптации регенерантов в условиях *in vivo*. В этом случае большую роль играют фенольные соединения – низкомолекулярные представители вторичного метаболизма, образующиеся практически во всех клетках растений и защищающие их от стрессовых воздействий.

Несмотря на имеющиеся в литературе сведения об условиях и способах микроразмножения рододендронов, до сих пор изучение их способности к образованию фенольных соединений (ФС) не проводилось. В связи с этим целью нашего исследования являлось сравнение биосинтетической способности различных видов родо-

дендронов, полученных методом клонального микроразмножения.

В качестве опытного материала использовали растения, полученные в результате микроразмножения вечнозеленого *Rh. smirnowii* Trautv., полувечнозеленого *Rh. ledebourii* Pojark. и листопадного *Rh. japonicum* Suring. Культивирование микроклонов проводили на модифицированной среде Андерсона при 16-часовом фотопериоде. Побеги стерильных растений гомогенизировали и экстрагировали 96 %-ным этанолом. В этанольных экстрактах стандартными спектрофотометрическими методами определяли содержание ФС, флаванов (ФЛ) и проантоцианидинов (ПА).

Полученные данные свидетельствовали о значительном снижении биосинтетической способности к образованию ФС у растений, культивируемых *in vitro* по сравнению с интактными (пять-десять раз). Наименьшее содержание ФС отмечалось у вечнозеленого *Rh. smirnowii*, тогда как у других видов оно было в 1.5 раза выше. При этом микроклоны характеризовались практически одинаковой способностью к образованию ФЛ. В интактных растениях тенденция была иной: наибольшее накопление ФС и ФЛ отмечалось у *Rh. smirnowii*. Существенные различия между исследуемыми видами проявлялись лишь на уровне накопления ПА, являющихся димерными и олигомерными производными катехинов. Так, в микроклонах полувечнозеленого *Rh. ledebourii* их содержание было в 2.5 раза выше по сравнению с другими видами.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительных различиях в процессе вторичного метаболизма растительных клеток в условиях *in vivo* и *in vitro*.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ *IN VITRO* ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ С ЗАКРЕПЛЕННЫМ ГЕТЕРОЗИСНЫМ ЭФФЕКТОМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНЫХ ЦИТО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Biotechnology of obtaining *in vitro* wheat hybrids with fixed heterosis effect on the base of complex cyto-physiological investigations

Н.Н. Круглова

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, г. Уфа

E-mail: kruglova@anrb.ru

Биологический феномен андроклинии состоит в образовании способного к репродукции гаплоидного растения-регенеранта из морфогенетически компетентной клетки пыльника, в которой происходит переключение программы развития с обычного в природ-

ных условиях гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный (образование растения). Феномен лежит в основе метода культуры *in vitro* пыльников – единственного на сегодняшний день биотехнологического способа закрепления ценного гетерозисного эффекта гибридов первого поколения. Разработан лабораторный образец биотехнологии стабильного массового получения в культуре *in vitro* хозяйственно ценных и конкурентно способных гибридов пшеницы первого поколения с закрепленным гетерозисным эффектом. Особенность разработки заключается в использовании комплексных цито-физиологических данных.

Объектом исследования послужил гибрид первого поколения яровой мягкой пшеницы Жница × Московская 35, обладающий гетерозисным эффектом (по данным лаборатории селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН, г. Уфа). Экспериментально выявлено, что инициальными клетками андроклинии являются микроспоры в сильновакуолизированной фазе. Способность к переключению программы развития микроспоры с гаметофитного на спорофитный путь определяется главным образом особенностью структурной организации этой клетки: наличие хорошо развитой центральной вакуоли и крупного ядра, расположенного противоположно поре прорастания. Тем самым микроспора характеризуется хорошо выраженной полярностью (апикально-базальной организацией). По этому признаку микроспора структурно сходна со зрелой яйцеклеткой большинства цветковых растений, что свидетельствует о существовании принципиального сходства в организации инициальных клеток нового индивидуума при различных системах репродукции как в естественных условиях, так и в культуре *in vitro*. Кроме того, микроспоре свойственны активные процессы метаболизма, что подтверждается данными трансмиссионной электронной микроскопии. Эти обстоятельства характеризуют микроспору как чрезвычайно активную клетку. В результате экспериментальных исследований установлено, что индукции андроклинии способствует стрессовое воздействие холодом в эмпирически выявленном режиме (+4 °С, 7 сут.) на пыльники перед их инокуляцией *in vitro* на питательную среду I. Цитогистологически установлено, что холод провоцирует «отрыв» микроспор от стенки гнезда пыльника. Такой отрыв приводит к нарушению целостности пыльника как системы, а также морфогенетических корреляций между тканями стенки гнезда и микроспорами и, следовательно, к нарушению детерминации развития микроспоры по гаметофитному пути. Кроме того, отрыв приводит к изменению структурной организации микроспоры (нарушению ее

полярности) и к изменениям тканей стенки пыльника (их дегенерация). Таким образом, стрессовое воздействие холодом в определенном режиме является триггером спорофитного пути развития микроспор в культуре *in vitro*. После холодной предобработки пыльники инокулировали на питательную среду I (среда Potato II в собственной модификации). В условиях культуры *in vitro* развитие микроспор ведет к формированию растений через этап формирования эмбриоида/каллуса, при этом формирование эмбриоида биотехнологически оптимальнее. Установлено, что индукция формирования эмбриоида определяется балансом между концентрацией экзогенного синтетического ауксина 2,4-Д в среде Potato II и содержанием выявленного методом ИФА эндогенного ауксина ИУК в пыльнике в момент инокуляции. На основании детальных цитогистологических данных с применением световой и электронной (трансмиссионной и сканирующей) микроскопии, а также морфологических наблюдений установлены этапы развития микроспоры до сформированного эмбриоида. Выявлено, что развитие эмбриоида *in vitro* принципиально сходно с развитием зиготического зародышка в естественных условиях. Сформированные эмбриониды переносили на питательную среду II (среда Vlaydes в собственной модификации) для получения растений-регенерантов. Растения выращивали в пробирках до фенофазы кущения. Далее их извлекали из пробирок и с помощью цитогенетического контроля отбирали только гаплоидные особи. Затем обрабатывали смесью для дигаплоидизации и после цитогенетического контроля дигаплоидные растения переносили в почву, где они развивались до фенофазы полной спелости зерна. Лабораторная и полевая оценка показала высокую всхожесть полученных семян андроклиновых растений – гибридов второго поколения. Качество семян подтверждено данными эмбриологического анализа. Сохранение гетерозисного эффекта гибрида второго поколения подтверждено данными лаборатории селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН, г. Уфа.

Исследование поддержано грантами РФФИ–офи № 05-04-08114, РФФИ № 05-04-97911, грантом программы «Ведущие научные школы РФ» № НШ-4834.2006.4, грантом ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала Республики Башкортостан».

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА
РОСТ И ОБРАЗОВАНИЕ КАЛЛУСОВ КЛЮКВЫ
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

**The influence of medium hormone composition
on cranberries development and callus formation *in vitro***

В.П. Лобов, А.А. Брилкина, О.Н. Малышева, Н.А. Савелова
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород
E-mail: annbril@bio.unn.ru

Выбор культуры клюквы для клонального микроразмножения неслучаен. Известно, что ее фармакологическая ценность обусловлена высоким содержанием биологически активных веществ: витаминов, флавонов, катехинов, пектинов, макро- и микроэлементов, аминокислот. Одними из наиболее ценных вторичных метаболитов клюквы являются многочисленные фенольные соединения, такие как катехины, флавонолы, фенольные кислоты, благодаря которым сок клюквы обладает антибактериальными свойствами. Наиболее богатой по содержанию фенольных соединений считается клюква крупноплодная (*Oxycoccus macrocarpus*), успешно культивируемая на плантациях Северной Америки. Для промышленного производства клюквы необходимо массовое получение саженцев, которое возможно осуществить с помощью микроклонального размножения растений.

Цель работы – выявление влияния состава питательной среды на рост растений клюквы *in vitro*, образование каллусов и накопление фенольных соединений.

Объектом исследования были растения клюквы крупноплодной сортов Стивенс, Ховес, Ранний черный (РЧ), культивируемые *in vitro*. Экспланты высаживали в пробирки со средой Андерсона с различным содержанием гормонов: без фитогормонов; с кинетином – 2 мг/л; с БАП – 2 мг/мл; с ИУК – 0.5 мг/л; с НУК – 0.5 мг/л; с ИУК/кинетин – 0.5/2 мг/л; с ИУК/БАП – 0.5/2 мг/л; с НУК/кинетин – 0.5/2 мг/л; с НУК/БАП – 0.5/2 мг/л. Показатели динамики роста (длина стебля, количество стеблей, междоузлий и корней) снимались в течение двух месяцев каждую неделю. Инкубацию растений проводили под люминесцентными лампами при освещенности 3 клк с фотопериодом 16 час при температуре 22-26 °С. По окончании выращивания в растениях определяли количество пигментов спектрофотометрически и общее содержание растворимых фенолов в этанольной фракции колориметрическим методом с реактивом Фолина-Дениса.

При использовании различных сочетаний ауксинов (0.5 мг/л) и цитокининов (2 мг/л) нами выявлена зависимость индукции роста растений клюквы или каллусообразования от гормонального состава. На среде без фитогормонов, а также содержащей ИУК; кинетин; ИУК/кинетин ИУК/БАП отмечался рост растений. Максимальной длины экспланты достигали при отсутствии гормонов в среде, наиболее активно растущими оказались растения сорта Ранний черный, чуть хуже росли растения сорта Ховес, наименьший прирост давали растения сорта Стивенс. В присутствии НУК; НУК/кинетин; НУК/БАП образовались каллусы, на которых впоследствии появлялись многочисленные корни. На среде с БАП рост растений и каллусообразование не наблюдались. Каллусообразование сопровождалось резким, до десяти раз, снижением содержания пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) и побурением тканей. Количество фенольных соединений также оказалось несколько большим в растущих растениях, а не в образовавшихся каллусах, что совпадает с данными литературы о высоком содержании флавоноидов в молодых, энергично растущих тканях и органах клюквы. Наибольшее количество фенолов накапливалось у наиболее интенсивно растущих растений сорта Ранний черный, наименьшее – у растений сорта Стивенс.

Таким образом, растения *Oxycoccus macrocarpus* для роста в культуре *in vitro* не нуждаются в присутствии гормонов в питательной среде. Добавление нафтилуксусной кислоты в сочетании с кинетином и бензиламинопурином приводит к образованию каллусов и изменению содержания растворимых фенолов клюквы.

КУЛЬТУРА СТОЛОНОВ И РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ И КЛУБНЕОБРАЗОВАНИЯ У РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

Stolones culture and regulation of potato plant growth and tuber formation *in vitro*

Н.Н. Назарова, Г.О. Мирзохонова, З.Б. Давлятназарова, К.А. Алиев
Институт физиологии растений и генетики АН Республики Таджикистан,
г. Душанбе
E-mail: lab.gen@mail.ru

В настоящей работе приводятся результаты исследований по получению эксплантов столонов, этапов регенерации и пролиферации столонов, получения растений – регенерантов, микроразмножения, микроклубнеобразования и высадки пробирочных растений в почву. Объектом исследований служили сорт Жуковский ранний и его температуроустойчивая линия. Нами были исследо-

ваны культуры столонов картофеля с целью их использования в микроклональном размножении и их геномной изменчивости при культивировании *in vitro*.

Показано, что углеводы в сочетании с гормонами в определенных дозах играют ключевую роль в регуляции дифференциальной экспрессии генов в процессе регенерации столоновых клеток и на разных этапах культивирования степень геномной изменчивости различна и этот процесс ускоряется при использовании разных концентраций фитогормонов и сахарозы. Культивируемые *in vitro* температуроустойчивые растения-регенеранты существенно отличались от исходного сорта Жуковский ранний по некоторым характерным изменениям в регуляции клубнеобразования. Так, у температуроустойчивой линии инициация клубнеобразования происходит под влиянием высокой концентрации сахарозы и имеет продолжительный период роста клубня, тогда как у исходного сорта Жуковский ранний инициация клубнеобразования наблюдается при низких концентрациях сахарозы и более коротких промежутках времени.

Установлено, что индукция клубнеобразования и роста клубней столоновых регенерантов в системе *in vitro* является сопряженным процессом и регулируется дозой углеводов в культуральной среде выращивания пробирочных растений. Зависимость индукции и роста микроклубней от содержания углеводов имеют сортовую особенность.

Нами разработаны оригинальные системы регенерации столонов картофеля в условиях *in vitro* и обоснована роль углеводов и фитогормонов в направленном контроле морфогенетической потенции столоновых клеток и получении из них регенерантов с высокой продуктивностью и устойчивостью к экстремальным факторам внешней среды.

Столоновые растения, выращенные *in vitro*, в отличие от меристемных растений характеризуются ускоренным корнеобразованием и более быстрым накоплением биомассы.

Предполагается, что различия в морфофизиологических параметрах у столоновых и меристемных регенерантов связаны с экспрессией генов гексокиназного цикла метаболизма углеводов, особенно фермента инвертазы, которая осуществляет конверсию сахарозы в глюкозу и фруктозу. Задержка этого процесса, возможно, способствует накоплению в среде культивирования альдегида глюкозы и может оказать сильное влияние на процесс дифференцировки меристемных клеток, поскольку может проявиться ее мутагенный эффект, что повлечет за собой появление геномных и цитоплазматических изменений, который не наблюдается у столоновых регенерантов.

**ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ РАСТЕНИЙ РЕМОНТАНТНОЙ
МАЛИНЫ НА ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА
КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ МЕТОДОМ RT-PCR**

**Analysis of the raspberry bushy dwarf virus
by RT-PCR method in leaves of everbearing raspberry plants growing
in vitro and in field conditions at different development stages**

Е.В. Немцова, В.В. Заякин

Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского,
г. Брянск

E-mail: iyanam@online.debryansk.ru, elenanemz@mail.ru

Вирус кустистой карликовости малины (ВККМ) в настоящее время является наиболее распространенным и трудно контролируемым патогеном растений рода *Rubus*. Поражая чувствительные сорта малины, ВККМ приводит к возникновению хлорозов, некрозов, появлению деформированных и «рассыпчатых» плодов, снижению продуктивности растений. В естественных условиях этот вирус передается с пыльцой и при семенном размножении, что вызывает сложности контроля за его распространением в селекционных питомниках и производственных плантациях. При производстве оздоровленного посадочного материала и в селекции малины на устойчивость к вирусу актуальным является наличие чувствительного метода обнаружения ВККМ, позволяющего осуществлять скрининг его распространения в посадках.

Ранее нами была предложена методика анализа ВККМ на основе метода RT-PCR, которая позволяет выявлять данный вирус в растениях малины, независимо от проявления внешних признаков инфекции. Цель данной работы – определение вируса кустистой карликовости в полевых растениях малины на различных этапах вегетации, а также в растениях, размножаемых в условиях культуры ткани. Для этого анализ вируса проводили в почках и листьях однолетних побегов в течение всего полевого сезона, а также в листьях растений некоторых сортообразцов, выращиваемых в культуре *in vitro* на различных этапах микроклонального размножения.

Исследование проводили на сортах и генотипах ремонтантной малины селекции акад. РАСХН Казакова И.В. (Жокинский опорный пункт ВСТИСП). Для обнаружения ВККМ методом RT-PCR участок вирусной РНК-2, кодирующий ген белка оболочки, подвергли амплификации с использованием двух пар праймеров (синтез фрагментов длиной 706 bp и 363 bp). Для проведения обратной

транскрипции использовали ревертазу M-MLV, для проведения PCR – Taq-полимеразу.

Анализ полевых растений ремонтантной малины сортов Геракл, Надежная, Брянское диво, Брянская юбилейная, Золотые купола и генотипа 13-39-11 показал, что независимо от степени выраженности симптомов поражения вирусом, практически все изученные формы в различной степени являются инфицированными ВККМ. В полевых условиях на растениях данных сортов и генотипов часто выявляются признаки инфекции – «рассыпчатость» плода, хлорозы. При анализе растений генотипа 8-79-2 также идентифицированы фрагменты, имеющие вирусную природу, хотя в полевых условиях признаков поражения ВККМ и снижения продуктивности растений для него не обнаружено. Из литературных данных известно, что существуют сорта малины, резистентные к S-изолятам вируса, а также сорта, для которых характерно протекание бессимптомной вирусной инфекции, сопровождающейся угнетением растений и снижением продуктивности. Для формы 8-79-2, несмотря на наличие ВККМ, таких признаков не наблюдается, поэтому возможно, что данный генотип является толерантным к вирусной инфекции.

Изучение динамики содержания ВККМ проводили на растениях сорта Брянское диво в течение всего периода вегетации. Обнаружено, что амплификация вирусных фрагментов наиболее интенсивно протекала при использовании РНК, выделенной из листьев полевых растений в период с августа по октябрь. При использовании РНК покоящихся почек (зима) амплификация отсутствовала – в это время года обнаружение ВККМ методом RT-PCR затруднительно. При пробуждении почек концентрация вируса возрастает достаточно быстро и поэтому идентификация ВККМ возможна уже в выходящих из состояния покоя почках.

Определение вируса проводили также в растениях некоторых сортообразцов ремонтантной малины, выращиваемых в условиях культуры тканей. Нами были проанализированы пробирочные растения и растения, проходящие стадию акклиматизации в стерильном песке. Из пробирочных растений пяти изученных сортов и генотипов вирус был обнаружен в трех – Геракл, 3-72-2, 8-79-2. У данных форм ВККМ также был идентифицирован в растениях, высаженных в почвенный субстрат, но в этом случае флуоресценция амплифицированных вирусоспецифичных фрагментов гораздо интенсивнее, чем при анализе пробирочных растений. У генотипа 1-220-1 ВККМ выявлен только на растениях, проходящих стадию акклиматизации в почвенном субстрате. Вероятно, при культивировании *in vitro* содержание вируса снижается и его оп-

ределение данным методом становится затруднительным. У генотипа 16-136-6 вирус не обнаружен ни в пробирочных растениях, ни в растениях, высаженных в почвенный субстрат.

Таким образом, для выявления иммунных к ВКЖМ форм ремонтантной малины определение вируса методом RT-PCR целесообразно проводить в листьях однолетних побегов в период с августа по октябрь, а оценку эффективности проведения оздоровления *in vitro* – на растениях, высаженных в стерильный почвенный субстрат.

**СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАФТИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ
НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В ВЫСОКО- И НИЗКОПРОДУКЦИОННЫХ ШТАММАХ
КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ**

**Comparison of the naftylacetic acid affect on the formation
of phenolic compounds in high- and lowproductive strains
of tea-plant callus cultures**

Т.Н. Николаева, Н.В. Загоскина, М.Н. Запрометов
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: phenolic@ippras.ru

Одной из характерных особенностей высших растений является их способность к синтезу разнообразных соединений вторичного метаболизма. К числу наиболее распространенных их представителей относятся фенольные соединения (ФС), многие из которых обладают высокой биологической активностью. Именно этим и объясняется столь широкое их использование в качестве лечебных препаратов.

Получение вторичных метаболитов, в том числе и фенольной природы, может осуществляться и с использованием культур клеток высших растений. Однако в большинстве случаев их биосинтетическая способность ниже, чем у исходных эксплантов. Это, в свою очередь, требует «модификаций» питательных сред и подбора условий, способствующих накоплению ФС, в частности, за счет гормонов или гормоноподобных веществ.

Целью данного исследования являлось изучение действия различных концентраций нафтилуксусной кислоты (НУК) на рост, образование суммы растворимых ФС, флаванов и лигнина у высокопродуктивной каллусной культуры стебля чайного растения (штамм ИФР-ЧС-2), а также сравнение полученных данных с аналогичными показателями, полученными ранее на низкопродукци-

онном штамме ИФР-ЧС-1 такого же происхождения.

Каллусные культуры чайного растения штамма ИФР-ЧС-2 выращивали в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-Д ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и глюкозу (25 г/л). В опытных вариантах в состав питательной среды для роста штамма вместо 2,4-Д вводили НУК в концентрациях $2 \cdot 10^{-7}$, $2 \cdot 10^{-6}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ или $6 \cdot 10^{-5}$ М, аналогично ранее использованным при работе со штаммом ИФР ЧС-1. Материал анализировали в фазе экспоненциального роста культивирования (28-й день). Для извлечения ФС каллусы измельчали и подвергали экстракции 96 %-ным этанолом. В этанольных экстрактах определяли содержание суммы ФС и флаванов, а в оставшемся после экстракции материале – содержание лигнина.

Ранее проведенные исследования показали, что у штамма ИФР-ЧС-1 через пять лет культивирования способность к синтезу ФС значительно снизилась, в отличие от штамма ИФР ЧС-2, который уже свыше 20 лет культивирования сохраняет высокий уровень ФС. В настоящее время содержание ФС у штамма ИФР ЧС-2 в 20 раз превышает таковое у штамма ИФР-ЧС-1. Кроме того, было показано, что при замене в питательной среде 2,4-Д на НУК у низкопродукционного штамма ИФР-ЧС-1 происходило значительное увеличение содержания суммы растворимых ФС, флаванов и лигнина (в семь, десять и четыре раза соответственно) на фоне подавления роста ткани.

В случае высокопродукционного штамма ИФР-ЧС-2 при всех использованных концентрациях НУК (от $2 \cdot 10^{-7}$ до $6 \cdot 10^{-5}$ М) каллусы росли хуже, чем на основной питательной среде с 2,4-Д. Особенно ярко это проявлялось при низких концентрациях НУК ($2 \cdot 10^{-7}$ и $2 \cdot 10^{-6}$ М), когда прирост каллусной массы снижался в 1.5-2 раза по сравнению с контролем. При этом во всех вариантах с НУК наблюдался ризогенез, что не было характерно для штамма ИФР-ЧС-1. Содержание суммы растворимых ФС и флаванов в каллусах увеличивалось (на 30 % по сравнению с контролем), тогда как количество лигнина практически не менялось.

Все это свидетельствует о том, что вышеуказанные штаммы каллусных культур чайного растения отличались ответной реакцией на действие НУК, что, скорее всего, обусловлено значительными различиями в их способности к синтезу ФС.

**ОСОБЕННОСТИ ДИФфуЗИОННОГО ТРАНСПОРТА ВОДЫ
В КОЛОНИЯХ МОРФОГЕННОГО И НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЛУСОВ
FAGOPYRUM TATARICUM CAERTH (L.)
В ОТВЕТ НА ЛОКАЛЬНЫЙ ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС.
ИССЛЕДОВАНИЕ ИМПУЛЬСНЫМ МЕТОДОМ ЯМР**

**NMR investigation of water diffusion transport in morphogenetic
and nonmorphogenetic callus culture of *Fagopyrum tataricum Caerth* (L.)
in response to the local osmotic stress**

Д.К. Нургалиева, А.Н. Акулов, Т.А. Сибгатуллин, А.В. Анисимов
Казанский институт биофизики и биохимии КазНЦ РАН, г. Казань
E-mail: dinurgalieva@gmail.ru

Разнообразие систем на основе каллусных и суспензионных культур, которые могут быть использованы как объекты для генетической трансформации, мутагенеза *in vitro* и клеточной селекции, объясняют интерес к разным сторонам метаболизма этих объектов, в том числе, к особенностям межклеточного и внутриклеточного транспорта воды. При этом, являясь самодостаточным объектом для изучения водного переноса, разделение типов каллусов на морфогенные и неморфогенные создает новые экспериментальные возможности в сравнительных исследованиях межклеточных гидродинамических связей.

Учитывая ограниченность применений методов магнитной спектроскопии к исследованию каллусов, в работе представлены результаты адаптации спин-эхо ЯМР к изучению особенностей водного транспорта воды в колониях морфогенного и неморфогенного каллусов гречихи, с акцентом на связность клеток в колонии по водному переносу. Схема экспериментов построена на регистрации диффузионных параметров в протяженном образце каллуса в зоне, отстоящей на 3 см от зоны, где инъекцией осмотика (ПЭГ 4000, осмотическое давление -0,35 МПа) создавался локальный осмотический стресс. Учитывалась возможность распространения осмотика по образцу вследствие капиллярного эффекта. Эксперименты проводились на ЯМР-спектрометре на частоте 16 МГц с использованием техники импульсного градиента магнитного поля. Для количественного описания результатов экспериментов использовался формализм эффективных коэффициентов диффузии.

Регистрировались средние коэффициенты диффузии с последующей оценкой характеристического размера ограничения диффузии и коэффициентов диффузионной проницаемости.

ных филаментов в пучки, а механизм регуляции этого процесса может обеспечиваться набором актин-связывающих белков. Вероятно, присутствием большого количества актин-связывающих белков объясняется не столь равномерная, по сравнению с мышечными F-актинами, посадка маркера фаллоидин-коллоидное золото на сеть актиновых филаментов из растительных объектов. Присутствующие в препаратах «примесные» белки, по-видимому, конкурируют с фаллоидином в местах его специфического связывания и тем самым препятствуют его посадке на актиновые филаменты. С другой стороны, известно, что характер агрегации актиновых филаментов определяется, во-первых, наличием разных изоформ актина и, во-вторых, присутствием разнообразных актин-связывающих белков.

Ранее нами в препаратах листьев *Vicia faba* L., обогащенных растительным актином, был обнаружен актин-ассоциированный белок с молекулярной массой 56 кД. Разработан метод его выделения и получения в препаративных количествах.

С использованием технологии фагового дисплея к данному белку, а также к растительному актину получены мини-антитела. Для поиска клонов, специфичных к растительному актину и белку 56 кД, использовали фагмидную библиотеку 10^{12} к.о.е. Белок концентрацией 1 мкг/мл для первого раунда и 100 нг/мл для второго, третьего раундов селекции. На основе полученных антител и миниантител синтезированы флуоресцентные маркеры для изучения локализации белка 56 кД в протопластах и клетках растений.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии показано влияние белка 56 кД на характер филаментообразования в препаратах куриного гладкомышечного актина и актина из поперечно полосатых мышц кролика. В присутствии этого белка образуются латерально ориентированные агрегаты филаментов, представляющие собой, в отличие от чистых препаратов актина, единую сеть близкую по организации со структурой, образуемой растительным актином в присутствии этого белка.

В протопластах клеток наиболее плотная посадка маркера наблюдалась на поверхности хлоропластов и совпадала с распределением актиновых филаментов. В меньшей степени белок 56 кД выявлялся в субкортикальной зоне и практически не обнаруживается около ядра протопластов. Известно, что хлоропласты связаны как с индивидуальными, так и с мощными тяжами актина, и вокруг расположена мощная актиновая сеть. Можно предположить, что белок 56 кД способствует образованию этой сети и тяжей. Таким образом, внутриклеточное распределение и позиционирование хлоропластов может зависеть от этого белка в процессе обеспечения их подвижности. Не исключено, что белок 56 кД участвует и в

формировании структуры субкортикального слоя цитоскелета.

Высказано предположение, что актин-связывающий белок 56 кД является важным элементом в структурной организации и динамических изменениях актинового цитоскелета клеток растений.

BENZENOID NETWORK IN PETUNIA FLOWERS

I. Orlova¹, A. Marshall-Colyn¹, Ya. Kaminaga¹, T. Koeduka², J. Schnepf¹,
B. Wood¹, Ch. Kish¹, M. Varbanova², E. Fridman², D. Rhodes¹,
E. Pichersky², N. Dudareva¹

¹ Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University,
West Lafayette

² Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology,
University of Michigan, Ann Arbor

Benzenoid and phenylpropanoid volatile compounds, primarily derived from phenylalanine (Phe), contribute to the aromas/scent of many plant species and play important roles in plant communication with their surrounding environments.

Petunia flowers emit a diverse blend of floral scent benzenoid/phenylpropanoid compounds which are synthesized predominantly in the corolla with maximum emission during the night. Using petunia as a model system we have recently identified enzymes responsible for the formation of these volatiles including phenylacetaldehyde synthase (PAAS), which is responsible for the synthesis of phenylacetaldehyde from Phe (Kaminaga et al, 2006), isoeugenol synthase (IGS1), which is responsible for the synthesis of isoeugenol from coniferyl acetate (Koeduka et al, 2006), and benzoyl-CoA:benzylalcohol/phenylethanol benzoyltransferase (BPBT), which is responsible for the synthesis of benzylbenzoate and phenylethylbenzoate from benzoyl-CoA and benzyl alcohol or phenylethyl alcohol respectively (Boatright et al, 2004). To better understand the benzenoid network in petunia, *in vivo* isotope labeling in combination with metabolic flux analysis was used in transgenic petunia plants in which the expression of BPBT and IGS1 was silenced by RNAi. Elimination of benzylbenzoate biosynthesis led to an increased emission of benzyl alcohol and benzylaldehyde, and a decrease in the endogenous pool of benzoic acid (BA) and in emission of methylbenzoate. This result confirms the contribution of benzylbenzoate to BA formation. Labeling experiments in the dark with deuterium-labeled Phe revealed a dilution of isotopic abundance in most measured compounds, suggesting the involvement of an alternative pathway from a precursor other than Phe. Down-regulation of isoeugenol formation led to a drastic increase in eugenol formation, which is usually found in trace amount in petunia flowers.

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ *THALICTRUM MINUS* L.Obtaining of *Thalictrum minus* L. transgenic cell lines

Е.А. Осипова, Е.В. Бекетова

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

E-mail: gsc@ippras.ru

Рост клеточной популяции *Thalictrum minus* и способность к биосинтезу алкалоида берберина, обладающего биологической активностью, зависят от концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде. Для получения клеточных линий с измененным гормональным метаболизмом использовали метод агробактериальной трансформации с помощью штамма *Agrobacterium tumefaciens*, содержащий плазмиду pGV 3850. Плазмида содержит целевой ген *ipt* (изопентениладенилтрансфераза – ключевой фермент биосинтеза цитокининов) под промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и селективный ген *nptII* под контролем NOS промотора. Проводили обработку каллусов исходного штамма, полученного из листа растения, и линии 233, полученной методом клеточной селекции из исходного штамма, суточной суспензией агробактерии в условиях вакуумной инфльтрации с добавлением или без добавления экстракта табака для активации *vir*-генов, а также без воздействия этих факторов. Каллусы исходного штамма и линии 233 различались по содержанию протобербериновых алкалоидов и чувствительностью к ауксину. Обработанные суспензией агробактерии каллусы высаживали на агаровую среду Мурасиге и Скуга и культивировали в течение месяца. Эффективность трансформации оценивали по выживаемости каллусов на сублетальной концентрации канамицина 50 и 20 мг/л для исходного штамма и клеточной линии, соответственно. Гибель каллусов наблюдали в течение трех пассажей. Наибольшая выживаемость каллусов у обеих каллусных культур была отмечена в варианте без воздействия факторов и в условиях вакуумной инфльтрации, самая низкая – с экстрактом листьев табака. Если применяли вакуумную инфльтрацию и экстракт листьев табака совместно, выживаемость повышалась. Для подтверждения трансформации гена *ipt* проводили анализ ДНК методом ПЦР канамицин устойчивых каллусных линий. Ген *ipt* был обнаружен только в тех клеточных линиях, которые были получены в варианте с экстрактом табака. Из 11 проанализированных канамицин устойчивых каллусных линий клеточной линии 233 в пяти подтвердилось наличие гена *ipt*, из 10 проанализированных канамицин устойчивых каллусных линий исходного штамма ген *ipt* подтвердился только в одной. Таким образом,

наиболее эффективным для трансформации из применяемых нами факторов был экстракт листьев табака. В результате используемой нами схемы для трансформации были получены трансгенные каллусные линии *Thalictrum minus*.

**ЯВЛЯЮТСЯ ЛИ ПРОЭМБРИОНАЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ КОМПЛЕКСЫ
IN VITRO АНАЛОГАМИ ЗИГОТИЧЕСКИХ ПРОЭМБРИО IN VIVO?**

**Whether are the proembryonal cell complexes *in vitro* analogous
to zygotic proembryos *in vivo*?**

**Н.И. Румянцева, С.С. Архипова, Ф.А. Абдрахимов, А.Н. Акулов,
Ю.А. Костюкова**

Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, г. Казань
E-mail: rumyantseva@mail.knc.ru

Проэмбриональные клеточные комплексы (ПЭКК), или, согласно другой терминологии, проэмбриогенные массы, – характерный морфологический маркер эмбриогенных культур разных видов растений. Существует мнение, что ПЭКК – это зародыши, остановленные в своем развитии на стадии проэмбрио добавлением ауксина в среду культивирования. Однако недостаток гистологических и ультраструктурных исследований не позволяет безоговорочно принимать это положение.

При использовании различных подходов (сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, гистологии, иммуноцитохимии, биохимии) нами было показано, что ПЭКК морфогенного каллуса гречихи татарской – это структуры, образованные разными типами клеток, дифференцированность которых зависит от величины и возраста ПЭКК. Поддержание эмбриогенного морфотипа в каллусах гречихи татарской реализуется через повторные циклы, состоящие из разрыхления предсуществующих ПЭКК и формирования новых, дочерних ПЭКК из отдельных клеток родительских ПЭКК. Важную роль в циклическом воспроизведении ПЭКК играют секретируемые арабиногалактановые белки (АГБ) и деэтерифицированные пектины.

Электронно-микроскопически ПЭКК характеризуется наличием на его поверхности фибриллярного слоя, который свидетельствует о секреторной активности клеток ПЭКК. «Зрелый» ПЭКК на стадии, предшествующей разрыхлению, с поверхности покрыт крупными шелушивающимися (погибающими) клетками, под которыми расположены один-три слоя более мелких клеток с темными включениями в вакуоли. Еще глубже выявляются слои слабодифференцированных камбиально-подобных клеток. Короткие ци-

стерны шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭР) «прошивают» тонкие клеточные стенки близлежащих клеток, формируя многочисленные плазмодесмы, и, как следствие, симпластные клеточные домены. Субповерхностные клетки слабо делятся, и основной рост ПЭКК достигается за счет деления подлежащих клеток срединных слоев. Клетки центральной части ПЭКК – более вакуолизованные, имеют ядро с активным ядрышком, длинные цистерны ЭР, крупные пластиды с крахмальными зернами. Межклетники в этих слоях более крупные, чем в субповерхностных. Структурная организация «зрелых» ПЭКК гречихи татарской находит мало сходства с зиготическим проэмбрио гречихи (размеры, форма, наличие суспензора, дифференциация клеток), более напоминая аномальный зародыш или зиготические мутанты, у которых нарушено формирование протодермы, но наблюдается дальнейшая дифференцировка тканей. Более того, в составе ПЭКК (на его поверхности) обнаружены специфичные клетки с фенольными вакуолями, которые в незрелых плодах гречихи выявляются только в покровных тканях (эндокарпии, микропилярной зоне, халазе и фуникулюсе). Гистохимически и иммуноцитохимически в вакуолях этих клеток обнаружена колокализация таннинов и АГБ. Проведенные исследования позволяют заключить, что ПЭКК – это необычные структуры, которые нельзя определять как аналогию зиготическим проэмбрио, они имеют видовую специфику, и образованы как слабодифференцированными (стволовыми) клетками, так и различно дифференцированными (специализированными) клетками. Терминологически эти структуры, вероятно, следует определять как эмбриоидогенные клеточные комплексы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-49433а.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО И ПРООКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДОВ НА БАКТЕРИИ *ESCHERICHIA COLI*

The study of flavonoids antioxidant and prooxidant effects on bacteria *Escherichia coli*

З.Ю. Самойлова, И.В. Буракова, Г.В. Смирнова
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь
E-mail: samzu@mail.ru

В настоящее время все большее внимание уделяется изучению антиоксидантных и прооксидантных свойств различных химических соединений и их смесей, поступающих в организм человека в

составе пищи, лекарственных препаратов и т.д. Бурное развитие таких исследований связано с потребностью получения на основе растительного сырья биологически активных веществ, способных нейтрализовать губительные последствия окислительного стресса. В этом отношении особенно актуально изучение биологической активности флавоноидов, вторичных метаболитов растений полифенольной природы.

Известно, что флавоноиды оказывают антиоксидантное действие на организм человека. Некоторые ученые придерживаются мнения, что антиоксидантный эффект этих веществ обусловлен их взаимодействием с микрофлорой кишечника. В связи с этим существует необходимость в изучении влияния флавоноидов на антиоксидантные и прооксидантные системы бактерии *Escherichia coli*.

Целью настоящей работы явилось изучение прооксидантного и антиоксидантного действия флавоноидов на бактерии *E. coli* в условиях пероксидного и супероксидного стресса.

Установлено, что в условиях пероксидного стресса (10 мМ H_2O_2 , 30 мин.) 0.1 мМ кверцетина и кемпферола оказывают положительное влияние на выживаемость *E. coli* AB1157. По сравнению с контролем (26 ± 4 %) выживаемость в присутствии кверцетина составила 53 ± 10 %, а в присутствии кемпферола 56 ± 7 %. Также выяснено, что кверцетин в 1.5 раза увеличивает скорость роста при наличии в среде 2 мМ H_2O_2 . Обнаружено, что флавоноиды не оказывают защитного действия против менадиона, генератора супероксидного радикала.

С целью изучения механизмов антиоксидантного действия флавоноидов было исследовано их влияние на экспрессию генов антиоксидантной защиты *katG* и *sodA*, относящихся соответственно к оперонам *OxyR* и *SoxRS*. Однако наблюдалось повышение экспрессии *katG::lacZ* в 1.85 раза при действии 0.2 мМ кверцетина. Было зарегистрировано повышение экспрессии *sodA::lacZ* в 1.78 и 1.2 раза по сравнению с контролем в присутствии кверцетина и кемпферола, соответственно. Экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные системы, в условиях окислительного стресса может увеличиваться под действием соединений, способных хелатировать ионы Fe^{2+} . Нами было обнаружено, что при добавлении в среду 2 мМ H_2O_2 дипиридил и дефероксамин обеспечивали защиту от пероксидного стресса и способствовали увеличению экспрессии *sodA::lacZ* в 3 и 2.5 раза, соответственно. При этом была отмечена низкая индукция экспрессии *katG::lacZ*. При добавлении менадиона дипиридил и дефероксамин защитное действие не проявляли.

Известно, что одним из возможных механизмов антиоксидантного действия флавоноидов является хелатирование ими ионов железа, в результате чего подавляется реакция образования гидроксильного радикала. Спектрофотометрическими методами было

установлено, что в описываемых условиях кверцетин, рутин, 3-гидроксифлавоон, кемпферол и гесперетин в концентрации 50 μM образовывали комплексные соединения с ионами Fe^{2+} . Молярное соотношение в комплексах флавоноид : железо составило 1:0.7, 1:2, 1:3.5, 1:1 и 1:2 соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженном антиоксидантном действии кверцетина и кемпферола на бактерии *E. coli* при пероксидном стрессе.

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПУТЕЙ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

Hormonal control of morphogenesis pathways of wheat anther *in vitro* culture

О.А. Сельдимирова

Институт биологии Уфимского НЦ РАН, г.Уфа
E-mail: kruglova@anrb.ru

Важная задача современных генетико-селекционных исследований – получение в более короткие сроки новых сортов. Один из способов коммерческой селекции, в частности, зерновых злаков, – метод культуры *in vitro* пыльников. При решении биотехнологических задач важно знать, по какому именно пути морфогенеза *in vitro* будет идти воспроизведение растений и каковы условия, индуцирующие развитие морфогенетически компетентных клеток по этому пути. У злаков индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* – сложный процесс, зависящий от взаимного влияния многих факторов, в частности, введение в состав культуральной среды определенных гормонов конкретной концентрации. Выбор оптимальной концентрации гормонов, как правило, носит случайный характер. Не проводится и детальное цитологическое и гистологическое исследование развития микроспор по определенному пути морфогенеза *in vitro*. Некоторые исследователи (Горбунова и др., 2001) предложили надежный критерий индукции пути морфогенеза микроспор на основании гормональных показателей пыльника донорного растения. Используя метод твердофазного иммуоферментного анализа растительных образцов, повышающего точность экспериментов за счет высокой специфичности отношений антител к гормонам (Кудоярова и др., 1986), выявлено, что индукция определенного пути морфогенеза микроспор в культуре *in vitro* зависит от баланса уровня (количества и качества) эндогенных (в пыльниках) и экзогенных (в составе питательной среды) гормонов. Этот подход, а также выявление цитологических и гистологических

данных были использованы нами при исследовании особенностей индукции путей морфогенеза в культуре *in vitro* пыльников пшеницы.

Объектом исследования служили пыльники яровой мягкой пшеницы сорта Жница и линии Фотос, контрастные по содержанию эндогенного гормона – ауксина ИУК (индолил-3-уксусной кислота) (53 ± 2 и 432 ± 3 нг/г сырой массы, соответственно).

В культуре *in vitro* пыльников обоих генотипов пшеницы отмечены два пути морфогенеза – эмбриоидогенез и каллусогенез, связанные с формированием андроклинных структур – эмбриоидов и каллусов, соответственно. Однако морфогенез в пыльниках каждого из изученных генотипов характеризуется своими особенностями.

У высокоауксиновой линии Фотос эмбриоидогенез, состоящий в формировании эмбриоидов – зародышеподобных биполярных структур, отмечен уже на безгормональной среде. Максимальное количество эмбриоидов наблюдается при концентрации 2,4-Д 0.1 мг/л. При повышении концентрации 2,4-Д до 0.25 мг/л начинается формирование полиэмбриоидов, также представляющих собой зародышеподобные структуры, но имеющих в отличие от эмбриоидов несколько апексов побега, объединенных одним корневым апексом. Максимальный процент образования полиэмбриоидов отмечен при концентрации 2,4-Д в 0.5 мг/л. При концентрации 2,4-Д 1.0 мг/л начинается формирование морфогенных каллусов, содержащих группы меристематических клеток, которые способны к дальнейшему развитию с формированием растений. Стабильное образование только морфогенных каллусов происходит при концентрации 2,4-Д 1.5 мг/л. При концентрации 2,4-Д 2.5 мг/л отмечено формирование неморфогенных каллусов, не содержащих меристематические клетки и не способных тем самым к формированию растений. Дальнейшее повышение концентрации 2,4-Д не приводило к формированию в пыльниках этой линии пшеницы ни одной из выявленных андроклинных структур.

При культивировании пыльников низкоауксинового сорта Жница формирования андроклинных структур на безгормональной среде не происходит вовсе. Формирование максимального количества эмбриоидов происходит при концентрации 2,4-Д 0.5 мг/л; образование только полиэмбриоидов – при концентрации 2,4-Д 1.0 мг/л; формирование только морфогенных каллусов – при концентрации 2,4-Д 2.0 мг/л; образование только неморфогенных каллусов – при концентрации 2,4-Д 2.5-3.0 мг/л. Повышение концентрации 2,4-Д более 3.0 мг/л не приводило к формированию андроклинных структур.

При сопоставлении полученных результатов выявляется сле-

дующая закономерность: независимо от содержания эндогенной ИУК индукция путей морфогенеза при постепенном повышении концентрации экзогенной 2,4-Д всегда характеризуется определенной последовательностью: формирование эмбриоидов – формирование полиэмбриоидов – формирование морфогенного каллуса – формирование неморфогенного каллуса.

Таким образом, различный гормональный статус пыльников изученных генотипов пшеницы обуславливает их различную способность к образованию андроклинических структур на питательных средах с различной концентрацией 2,4-Д. Индукция определенного пути морфогенеза *in vitro* в пыльниках зависит от содержания эндогенной ИУК (в пыльнике) и от концентрации экзогенной 2,4-Д (в составе питательной среды).

Исследование поддержано грантами РФФИ-офи-а № 05-04-08114, РФФИ-Агидель № 05-04-97911, грантом программы «Ведущие научные школы РФ» № НШ-4834.2006.4., ГНТП АН РБ «Воспроизводство биоресурсного потенциала Республики Башкортостан».

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ СИСТЕМ С ОКСИАНИОНАМИ ВОЛЬФРАМА И ВАНАДИЯ ДЛЯ ОТБОРА РЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЙ

Selective systems with tungstate and vanadium oxyanions for the resistant plant cultures obtaining

Л.Е. Сергеева, С.И. Михальская, Е.Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев

Использование селективных систем *in vitro* давно является надежным методом отбора клеточных культур с повышенным уровнем устойчивости к разнообразным стрессовым факторам. Однако во многих экспериментах увеличение устойчивости, по сути, является увеличением толерантности (выносливости). При изменении вида стрессового агента на альтернативный (тип засоления, осмотического, минерального стрессов) либо при увеличении продолжительности стрессового воздействия толерантность отсутствует. Причина может заключаться: во-первых, в неадекватном выборе параметра, по которому ведется оценка устойчивости; во-вторых, в неадекватности самой селективной системы; в-третьих, в недостаточности стрессового давления (концентрации селективного агента).

С другой стороны, выделение клеточных вариантов, которые

характеризуются стабильным ростом при длительном культивировании при смене стрессора может свидетельствовать в пользу отбора резистентных форм. Для решения этой проблемы перспективным представляется использование селективных систем *in vitro*, содержащих ионы тяжелых металлов, в частности оксианионы вольфрама и ванадия.

Оксианионы вольфрама и ванадия, как стрессовые агенты, интересны вследствие их особой токсичности для нитратредуктазы, НР (К.Ф. 1.6.6.1). Известно, что НР, катализирующая двух-электронное восстановление нитрата в нитрит, чрезвычайно чувствительна к различным воздействиям. Абиотические стрессы могут полностью ингибировать (вплоть до диссоциации) данный фермент. Поэтому использование НР как параметра устойчивости вполне оправданно.

На селективных средах, содержащих 1 мМ вольфрама либо ванадия (в составе их оксианионов), были отобраны клеточные линии табака и сои. Клоны росли на селективных средах, содержащих только нитратную форму азота и какой-либо из оксианions-стрессоров. В таких условиях каллус не терял устойчивости несколько лет, а отдельные линии табака пролиферировали на селективных средах, содержащих 2.5 мМ ванадата. Отобранные клеточные линии характеризовались перекрестной устойчивостью к альтернативному иону.

Увеличение биомассы каллуса устойчивых клеточных линий на селективных средах коррелировало с накоплением белка при культивировании вариантов на средах, содержащих вольфрам. Максимум синтеза совпадал с логарифмической фазой роста. При выращивании на фоне стрессового влияния ванадата уровень белка постоянно увеличивался в течение пассажа. При культивировании в стрессовых условиях у клеточных линий отсутствовал окислительный стресс, отмечено (у линий сои) смещение редокс системы клеток в более восстановленное состояние, на что указывало соотношение тиолов/дисульфидов.

Устойчивость полученных вариантов исследовали на молекулярно-генетическом уровне. Используемые селективные агенты вызывали гибель клеточных культур дикого типа (по пути некроза), сопровождающиеся фрагментацией ДНК. Напротив, у устойчивых клеточных линий при культивировании на стрессовом фоне деградация суммарной ДНК не отмечена.

Это событие говорит в пользу активного функционирования всей системы усвоения азота. Такое может происходить в случае резистентности отобранных клонов. Резистентные линии перспективны как для изучения клеточных механизмов устойчивости, так и для получения растений регенерантов.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ РОСТА И БИОСИНТЕЗА ГИНЗЕНОЗИДОВ
В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЖЕНЬШЕНЯ НАСТОЯЩЕГО****Growth and production optimization of ginsenosides
in suspension cell culture of *Panax ginseng***

И.Н. Смоленская, О.В. Решетняк, А.В. Носов, Ю.Н. Смирнова, А.М. Носов
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: ismolenskaya@ippras.ru

Женьшень – одно из самых древних лекарственных растений на Земле, имеющий достаточно узкий ареал произрастания: Приморский край России, Корея, Япония, Вьетнам, Китай и Канада. Род *Panax* включает шесть основных ботанических видов и несколько эндемичных подвидов. Растения рода *Panax* синтезируют гинзенозиды – тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда. Именно с этими веществами связывают уникальные фармакологические свойства женьшеня. Задача работы состояла в изучении синтеза вторичных метаболитов и сопоставление этих результатов с популяционными характеристиками суспензионной культуры клеток *Panax ginseng*, полученной из разных частей шестилетнего плантационного корня (Ginseng & Tobacco, Южная Корея). ВЭЖХ-анализ экстрактов из разных частей шестилетних корней *P. ginseng* показал присутствие в них семи анализируемых гинзенозидов (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re). Их суммарное содержание составляло: для основных корней – 1.16 и 0.64; для корневища – 4.00 и 4.60; для боковых корней (d = 0.4-0.5 см) – 6.79 и 4.38; для тонких корешков (d = 0.1-0.15 см) – 13.26 и 11.37 %.

Из боковых и тонких корней получены четыре новые линии каллусов женьшеня, в которых после первого года культивирования было обнаружено присутствие полного спектра гинзенозидов (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rf, Rg₁, Re), и их суммарное содержание колебалось от 0.2 до 0.4 %. ВЭЖХ-контроль этих каллусных линий в течение пяти лет культивирования показал постепенное исчезновение из спектра гликозидов гинзенозидов Rb₂, Rc, Rd, Rf. В дальнейшем из рыхлого каллуса, растущего на среде МС с добавлением 0.5 мг/л БАП, была получена суспензионная культура клеток. Нами охарактеризована эта суспензия по скорости роста, цитогенетическим параметрам и определены количественные и качественные характеристики синтеза гинзенозидов. За время пассажа биомасса суспензии прирастает в разных экспериментах от трех до пяти раз. ВЭЖХ-анализ качественного и количественного состава гликозидов в суспензионной культуре показал присутствие только гинзенозидов Rb₁, Rg₁ и Re, с преобладанием Re-гинзено-

зида, а суммарное содержание гинзенозидов в этой суспензии оказалось на уровне 0.04 % от сухой биомассы. Для повышения уровня синтеза гинзенозидов большое внимание было уделено оптимизации условий выращивания клеток *in vitro*, прежде всего составу питательных сред. Известно, что регуляторы роста и их соотношение являются факторами, оказывающими влияние как на рост и дифференцировку, так и на специализированный метаболизм. В составе питательных сред чаще всего используют два соединения с ауксиновой активностью (синтетические ауксины) – 2,4-Д и НУК. Эти гормональные препараты оказывают различное действие на синтез вторичных соединений. Нами было проведено восемь субкультивирований на средах, содержащих НУК в концентрациях от 0.1 до 2 мг/л с добавлением 0.5 мг/л БАП, при этом в первом, втором, третьем, четвертом и шестом пассажах мы определяли динамику роста и синтеза гинзенозидов. Рост суспензии клеток, как правило, замедлялся уже в первом пассаже на средах с НУК, и такой характер роста повторялся в последующих пассажах. Средний индекс роста по сырой массе имел значение 2.15, что в 2.5 раза меньше, чем в контроле. Подсчет митозов в популяциях клеток показал, что в присутствии НУК в период максимального прироста числа клеток (с пятых по 11-е сутки) митотический индекс в четвертом и шестом пассажах не поднимался выше 0.13 %, тогда как в контроле он достигал значений 0.7-2.0 %. Культивирование суспензии на средах с НУК оказывало существенное влияние не только на рост, но и на содержание гинзенозидов. В отличие от ростовых параметров, которые снижались уже в первом пассаже, уровень гинзенозидов постепенно повышался от пассажа к пассажи. В первом пассаже он был равен 0.55 % от сухой биомассы, и к третьему-четвертому пассажам среднее содержание гинзенозидов на всех средах с НУК достигло значения 4.46 % от сухой массы, что было в 25 раз больше, чем в контроле. При этом изменялся и состав соединений – присутствовали все семь основных гинзенозидов. При культивировании суспензии на средах с НУК в течение шести-восьми пассажей суммарное содержание гинзенозидов в отдельных экспериментах колебалось от 3.9 до 7-8 %. К десятому пассажи синтез гинзенозидов снижался и составлял 1.62 % от сухой биомассы. При этом качественный состав гинзенозидов был таким же, как в контроле – обнаружены только Rb₁, Rg₁ и Re гинзенозиды с преобладанием Re-гинзенозида. Таким образом, из представленных данных видно, что присутствие НУК в среде культивирования оказывало противоположное влияние на рост суспензионной культуры клеток *P. ginseng* и синтез гинзенозидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 05-04-48564).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЕКЦИИ ГОРОХА НА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Use of biotechnologic methods in pea breeding for drought-resistance

Г.В. Соболева

Всероссийский научно-исследовательский институт
зернобобовых и крупяных культур, г. Орел
E-mail: office@vniizbk.orel.ru

Горох в целом не является засухоустойчивой культурой. Поэтому существующие районированные сорта не отличаются достаточной засухоустойчивостью. Низкая результативность селекции на этот признак обусловлена отсутствием доноров тех или иных признаков засухоустойчивости, слабой изученностью уровня устойчивости, сложностью совмещения в сорте высокой продуктивности и засухоустойчивости. Поэтому поиск и разработка эффективных путей повышения засухоустойчивости современных сортов гороха приобретают актуальное значение.

Цель исследований заключалась в разработке селективных систем для выделения вариантов гороха, устойчивых к осмотическому стрессу.

Исходным материалом для исследований служили морфогенные длительно пассируемые каллусы гороха генотипов Орлус и Аз-93-1964. Осмотический стресс моделировался введением в питательные среды полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Последовательность процедур, связанных с отбором соматических клеток гороха на селективных средах, включала следующие этапы: индукцию каллусообразования, получение длительно пассируемых каллусов, отбор осмоустойчивых каллусов на селективных средах, индукцию морфогенеза в отобраных каллусах, регенерацию растений, адаптацию их к условиям *in vivo*, получение семенного потомства и его тестирование на устойчивость к засухе.

Изучали две схемы отбора осмоустойчивых каллусов: 1) многократное субкультивирование каллусных тканей гороха на селективных средах с относительно низкой концентрацией ПЭГ (15%); 2) отбор каллусов на селективных средах с высоким содержанием ПЭГ (20-25 %) при сокращении числа субкультивирований до 1-3.

Установлены общие особенности поведения каллусов гороха в стрессовых условиях. С увеличением селективной нагрузки уменьшаются ростовой индекс и число жизнеспособных каллусов. Про-

веденные исследования показали, что более предпочтительной селективной схемой для получения каллусов, устойчивых к осмотическому стрессу является одноступенчатый отбор на селективных средах с 20 % концентрацией ПЭГ. Для индукции морфогенетических процессов у отселектированных каллусов наиболее эффективным оказалось использование высоких концентраций БАП (4.5-5 мг/л) в сочетании с НУК (0.02-2.0 мг/л). При этом каллусные клоны характеризовались низкой интенсивностью закладки стеблевых почек и формирования регенерантных побегов. Период от закладки стеблевых почек в каллусной ткани до формирования регенерантных побегов длиной 2-2.5 см составлял в среднем 60-70 суток. Эффективность морфогенеза у каллусов составляла 20-30 %. В результате исследований из осмоустойчивых каллусов были получены корнесобственные регенерантные растения.

Растения-регенеранты R_2 сорта Орлус были проанализированы на засухоустойчивость в вегетационном опыте. Исследования показали, что в условиях почвенной засухи (35 % ПВ) потери воды в течение 6 час завядания у регенерантов оказались ниже в сравнении с контролем. При этом увеличивалась доля рабочей адсорбирующей поверхности у регенерантов и наблюдалось уменьшение площади прилистников. У контрольного варианта наблюдалась обратная зависимость. Это свидетельствует о повышенной устойчивости к засухе вариантов, отобранных на средах с полиэтиленгликолем. Структурный анализ элементов урожая показал, что регенерантные растения сорта Орлус, отселектированные на средах с ПЭГ, отличались меньшей длиной стебля и меньшим числом непродуктивных узлов в сравнении с контролем. В условиях 35 % влажности почвы отмечена тенденция к повышению числа продуктивных узлов, числа бобов и семян у растений-регенерантов, выявлено существенное повышение продуктивности семяобразования. При этом в условиях почвенной засухи отмечена тенденция к повышению продуктивности регенерантных растений, отобранных на селективных средах с ПЭГ.

Разработанный метод отбора соматоклональных вариантов гороха на селективных средах с ПЭГ позволяет осуществлять тестирование генотипов на устойчивость к действию осмотического стресса на тканевом уровне, а также вести селекцию *in vitro*. Предложенный метод включает все этапы регенерации – от получения первичных каллусов до растений-регенерантов и перевода их в нестерильные условия.

Использование методов клеточной селекции в качестве одного из этапов создания засухоустойчивых сортов гороха позволит расширить спектр исходного материала и ускорить селекционный процесс.

ВЛИЯНИЕ ИОННОГО СОСТАВА СРЕДЫ НА АЦИДОФИЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ КОРНЯ

Influence of the medium ionic composition on root acidification activity

А.И. Соколик, Л.Л. Ушкова, Т.А. Зубченко, В.М. Юрин
Белорусский государственный университет, г. Минск
E-mail: sokolik@bsu.by

Активная секреция ионов водорода из клеток корней (ацидофицирующая активность корня, ААК) – фундаментальный процесс, важный для всей жизнедеятельности растительного организма. Реакция протонной помпы, осуществляющей этот процесс, на изменение минерального состава среды, является одним из основных приспособительных механизмов растений к меняющимся условиям среды. Сегодня имеется значительный объем информации о функционировании протонной помпы на молекулярном уровне, полученной путем генетических манипуляций и экспрессии соответствующих генов в гетерологических системах, и явно недостаточно данных, полученных в условиях *in vivo*.

В настоящей работе представлены результаты изучения ААК восьми-девятидневных проростков ячменя путем измерения сдвигов рН раствора, в который помещали корни проростков. Кроме того, применяли методику потенциометрического титрования, что позволяло проводить эксперименты при определенном значении рН. Проводили как острые опыты, когда регистрировали быстрые эффекты (продолжительностью до нескольких часов), так и длительные, включая изменения минерального состава среды выращивания; базовые условия – низкосолевые этиолированные проростки, выращенные на растворе 10^{-4} моль/л CaSO_4 .

В острых опытах показано, что наряду с общим для многих одновалентных катионов стимулирующим эффектом ионов K^+ и Cs^+ (соответствующие константы Михаэлиса 10^{-4} и 10^{-3} моль/л), имеют место существенные различия в количественных параметрах наблюдаемых эффектов. Установлено, что ингибиторная активность ионов Ca^{2+} значительно возрастает в присутствии магния и хлора, определены временные параметры эффектов; продемонстрирован значительный ингибиторный эффект анионов хлора и повышения осмотичности среды. Показано, что скорость ацидофикации возрастает при подщелачивании среды.

В длительных опытах показано существенное влияние минеральных условий выращивания проростков на ААК. Так, для водной культуры наибольшую активность проявляет помпа из низкосолевых проростков. В вариантах дефицита тех или иных катио-

нов в среде Кнопа ААК проявляется только после нескольких часов выдерживания в растворе 10^{-4} моль/л CaSO_4 , причем в наибольшей степени только для условий полной среды Кнопа.

В условиях песчаной культуры, более приближенных к реальной почве, ААК проростков отсутствовала даже для низкосолевых условий, и восстанавливалась (при стимуляции калием) только после 1-3 суток выдерживания в растворе 10^{-4} моль/л CaSO_4 .

Полученные результаты позволяют говорить о сложном действии уровня калия и других катионов в среде на ААК: с одной стороны, она активируется в острых опытах при добавлении калия в раствор, с другой – то же происходит с проростками, выращенными либо вообще без калия (низкосолевые), либо в полной среде Кнопа, когда кроме калия в достатке имеются основные катионы и анионы.

Результаты опытов с проростками, выращенными в условиях песчаной культуры, могут означать, что в реальных условиях почвы ААК понижена. Возможно это происходит за счет уравнивания состава почвенного раствора, существующего в почве в виде пленок, с корневыми выделениями, когда реально корень оказывается в высокосолевой среде, в которой, как показано выше, ацидофицирующая активность ингибируется.

ИНДУКЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА В ГИПОКОТИЛЯХ ОГУРЦА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Induction of lignin biosynthesis by modified pectic oligosaccharides in cucumber hypocotyles

И.В. Сорокина, О.Г. Селиванова, Н.Ю. Селиванов, В.В. Игнатов
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
г. Саратов
E-mail: sorokina2004@bk.ru

Одним из перспективных направлений современной биотехнологии является разработка экологически безопасных методов защиты растений, основанных на формировании и повышении фитоиммунитета. Сюда относится использование элиситоров и медиаторов сигнальных систем растений в качестве стимуляторов иммунитета. Как известно, элиситорной активностью обладают углеводные фрагменты клеточных стенок растений и их патогенов, в частности пектиновые и хитин-хитозановые олигосахариды. В связи с этим представляется интересным создание на их основе гликоконъюгатов, обладающих совмещенной и/или альтернативной активностью в отношении индукции защитных реакций растений.

Для исследования влияния химической конъюгации на биологическую активность продукта нами был синтезирован конъюгат деэтерифицированного цитрусового пектина с глюкозамином, который далее подвергался ограниченной фрагментации под действием очищенного препарата эндопектиназы из *Aspergillus niger*. Полученный препарат содержал олигосахариды с диапазоном молекулярных масс 2-3 кДа. Оценку биологической активности препарата модифицированных олигосахаридов проводили с использованием растительного биотеста, основанного на индукции биосинтеза лигнина в клеточных стенках гипокотилей этиолированных проростков огурца. Отрезки гипокотилей инкубировали в течение 20 часов в растворах тестируемых олигосахаридов в концентрациях от 0.1 до 100 мг/л, в качестве положительного контроля использовали немодифицированные олигосахариды деэтерифицированного цитрусового пектина. Наличие лигнина в проводящих тканях гипокотилей огурца выявляли гистохимически по образованию окрашенного комплекса с раствором флюороглюцинола. Данный метод позволил выявить концентрационную зависимость действия тестируемых олигосахаридов на накопление лигнина. В наших экспериментах олигосахариды деэтерифицированного цитрусового пектина и пектина, модифицированного глюкозамином, имели пороговую концентрацию равную 50 мг/л, ниже которой флюороглюцинол не выявлял отличий окраски гипокотилей, обработанных олигосахаридами от контрольных, инкубированных в воде.

Для количественной оценки элиситорной активности модифицированных пектиновых олигосахаридов мы исследовали содержание предшественников лигнина в клеточных стенках гипокотилей огурца методом обратно-фазовой ВЭЖХ. Данный метод позволил выявить спектр монолигнолов клеточной стенки огурца, в котором в качестве основных компонентов нам удалось идентифицировать кофейную и п-кумаровую кислоты. Следует отметить, что полученный нами спектр отличался от ранее описанного в литературе спектра лигнино-подобных соединений гипокотилей огурца с доминированием п-гидроксибензальдегида и п-гидроксибензойной кислоты. Анализ полученных данных показал, что после 20 часов инкубации гипокотилей в присутствии модифицированных олигосахаридов в концентрации 100 мг/л в клеточных стенках огурца происходит увеличение содержания кофейной кислоты в среднем в 2.3 раза, а кумаровой в 2.6 раза по сравнению с контрольными образцами, инкубированными в воде. При этом немодифицированные олигосахариды вызывали увеличение содержания этих кислот в 1.8 раза и 2.3 раза соответственно.

Таким образом, модификация пектиновых олигосахаридов глюкозамином не только не оказывает ингибирующего эффекта на их

биологическую активность, но и повышает удельную активность конъюгата в отношении индукции образования полифенолов клеточной стенки. Лигнификация является важной частью системы биохимических реакций, регулирующих функциональную активность тканей, дифференцировку клеток, а также защиту растений от атаки патогенов, в связи с чем мы полагаем, что полученные олигосахаридные конъюгаты могут найти применение в качестве препаратов нового поколения, регулирующих биосинтетическую активность растительных культур *in vitro*, рост и развитие растений и повышающих их устойчивость к болезням.

ТОЛЕРАНТНЫЕ К АНАЭРОБНОМУ СТРЕССУ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ И РЕГЕНЕРИРОВАННЫЕ *IN VITRO* ЦЕЛЫЕ РАСТЕНИЯ

In vitro selected cell lines and regenerated plants tolerant to anaerobic stress

А.Ю. Степанова¹, Ю.И. Долгих¹, А.Б. Вартапетян, Н.В. Чичкова²,
Л.И. Полякова¹, И.П. Генерозова¹, Б.Б. Вартапетян¹

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
E-mail: borisvartapet@jppras.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, г. Москва

Современные методы биотехнологии (генная и клеточная инженерия) открывают определенные возможности для создания растений более толерантных к анаэробному стрессу. В настоящей работе сделана попытка методом клеточной селекции *in vitro* получить более толерантные к аноксии клетки для последующей регенерации из этих клеток целых растений более резистентных к почвенному анаэробнозису. С этой целью каллусы, полученные из меристемы сахарного тростника *Saccharum officinarum* L. и незрелых зародышей пшеницы *Triticum aestivum* L., выращенные предварительно в аэробных условиях на среде Мурасиге-Скуга, подвергли ступенчатой селекции в условиях анаэробной инкубации. При этом, принимая во внимание широко принятое в настоящее время представление о ключевой роли энергетического и родственных процессов углеводного метаболизма клеток в их толерантности к анаэробному стрессу, в процессе анаэробной инкубации клетки были суспензированы в среде Мурасиге-Скуга, из которой сахара были исключены. Таким образом, отбор в анаэробных условиях более резистентных к аноксии клеток определялся лишь особенностями мобилизации и утилизации эндогенных угле-

водов. В итоге были получены клеточные линии значительно более толерантные к аноксии по сравнению с исходными контрольными каллусами. Толерантные клетки были использованы, с одной стороны, для сравнительного исследования особенностей их углеводного и энергетического метаболизма, а также индукции синтеза ферментов, ответственных за запрограммированную смерть клеток (апоптоз), а с другой – для получения из них растений-регенерантов более толерантных к почвенному анаэробнозису. Растения пшеницы, регенерированные из более толерантных клеток, как в первом, во втором, так и в третьем семенном поколении проявили заметно большую устойчивость в условиях затопления почвы, что свидетельствует о генетической природе их толерантности, а также о целесообразности и перспективности дальнейших поисков в этом направлении.

**ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ СЕМЯПОЧЕК ПРИ
МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ЧЕЧЕВИЦЫ
LENS CULINARIS × *LENS TOMENTOSUS***

**Peculiarities of separate ovule growth by interspecific hybridization
of *Lens culinaris* × *Lens tomentosus***

Г.Н. Суворова

Всероссийский научно-исследовательский институт
зернобобовых и крупяных культур, г. Орел
E-mail: office@vniizbk.orel.ru

Чечевица обыкновенная *Lens culinaris* Medik. является единственным культивируемым видом рода *Lens* Mill. *Lens tomentosus* Ladizinsky – дикорастущий представитель рода, отличающийся от *L. culinaris*, в частности, фиолетовой окраской цветка, коричневой с пигментацией окраской семенной кожуры, опушенными бобами. При скрещивании *L. culinaris* с *L. tomentosus* происходит завязывание бобов и их формирование до полной зрелости, тем не менее, семена остаются несформированными и соответственно нежизнеспособными. Культура изолированных семяпочек может быть использована для преодоления межвидовой несовместимости в данной комбинации скрещивания.

Цель настоящих исследований заключалась в получении межвидовых гибридов *L. culinaris* × *L. tomentosus* с использованием культуры изолированных семяпочек.

В гибридизации использовались сорта *L. culinaris* – Образцов

Чифлик 7, Веховская, Рауза, Светлая; образцы *L. tomentosus* коллекции ICARDA – ILWL90, ILWL120. Скрещивания проводили в тепличном боксе. Семяпочки в возрасте 8-19 дней после оплодотворения вычленили из бобов и культивировали на питательных средах. Индукционные среды содержали соли по Мурасиге-Скугу (MS) или по Гамборгу (B5), витамины по B5, 5.5 г/л агара, 30-50 г/л сахарозы, 1 г/л гидролизата казеина, 0.1 г/л инозитола и регуляторы роста: 1-2.25 мг/л БАП + 0.2 мг/л ИУК или 2 мг/л зеатина + 0.2 мг/л ИУК.

За период 2003-2006 гг. в комбинации *L. culinaris* × *L. tomentosus* ILWL90 было инокулировано на питательную среду 206 семяпочек, в комбинации *L. culinaris* × *L. tomentosus* ILWL120 – 90 семяпочек. Завязываемость бобов составила соответственно 61.1 и 68.2 %, индукция первичного развития наблюдалась у 10.2 и 6.7 % инокулированных семяпочек.

На средах с зеатином, реже на средах с БАП, происходило прорастание зародышей и формирование нормальных проростков с корешком и эпикотилем. Проростки, развивающиеся из недозревших семяпочек путем прямого эмбриогенеза были ослабленными и трудно акклиматизировались в нестерильных условиях, что приводило к потере гибридного материала. Из одного такого проростка было получено растение F₁, сформировавшее цветки и семена F₂.

На средах, содержащих БАП, в большинстве случаев наблюдалось формирование многочисленных почек и побегов из семядольного узла зародыша, что позволяло размножить гибридный генотип путем индукции дополнительных побегов. Сформировавшиеся гибридные клоны оставались жизнеспособными в течение нескольких лет. При длительном субкультивировании морфогенной ткани гибридов чечевицы F₁ *in vitro* возникает проблема укоренения регенерантных побегов. Данная проблема была решена путем укоренения отрезков побегов чечевицы в обратной ориентации на питательной среде. Если при укоренении гибридных побегов чечевицы в обычном положении – нижним отрезком побега в среду, эффективность ризогенеза составила 5.7 %, то при культивировании отрезков побегов, перевернутых базальным концом вверх и апикальным в среду, эффективность укоренения составила 66.7 %. Причем одинаковый эффект наблюдался на средах с разным составом ауксинов. В инвертированном положении корни, отрастающие на базальном конце, вскоре начинали расти вниз в среду, а формирующийся из почки побег отрастал вверх. Такие растения были способны к акклиматизации и формированию плодов.

При субкультивировании гибридов чечевицы F₁ неоднократно

наблюдался феномен цветения и формирования бобов в пробирках. По мере созревания семена высыпались в среду, где прорастали *in vitro* и давали начало растениям F_2 . Два микрорастения F_2 , полученные таким путем, были адаптированы к росту *in vivo*.

Все гибридные растения F_1 (*L. culinaris* x *L. tomentosus*) имели фиолетовые цветки и формировали темноокрашенные семена, свойственные *L. tomentosus*, в отличие от белоцветковых и светлосемянных растений *L. culinaris*, что подтверждает их гибридную природу.

Таким образом, в культуре семян при межвидовой гибридизации чечевицы возможны различные пути получения гибридных растений: индукция прямого эмбриогенеза путем прорастания недозревшего зародыша; регенерация многочисленных побегов из семядольного узла зародыша с последующим их укоренением; феномен получения и прорастания *in vitro* семян F_2 .

БИОТЕХНОЛОГИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ СИБИРСКИХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Microclonal propagation biotechnology of Siberian coniferous species *in vitro*

И.Н. Третьякова, А.С. Белоруссова, А.В. Лукина, С.С. Савельев
Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, г. Красноярск
E-mail: culture@ksc.krasn.ru

На основании свойства тотипотентности клеток в биотехнологии микроклонального размножения хвойных появилось два новых направления – соматический и микроспориальный эмбриогенез. В результате соматического эмбриогенеза происходит формирование зародыша из соматической (диплоидной) клетки или группы клеток, а микроспориального эмбриогенеза (андроклинии) – зародышеподобных структур из микроспор (гаплоидные клетки). Изучение соматического и микроспориального эмбриогенеза открывает большие перспективы в познании процесса клеточной дифференцировки и реализации морфогенетических программ в эмбриогенезе и раннем онтогенезе растительного организма, а также получении высокопродуктивных генетически однородных чистых линий. Работы по соматическому эмбриогенезу у сибирских видов хвойных до сих пор не проводились, а исследования по андроклинии у голосеменных вообще отсутствуют.

Использование в качестве эксплантов мегагаметофитов и зигот-

тических зародышей на разных стадиях формирования, а также сегментов однолетних вегетативных побегов, микроспороцитов, микроспор и пыльцы у лиственницы сибирской и сосны сибирской (кедра сибирского), произрастающих на территории Красноярского края, позволило получить у данных видов соматические зародыши и зародышеподобные структуры.

Для индукции соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской использовали среду MSG (Весвар et al., 1990) с добавлением L-глутамина и мезоинозита, у сосны сибирской – среду MS (Murashige, Skoog, 1962), 1/2 MS, LV и 1/2 LV. Во все среды добавляли гормоны 2,4-D (2 мг/л) и 6-БАП (0,5-1 мг/л). Для цитологического анализа готовили давленные препараты. Окраску эксплантов проводили сафранином с добавлением капли метиленового синего.

Проведенные исследования показали, что успешное формирование эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) зависит от срока сбора семян, стадии введения зародышей в культуру и растения-донора. Получение ЭСМ и соматических зародышей у лиственницы сибирской наиболее успешно происходило из незрелых зиготических зародышей, введенных в культуру, начиная с предсемядольной стадии развития (примордии семядолей не различимы). Формирование ЭСМ у таких зародышей начиналось в области зародышевого корешка, прилегающего к суспензору уже на пятидесятые сутки культивирования. ЭСМ состояла из крупных вытянутых сильно вакуолизированных клеток – эмбриональных трубок и примыкающих к ним округлых активно-делящихся клеток, составляющих эмбриональные глобулы. Пролиферация ЭСМ выражалась в увеличении размеров клеточных конгломератов и выделении из эмбриональной массы соматических зародышей уже через два месяца культивирования. Полученные соматические зародыши были аналогичны половым зародышам и имели биполярную структуру, на одном конце которых формировался развитый суспензор, а на другом – эмбриональная группа клеток. У зрелых зиготических зародышей развитие ЭСМ протекало менее активно и заканчивалось формированием единичных соматических зародышей.

У сосны сибирской формирование ЭСМ и развитие соматических зародышей также зависело от стадии развития экспланта при введении его в культуру *in vitro*. При введении в культуру незрелых изолированных зародышей на предсемядольной стадии образование ЭСМ и соматических зародышей происходило в 10-30 % случаев. Минеральный состав сред не оказывал значительного влияния на формирование эмбриогенного каллуса. Активное образование ЭСМ у сосны сибирской наблюдалось при обработке семян

низкими положительными температурами. При этом двух недель стратификации оказалось достаточно для инициации соматического эмбриогенеза у сосны сибирской.

ЭСМ и соматические зародыши были получены у лиственницы сибирской и сосны сибирской из сегментов однолетних побегов. При этом активность образования зародышеподобных структур из побегов зависела от генотипа дерева и шла наиболее интенсивно у гетерозисных деревьев сосны сибирской с однолетним генеративным циклом развития женской шишки.

В процессе проведения исследований впервые был индуцирован андрогенный каллус из микроспор у лиственницы сибирской. В таких каллусах шло образование эмбриоидов. Выявлено, что наиболее важными компонентами питательной среды, влияющими на данный процесс, является содержание в ней гормонов, глутамина и нитрата аммония.

Таким образом, у сибирских видов хвойных впервые были получены соматические зародыши из половых зародышей и сегментов однолетних побегов, а также индуцировано развитие андроклинных культур. Успех получения соматических зародышей и зародышеподобных структур у представителей сибирских видов хвойных был связан с генотипом дерева. Наиболее перспективными при введении в культуру оказались гетерозисные деревья, обладающие высоким репродуктивным потенциалом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-08040_офи.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ И МОРФОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ ПШЕНИЦЫ *IN VITRO*

Interrelation of proliferation and morphogenesis in callus culture of different wheats genotypes *in vitro*

С.А. Файзиева, С.Н. Наимов, К.А. Алиев
Институт физиологии растений и генетики
Академии наук Республики Таджикистан, г. Душанбе
E-mail: lab.gen@mail.ru

До настоящего времени соотношение пролиферации каллусных клеток и частоты морфогенеза остается малоизученным. Для каллусных культур диких генотипов злаковых растений и сортов пшеницы, данных также очень мало и они противоречивы. Соотношение активностей пролиферации каллусных клеток и частота морфогенеза у исследованных объектов различна. Обнаружено, что эмбриогенный каллус растет быстрее, чем неэмбриогенный. У диких

злаковых растений частота пролиферации не коррелируется с частотой морфогенеза, что, по-видимому, указывает на отсутствие сопряженностей генетических механизмов пролиферации и морфогенеза при культивировании *in vitro*. В связи с этим сопряженности генетических механизмов пролиферации и морфогенеза в культуре *in vitro*, особенно у диких злаков, остаются открытыми и имеют научное и практическое значение.

Целью наших исследований являлись процессы пролиферации и морфогенеза и их взаимосвязи в каллусных культурах разных генотипов пшеницы *in vitro*. Размер каллусов устанавливали по их наибольшему диаметру. В общей выборке каллусов исследуемых сортов злаковых и их диких сородичей оценивали на наличие адвентивных почек и их размер в конце второго или третьего месяца, а затем рассчитывали средний балл размера для эмбриональных и неэмбриональных каллусов. Исследование морфогенеза разных сортов пшеницы и их диких сородичей позволило выявить некоторые особенности морфогенного потенциала каждого индивидуума злаковых растений. В наших опытах начало морфогенеза сортов пшеницы отмечалось на 35-е сутки культивирования каллусов. Эти процессы начинались с появлением на каллусах ярко-желтых глобулярных участков ткани, на которых в дальнейшем развивались адвентивные почки и/или корни. У диких видов начало морфогенных тканей отмечалось на 60-70-е сутки культивирования каллусов, т.е. несколько позже, чем у сортов пшеницы. У них на 60-70-й день культивирования также отмечалось появление адвентивных почек и/или корней. Данные каллусы считали эмбриогенными. Окончательное становление регенерационной способности каллусов в наших условиях происходило в конце четвертого месяца культивирования каллусов сортов пшеницы. Окончательное появление адвентивных почек у диких видов происходило в конце пятого месяца и/или начале шестого. Однако не все каллусы, образовавшие адвентивные почки, были способны формировать регенеранты. Количество каллусов, дающих регенеранты было небольшим и зависело от генотипов злаковых растений. Исследование морфогенеза каллусных культур разных генотипов злаковых позволило маркировать наиболее активные морфологические каллусы, т.е. наибольшую пролиферацию каллусных клеток с образованием адвентивных почек (корни) по пятибалльной шкале. Оценка размеров каллусов по этой шкале показала, что у всех генотипов пшеницы уровень формирования адвентивных почек зависел от размеров каллусов, поэтому каллусы большого размера должны обладать и большой биомассой.

Таким образом, каллусные массы обладают способностью фор-

мировать большое количество эмбрионных каллусных тканей. Аналогичную зависимость мы наблюдали и у диких видов злаковых растений. У них размер каллусов примерно в два раза меньше, чем у сортов пшеницы, но количество морфогенных каллусов не превышает 1.5 %.

Маркировка каллусов по морфогенетическим потенциалам, их плотной консистенции и размерам каллусов, оцениваемых по пятибалльной шкале, может являться характеристикой, которую можно использовать для клеточной селекции каллусных культур генотипов пшеницы.

Получение данных позволяет рассматривать возможности выработки критериев, имеющих прогнозирующее значение в отношении морфогенетической способности каллусов разных генотипов злаковых растений и являющихся перспективными для клеточной селекции.

КУЛЬТУРА *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ СУККУЛЕНТНЫХ РАСТЕНИЙ

In vitro culture of some succulent plants

Н.В. Феоктистова, О.Б. Михалевская¹, В.С. Дементьева², В.Х. Панкин²,
А.Б. Бургутин³

¹ Московский педагогический государственный университет, г. Москва
E-mail: feoktistova_nv@yahoo.com

² Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, г. Москва

³ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Растения рода *Haworthia* Duval (сем. *Asphodelaceae* или по другой классификации *Liliaceae*), а также некоторые представители рода *Aloe* L. (сем. *Aloaceae*) – миниатюрные суккуленты, многие из которых медленно растут и трудно размножаются. На своей родине в Южной Африке некоторые виды *Haworthia* используются в народной медицине и как кормовые культуры. В наших широтах эти растения представляют немалый интерес в декоративном растениеводстве.

Нами введены в культуру следующие виды: *Haworthia truncata* Schonland, *H. attenuata* Haw., *H. cymbiformis* Duval, *H. limifolia* Marloth, *H. planifolia* Haw., *H. pygmaea* Poelln., *Aloe haworthioides* Baker. Исходные растения были получены из коллекции кактусов и других суккулентов Отдела тропических и субтропических растений ГБС РАН, а также любезно предоставлены П.В. Лапшиным (www.lapshin.org). Среди доступной литературы не обнаружено информации о культуре *in vitro* таких видов, как *H. truncata* и *H. pygmaea*. Чтобы не повредить коллекционные экземпляры

растений, в качестве первичного экспланта использовали цветоносы. Были использованы традиционные способы введения в культуру *in vitro* (режимы стерилизации тканей, питательные среды), что позволило культивировать экспланты без визуально определяемой контаминации и повреждения тканей. С использованием цитокинина получены миниатюрные растеньица непосредственно на первичных эксплантах; коэффициент размножения в этом случае был более десяти. При совместном использовании ауксина и цитокинина пролиферировала обильная каллусная масса, манипуляции с которой также способствовали получению регенерантов; в этом случае коэффициент размножения был значительно выше. Корнеобразование *in vitro* наблюдали на безгормональных питательных средах. Растения *in vitro* успешно прошли адаптацию и растут в различных субстратах: почва/песок/перлит. Обсуждаются и уточняются детали технологии *in vitro* для размножения этих растений. Для физиолога и ботаника суккуленты разных систематических групп интересны способами приспособления к экстремальным условиям обитания.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХЕМОЭФЕКТОРАМ ТРИПТОНУ И АММОНИЮ И ЕЕ
ИЗМЕНЕНИЕ В ХОДЕ ГАМЕТОГЕНЕЗА
У ЗЕЛеноЙ ЖГУТИКОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

**Sensitivity to tryptone and ammonium chemoeffectors
and its changes during gametogenesis
in the green flagellate algae *Chlamydomonas reinhardtii***

А.П. Филонова, Е.Г. Говорунова, О.А. Синещев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва
E-mail: filonova85@rambler.ru

Способность воспринимать стимулы внешней среды присуща практически всем известным живым существам и жизненно важна для них. Одноклеточная зеленая жгутиковая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* представляет собой удобный модельный объект для изучения процессов фото-, грави- и хеморецепции. Этот микроорганизм обладает выраженными двигательными реакциями на внешние стимулы и может быть легко культивирован в лабораторных условиях. В последние годы был достигнут значительный прогресс в исследовании механизмов рецепции света *C. reinhardtii*, однако изучение молекулярных основ хеморецепции этой водоросли еще только начинается.

В отличие от чувствительности к свету, чувствительность к

хемозффекторам изменяется в течение жизненного цикла *C. reinhardtii*. Нами было показано, что хемотаксис на триптон (продукт панкреатического гидролиза казеина) отсутствует у вегетативных клеток, появляется в процессе гаметогенеза и достигает максимума у зрелых гамет. В то же время хемотаксис на аммоний наблюдается только на ранних стадиях гаметогенеза, а у зрелых гамет утрачивается. Различное действие этих двух хемозффекторов проявляется также в том, что азотное голодание в темноте (в условиях сохранения вегетативного состояния клеток) вызывает у них появление чувствительности только к аммонии, но не к триптону. Различные условия появления чувствительности клеток к этим двум агентам позволяет предположить, что в основе хемотаксиса на аммоний и на триптон лежат различные механизмы рецепции и трансдукции сигнала.

Для выяснения механизмов трансдукции химических стимулов у *C. reinhardtii* в нашей лаборатории был разработан электрофизиологический подход к исследованию хемосенсорной чувствительности. Нами было установлено, что триптон вызывает подавление фоторецепторных токов, генерируемых суспензией клеток в ответ на вспышки света, причем это подавление коррелирует с наличием у клеток способности к хемотаксису на триптон. Таким образом, подавление фоторецепторных токов триптоном отражает активацию цепи трансдукции химического сигнала, имеющей, по всей вероятности, общие звенья с фотосенсорным каскадом. При этом измерение чувствительности фоторецепторных токов к триптону позволяет исследовать процессы трансдукции хемосенсорного стимула у *C. reinhardtii* с повышенным временным разрешением по сравнению с регистрацией конечного двигательного ответа клеток (хемотаксиса).

Используя этот электрофизиологический подход, мы показали, что подавление фоторецепторных токов триптоном не наблюдается, если блокировать светозависимую стадию гаметогенеза ингибитором фотосистемы II DCMU (10^{-5} М). Этот результат подтверждает тесную связь процесса появления чувствительности к триптону с гаметогенезом. Кроме того, нами было обнаружено, что чувствительность гамет к триптону увеличивается после их инкубации в среде с ацетатом. Увеличение амплитуды фоторецепторного тока в этом случае свидетельствует о том, что инкубация с ацетатом приводит к гиперполяризации клеточной мембраны. Таким образом, увеличение чувствительности гамет к триптону в этих условиях может указывать на участие электрических процессов на мембране в трансдукции химического стимула у *C. reinhardtii*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 05-04-48805).

**РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕАЛИЗАЦИИ
НАЧАЛЬНОГО ЭТАПА ПРОРАСТАНИЯ ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА****The role of reactive oxygen species at early stages of pollen germination****А.В. Чайкова, Н.П. Матвеева, И.П. Ермаков**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва
E-mail: plantphys@biophys.msu.ru

Активные формы кислорода (АФК) – частично восстановленные или активированные его производные – являются токсичным побочным продуктом кислородного метаболизма. Вместе с тем АФК включены в механизмы трансдукции сигналов и модификации жесткости растительной клеточной стенки в ходе реализации важнейших биологических процессов, включая рост и развитие, программируемую клеточную смерть, запуск ответа на биотический и абиотические стрессы. Представления о роли АФК в жизнедеятельности растительной клетки сформировались на основании изучения процессов, происходящих в вегетативных органах растений, а также в культурах соматических клеток и протопластов. В то же время гаметофитная фаза развития растения в этом отношении почти не изучена. Наиболее интересным представляется вопрос о вкладе АФК в процессы гидратации и активации пыльцевого зерна на начальном этапе прорастания, который предшествует формированию пыльцевой трубки и подготавливает его.

В задачи настоящей работы входило выявить изменения продукции АФК и способности к их ликвидации в ходе гидратации и активации пыльцевого зерна табака, а также проверить гипотезу об участии АФК, локализованных в интине, в процессе прорастания. С этой целью изучали распределение в пыльцевом зерне эндогенных АФК, а также действие на прорастание пыльцы экзогенной H_2O_2 и реагентов, способных изменить содержание АФК в оболочке: аскорбиновой кислоты и DPI (дифенилениодоний хлорид) – ингибитора НАД(Ф)Н-оксидазы плазмалеммы.

Для выявления в пыльцевом зерне АФК использовали флуоресцентный краситель DCFH-DA (2', 7'-дихлорофлуоресциндацетат). В работе использовали микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, снабженный автоматической заслонкой и цифровой камерой AxioCam HRc. Денситометрию пыльцевых зерен проводили, используя пакет программы AxioVision 4.2.

Анализ распределения АФК в пыльцевом зерне на протяжении его гидратации и активации показал, что они сосредоточены, главным образом, в митохондриях и поровых областях интины. Обнаружено небольшое увеличение содержания эндогенных АФК

в ходе активации пыльцевого зерна, которое можно связать с интенсификацией работы электрон-транспортной цепи и общей активацией метаболизма. Одновременно возрастал порог чувствительности к действию экзогенной H_2O_2 (с 5 до 100 мкМ), что свидетельствует об увеличении эффективности систем ликвидации АФК. H_2O_2 в низкой концентрации (5 мкМ) стимулировала прорастание, вызывая одновременно транзиторное увеличение содержания внутриклеточных АФК. Этот эффект можно рассматривать как проявление сигнальных функций H_2O_2 . Высокие концентрации H_2O_2 (≥ 500 мкМ) ингибировали прорастание, вызывая, по-видимому, окислительный взрыв. Выявлен двунаправленный эффект аскорбиновой кислоты на прорастание: она стимулировала или подавляла прорастание в зависимости от концентрации (100 мкМ и 5 мМ, соответственно). DPI (100 мкМ) ингибировал активность НАД(Ф)Н-оксидазы плазматической мембраны, о чем свидетельствует уменьшение содержания АФК в пыльцевом зерне, и в то же время стимулировал прорастание. Таким образом, снижение содержания АФК в оболочке пыльцы под действием низких концентраций аскорбиновой кислоты или DPI способствовало прорастанию. Можно предположить, что эти агенты уменьшали вероятность реакций образования окислительных сшивок между структурными полимерами, идущих с участием АФК, и тем самым подавляли процесс ригидизации интины. Полученные данные в совокупности свидетельствуют о том, что в ходе гидратации пыльцевого зерна активируется продукция внутриклеточных и стеночных АФК, которые потенциально опасны, но в то же время участвуют в прорастании, выступая как сигнальные молекулы или модификаторы полимерного матрикса интины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 05-04-49370-а).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* В ПРАКТИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ ЯЧМЕНЯ

Using of cultivation *in vitro* in barley breeding

О.Н. Шуплецова, И.Н. Щенникова

Зональный научно-исследовательский сельскохозяйственный институт
Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, г. Киров

E-mail: niish-sv@mail.ru

В Зональном НИИСХ Северо-Востока проводятся исследования по созданию исходного селекционного материала ячменя, устойчивого к абиотическим факторам среды методами клеточной

селекции. В лаборатории генетики созданы при различных схемах отбора на селективных средах с алюмокислым стрессом и переданы в дальнейший селекционный процесс алюмоустойчивые формы ярового ячменя. В то же время получены регенеранты, образованные на селективной среде с водным дефицитом. В настоящее время начались исследования по созданию исходного материала ячменя, устойчивого к комплексному алюмокислородному и осмотическому стрессам. В результате проведенных исследований предложены две схемы для отбора каллусных линий с сочетанной устойчивостью к кислотности, токсичности алюминия и осмотическому стрессам: последовательный отбор на селективных средах с осмотиком и алюминием в прямом и обратном порядке введения селективных агентов. Получены регенеранты с комплексной устойчивостью.

Получены практические результаты работы с регенерантами, отобранными в клеточной культуре с высокой концентрацией ионов водорода и алюминия. Сложность работы с регенерантами заключается в том, что они часто имеют низкую продуктивность, поэтому используются в качестве компонентов для скрещивания. В результате оценки в вегетационных и полевых опытах в лаборатории селекции и первичного семеноводства ячменя выделен номер 530-98, полученный на жесткой селективной среде с высокой концентрацией ионов водорода и алюминия. Регенерант отличается от стандарта более высокой выживаемостью на почвах, подверженных эдафическому стрессу, и продуктивной кустистостью. Урожайность сорта 530-98 на кислых дерново-подзолистых почвах достигает 5.83 т/га, что на 23.8 % выше стандарта Биос 1. Сорт готовится к передаче на Государственное сортоиспытание.