

7. Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, v.66, №2, 107–111.
8. Borges M., Ceiro W., Meneses S., Aguilera N., Vázquez J., Infante Z., Fonseca M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, vol.76, №1, 87–90.
9. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, v.61, №2, 161–164.
10. Lemos E.E.P. de Ferreira, Alencar M. de S., Ramalho Neto L.M.C., Albuquerque C.E. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm // Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 2002, v.37, N10, 1359–1364.
11. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // *In vitro* — Cell Dev. Biol. — Plant, 2004, v.40, 485–490.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962, v.15, 473–497.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. школа. — 1990. — 352 с.

### **Резюме**

Проведена сравнительная оценка влияния маннитола и абсцизовой кислоты на рост асептически культивируемых растений *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, что маннитол в составе питательных сред может применяться для длительного хранения растений этих видов *in vitro*.

Проведено порівняльну оцінку впливу манітолу та абсцизової кислоти на ріст асептично культивованих рослин *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, що манітол у складі живильних середовищ може застосовуватись для тривалого зберігання рослин цих видів *in vitro*.

Comparative study of the influence of mannitol and abscisic acid on the growth of aseptically cultured *D. monspessulanus* and *I. quadrifida* plants has been carried out. Culture media supplied with mannitol can be used for long-term *in vitro* conservation of plants of both species.

### **ВЛАСОВ В.Г., САВЕНКО Е.Г.**

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса  
Россия, г. Краснодар, 350921, н/о Белозерное, E-mail: arrri\_kub@mail.ru

## **ЦИТОЛОГО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА РИСА В ОНТОГЕНЕЗЕ**

Культивирование пыльников связано с реализацией таких путей морфогенеза *in vitro*, как эмбриоидогенез и каллусогенез. При каллусогенезе инициальная клетка — микроспора сначала формирует недифференцированный каллус. После переноса на регенерационные питательные среды в каллусе отмечаются различные морфогенетические процессы.

### **Цель работы**

Получить экспериментальные данные о структуре андроклинного каллуса риса, выявить пути морфогенеза *in vitro* каллусов.

### **Материал и методы**

Инокуляцию пыльников проводили согласно методике для культуры клеток и тканей *in vitro*, предусматривающей асептические условия культивирования. Постоянные препараты получали согласно методике приготовления гистологических срезов с использованием микротомы. Окрашивание проводили гематоксилин-эозином, бромфеноловым синим, забуференным кислым тионином, реактивом Шиффа и красителя крезоловым фиолетовым для выявления общей морфологии клеток и наличия в них полисахаридов и белков.

### **Результаты и обсуждение**

Эмбриониды или андрогенные зародыши, они же глобулярные пыльцевые зародыши, которые образуются из пыльцевых зерен, не рассматривались ввиду их отсутствия в исследованиях, проводившихся в динамике.

Для стимуляции процесса каллусообразования использовали питательную среду Блейдса с 2 мг/л 2,4-Д, для регенерации — среду MS с 1 мг/л  $\alpha$ -НУК, 5 мг/л кинетин.

Каллусы из пыльников появлялись на 20–40 день с момента инокуляции в зависимости от генотипа, и этот показатель колебался от 2,7% до 20,8%.

Отбирались каллусы разного типа по структуре — белые, плотные, компактные. Они классифицировались как морфогенные. Мягкие, рыхлые, желтоватые каллусы рассматривались как неморфогенные (рис. 1).

Ранняя стадия развития каллуса (находится внутри гнезда пыльника) представлена беспорядочным скоплением клеток и не имеет зачатков зародышеподобных структур, которые появятся в более поздней стадии с образованием выступов-протуберанцев, которые являются следствием неравномерного разрастания массы каллуса. В дальнейшем происходит дифференцировка его тканей.

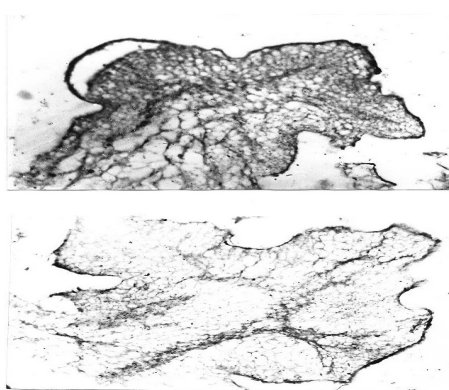


Рис. 1. Морфогенный (вверху) и неморфогенный (внизу) каллусы

На гистологических срезах различаются в основном три вида клеток — корона, меристема и паренхима.

Корона состоит из рыхлой ткани, состоящей из небольших, вакуолизованных клеток, вероятно ограничивающих массу каллуса от атмосферного воздуха. Меристема образует по периферии выступы, неравномерно растущие, называемые протуберанцами. Паренхима залегает в глубине каллуса и состоит из округлых или полигональных клеток различной величины. Впоследствии в этой ткани закладываются элементы сосудов и формируются сосудистые пучки.

На поверхности протуберанцев, в меристеме появляются инициали, точки роста, зоны роста, которые бугорками выступают над поверхностью протуберанца. Они более интенсивно окрашены. Такие зоны обладают выраженными меристематическими признаками — клетки расположены рядами, они крупные, с крупным округлым ядром и заметным ядрышком. В таких зонах и появляются зародышеподобные структуры — эмбриониды каллуса, зачатки нового растительного организма.

В эмбриоидах появляются закладка колеоптиля, точки роста побега с зачатками листьев и меристема зародышевого корня (рис. 2). Следует отметить, что появление эмбрионидов в каллусе происходит не одновременно.

При развитии эмбрионидов каллуса закономерности, отмеченные в зиготических зародышах, не всегда соблюдаются. В таких эмбриоидах, в отличие от строгого дорзовентрального строения зародышей, наблюдается искажение стебля и корня. Процесс органогенеза часто имеет отклонения: недоразвитие и отсутствие колеоптиля, искажение формы эмбриогенеза (два и три эмбриоида стебля), зародышевый корень часто многолопастный, направления стебля и корня могут взаимно перекрещиваться. Впоследствии соблюдается физиологический градиент — корнестеблевая полярность.

Гистохимически в зонах роста уже на ранних стадиях выявляется накопление белков. Белки являются коллоидными телами сложной природы, содержащие азот, серу, углерод, водород, кислород. С бромфеноловым синим реагируют все белки и большинство свободных аминокислот. В исследованиях отмечали два типа накопления красителя — очаговый и сплошной.

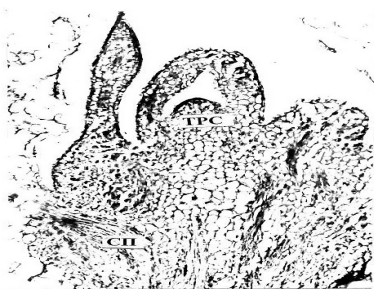


Рис. 2. Закладка сосудистых пучков, точки роста стебля, листьев

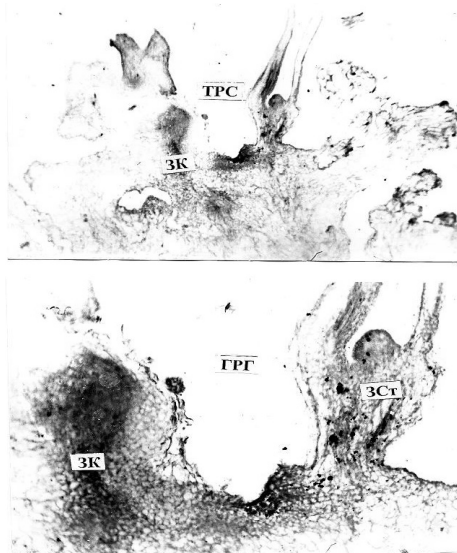


Рис. 3. Гемморизогенез. Образование регенеранта

В рыхлых каллусах белки концентрировались в отдельных участках, особенно в зонах роста, в других — вся поверхность каллуса давала резко положительную реакцию на белок, что свидетельствовало о высокой ростовой активности в этих зонах.

0,1% краситель тионин, тиазинный ядерный краситель, при pH 5,0 окрашивает суммарно нуклеиновые кислоты, особенно в зонах активного роста клеток, так как и ДНК и РНК участвуют в важных процессах жизнедеятельности клеток, особенно в структурах хромосом и синтезе белка.

Углеводы растительных тканей делятся на три основные группы: моносахариды, дисахариды и полисахариды. Нерастворимые полисахариды содержатся в стенках клеток — это пектины и клетчатка. Таким образом, полисахаридные комплексы определяют структуру каллуса. Окрашивание реактивом Шиффа и крезильовым фиолетовым дополняют друг друга и позволяют следить за развитием каллуса.

Применение анатомических и гистохимических методов дает возможность более детально разобраться в структурах исследуемой ткани, понять и правильно оценить ее структурную сложность.

### **Вывод**

В исследованиях изучалась структура андроклинового каллуса, возникшего в результате непрямого андрогенеза *in vitro*, гистологические и гистохимические особенности этапов его развития. Наблюдались явления эмбриогенеза, ризогенеза, геммогенеза и гемморизогенеза (одновременное образование почки и корешка). Последнее и дает начало жизнеспособным проросткам риза.

## Литература

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

## Резюме

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

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

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

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

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

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

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