

* Автори щиро вдячні завідувачу лабораторії стереохімії Інституту хімічної фізики ім. М.М. Семенова РАН д.х.н., проф. Р.Г. Костяновському за люб'язно надані хіральні стереоізомери нітрозометилвторбутилсечовини для досліджень згідно з договором про творчу співпрацю.

Література

1. FAO/IAEA Mutant Variety Database. – Режим доступу: <http://mvgs.iaea.org>.
2. Моргун В.В. Досягнення інституту фізіології рослин і генетики НАН України (до 65-ї річниці від дня заснування) // Физиология и биохимия культ. растений. – 2011. – 43, №3. – С. 187–211.
3. Hiroyoshi Omokawa, Jae Hwan Ryou. Enantioselective Response of Rice and Barnyard Millet on Root Growth Inhibition by Optically Active α -Methylbenzyl Phenylureas // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2001. – 70, №1. – Р. 1–6.
4. Hisahiro Kojima, Takako Numata, Ryota Tadaki, Hiroyoshi Omokawa. PCR-based suppression subtractive hybridization analyses of enantioselective gene expression in root tips of wheat treated with optically active urea compounds // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2010. – 98, №3. – Р. 359-369.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк. 1990. – 352 с.
6. Мальченко В.В., Гуляев Г.В., Хотяновская Е.Б. Экспериментальный мутагенез озимой пшеницы. Действие химических мутагенов на M_1 и частота мутаций в M_2 // Генетика. – 1976. – Vol. 12, №2. – С. 25–35.
7. Моргун В.В., Логвиненко В.Ф. Мутационная селекция пшеницы. – Киев: Наук. думка, 1995. – 628 с.
8. Оксьом В.П. Вплив мутагенних чинників на рослини M_1 озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – 42, №2. – С. 153–162.

KATERYNCHUK A.M., CHUGUNKOVA T.V.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: katerynchuks@mail.ru*

OPTIMAL DOSE CHIRAL MUTAGENS IN INDUCING VISIBLE MUTATIONS ON WINTER WHEAT

Aim. In order to expand the class of mutagens that would allow to obtain new mutant forms of crops, we investigated the optimal dose of chiral nitrosoalkylureas on winter wheat for the first time. **Methods.** We used standard methods of processing seed mutagens, field and laboratory methods for the analysis of plants in the generation of M_1 – M_3 , methods of statistical analysis. **Results.** The greatest number of mutations in both varieties was induced by the action of S (+) stereoisomer at a concentration of 0,05 %. The frequency of visible mutations in variety Federer ranged from 3,2 % to 9 %, in a variety of Kyrene – from 5 % to 12,6 %. **Conclusions.** As a result, the effect of chiral stereoisomers on winter wheat was studied. Found that stereoisomers R(-) and S(+) nitroso-*sec*-butyl-methylureas cause significant mutant changes in the varieties of wheat. The optimal and semi-lethal doses of chiral stereoisomers S(+)-NMsBU and R(-)-NMsBU for winter wheat seeds were first determined.

Key words: chiral nitrosoalkylureas, mutation frequency, optimal dose, common winter wheat.

КОВАЛЕВА Л.В., ЗАХАРОВА Е.В., ТИМОФЕЕВА Г.В., УСТИНОВА А.В., РАКИТИН В.Ю.

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
Россия, 127273, г. Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru*

ЭТИЛЕН В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПОДОТВОРЕНИЯ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В настоящее время накапливается все больше данных об участии этилена в регуляции репродуктивного процесса растений [1]. Показано, что трансгенные растения петунии со сниженной экспрессией гена PhEIN2 проявляли низкую чувствительность к этилену при старении цветков и созревании плодов, а сверхэкспрессия в трансгенных растениях табака гена Cm-

ETR1/H69A или Cm-ERS1/H70A индуцировала стерильность пыльцы или снижала ее фертильность [2]. Анализ профиля глобальной экспрессии генов в развивающемся пыльнике риса выявил наличие синтеза и сигналинга этилена в микроспорах, пыльцевых зернах и тапетуме, в частности выявил экспрессию АЦК-синтазы6(ACS6), АЦК-оксидазы2(ACO2) и

АЦК-оксидазы³ (АСОЗ) на последних стадиях развития пыльцевого зерна [3]. Исследования, проведенные на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, предполагают, что индуцированное опылением образование и выделение этилена тканями пестика необходимо для роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения [4–6]. Однако вопрос о физиологической роли этилена в гаметофитно-спорофитных взаимодействиях в прогамной фазе оплодотворения как при нормальном развитии репродуктивного процесса, так

Материалы и методы

Растительный материал. Вегетативно размноженные растения двух фертильных (самосовместимого и самонесовместимого) и стерильного клонов петунии (*Petunia hybrida* L.) выращивали в почвенной культуре при естественном освещении.

Самонесовместимый клон характеризуется тем, что при самоопылении его пыльца прорастает на рыльце, но рост пыльцевых трубок останавливается в проводниковых тканях столбика вследствие гаметофитной самонесовместимости. У стерильного клона микроспорогенез останавливается на стадии мейоза [7].

Стадии развития микроспор и пыльцевых зерен в развивающихся пыльниках определяли в соответствии с общепринятой классификацией. Пыльники окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33258. Для определения каждой стадии использовали пыльники из 15 бутонов. Препараты анализировали под микроскопом Axio Imedger D1.

Обработку побегов с бутонами и прорастающую на среде культивирования пыльцу NBD проводили в 5-литровых стеклянных камерах при температуре 26°C и 16-часовом фотоперио-

Результаты и обсуждение

Образование этилена исследовали на девяти стадиях развития пыльника: стадия материнских клеток пыльцы, археспорий (А), мейоз (Ме), тетрады (Т), ранние микроспоры (РМ), поздние микроспоры (ПМ), митоз (Ми), ранние пыльцевые зерна (РПЗ), средние пыльцевые зерна (СПЗ), поздние пыльцевые зерна (ППЗ). Стадии определяли по экспериментально выявленной корреляции между длиной бутона и стадией развития мужского гаметофита [7].

Развитие мужской гаметофитной генерации – пыльцы полностью зависит от спорофитных тканей стенки пыльника, в котором осуществляется микроспорогенез, образуются и созревают пыльцевые зерна. Результаты настоящей

при наличии генетически детерминированных барьеров самооплодотворения, еще далек от своего решения.

Цель данной работы составило изучение образования и действия этилена в развивающихся пыльниках самосовместимого, стерильного и самонесовместимого клонов петунии, а также в *in vitro* прорастающем мужском гаметофите (на среде культивирования) и *in vivo* в системе пыльца-пестик.

де с интенсивностью освещения люминисцентными лампами ЛБ-8000 люкс. Ежедневные наблюдения за состоянием генеративных клеток в пыльниках, обработанных этиленом и NBD, проводили на Hoechst-окрашенных срезах с помощью микроскопа Axio Imedger D1.

Питательная среда для культивирования пыльцы включала 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ борную кислоту. О степени прорастания судили по количеству проросших пыльцевых зерен, произвольно отобранных и наблюдаемых в четырех полях микроскопа (n=200). Длину пыльцевых трубок определяли с помощью микроскопа Axio Imedger D1 с камерой Axio Cam MRc. Измерения выполняли в программе Axio Vizion 4.5.

Выделение этилена определяли на газовом хроматографе с пламенно ионизационным детектором и концентрирующей системой для углеводородов [8].

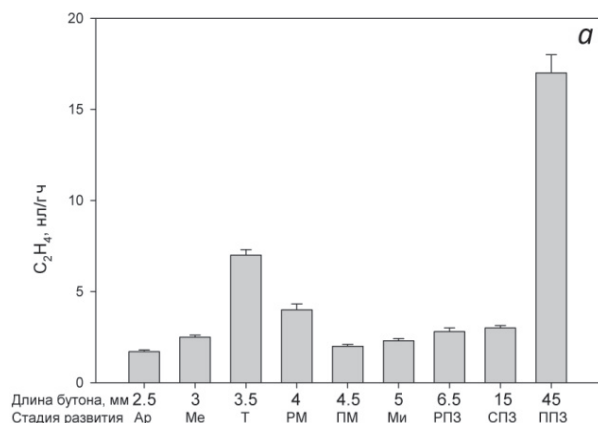
Статистическая обработка данных. Опыты проводили в трех-пяти биологических повторностях. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при степени свободы 0.05. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки.

работы показали, что этилен необходим для ранних стадий микроспорогенеза. Развитие мужского гаметофита у фертильных клонов (самосовместимого и самонесовместимого) сопровождалось двумя периодами повышения образования этилена в тканях пыльника: первый происходил во время развития микроспор, второй – при созревании пыльцевых зерен (рис. 1, а). Динамика выделения этилена у обоих клонов была идентична.

Развитие микроспоры – наиболее длительный этап формирования пыльцевого зерна, в ходе которого микроспоры и стенка пыльника подвергаются структурным и функциональным изменениям. Разрушение тапетума происходило

по мере созревания микроспор и завершалось к моменту образования двуядерной пыльцы [7]. Полное разрушение тапетума происходило перед стадией РПЗ. Трехкратное повышение выделения этилена пыльниками, сопровождавшее развитие микроспор на стадии Т, по-видимому, и было причиной разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника. Для подтверждения этого предположения исследовали влияние различных концентраций ингибитора действия этилена NBD (500, 2000, 6000 мкл/л) на состояние пыльников в бутонах самосовместимого клона. Обработка бутонов петунии фертильного клона ингибитором синтеза этилена NBD на ранней стадии развития (до инициации Me) привела к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита и подтвердила это предположение.

Финальным этапом созревания пыльцы, без которого она практически утрачивает способность к прорастанию, является дегидратация пыльцы. Созревание и дегидратация пыльцевых зерен (стадия ППЗ) сопровождались значительным повышением содержания АЦК и выделения этилена (рис. 1, а). Повышение содержания АЦК в пыльниках на этой стадии сопряжено с ее накоплением в созревающих пыльцевых зернах. Значительное увеличение образования и, следовательно, содержания этилена, очевидно, запус-



кает в стенке пыльника механизмы программируемой клеточной смерти (ПКС), которая является частью нормального развития флоральных органов, включая завершающие стадии развития пыльника, приводящие к его растрескиванию и высвобождению пыльцы. Обработка бутонов петунии самосовместимого клона NBD в концентрации 6000 мкл/л предотвращала растрескивание пыльников.

У стерильного клона, разрушение тканей тапетума наблюдали очень рано, уже в профазе Me, одновременно с нарушениями в развитии спорогенной ткани. Гибель мужского гаметофита у стерильного клона происходила в профазе мейоза вследствие преждевременного разрушения тапетума. Гибель микроспороцитов сопровождалась плазмолизом тапетальных клеток. Гибель микроспороцитов и дегенерация клеток тапетума сопровождалась высоким уровнем выделения этилена на стадии материнских клеток пыльцы (рис. 1, б).

Высокие концентрации этилена (1–100 мкл/л) вызывали деградацию и гибель мужских генеративных клеток, находящихся в момент обработки на ранних стадиях развития, от начала Me до выхода микроспор из тетрад, так же, как это происходило при высоком уровне выделения и, следовательно, содержания эндогенного этилена у стерильного клона.

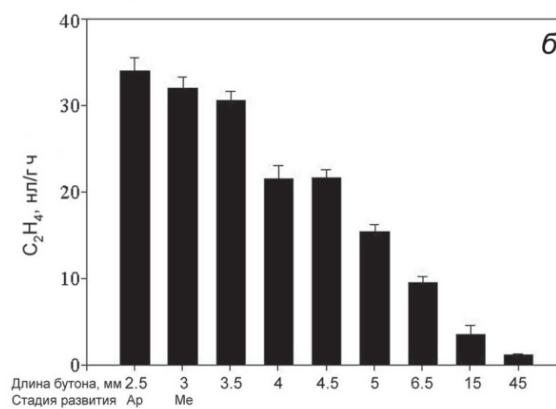


Рис. 1. Динамика и выделения этилена в развивающихся пыльниках петунии самосовместимого (а) и стерильного (б) клонов

Прорастающая *in vitro* пыльца практически сразу же после начала культивирования интенсивно выделяла этилен (рис. 2), возможно, за счет аккумулированной в пыльцевых зернах АЦК.

Ранее было показано, что опыление вызывает усиление выделения этилена тканями пестика [4–6]. В этой работе исследовали динамику выделения этилена после самоопыления самосовместимого и самонесовместимого клонов.

Полученные результаты свидетельствуют, что синтез этилена сопровождается прорастанием и ростом совместимых и несовместимых пыльцевых трубок в тканях пестика. Рыльце является основным местом синтеза этилена после обоих типов опыления. Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок после самонесовместимого опыления сопровождалось в 3 раза большим образованием этилена в системе мужской гаметофит – пестик, чем при самосовместимом опылении

(рис. 3). Полагаем, что этилен контролирует рост пыльцевых трубок, при этом повышенный уровень этилена связан с функционированием механизма гаметофитной самонесовместимости,

одного из основных барьеров самооплодотворения, вследствие которого рост пыльцевых трубок останавливается в проводниковых тканях столбика.

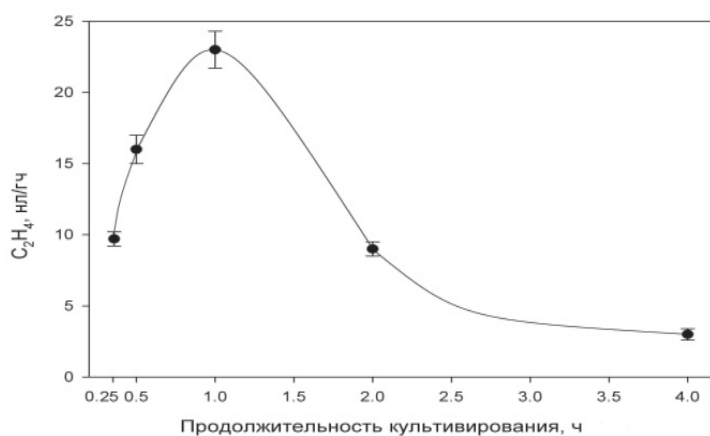


Рис. 2. Выделение этилена *in vitro* прорастающим мужским гаметофитом петунии самосовместимого клона

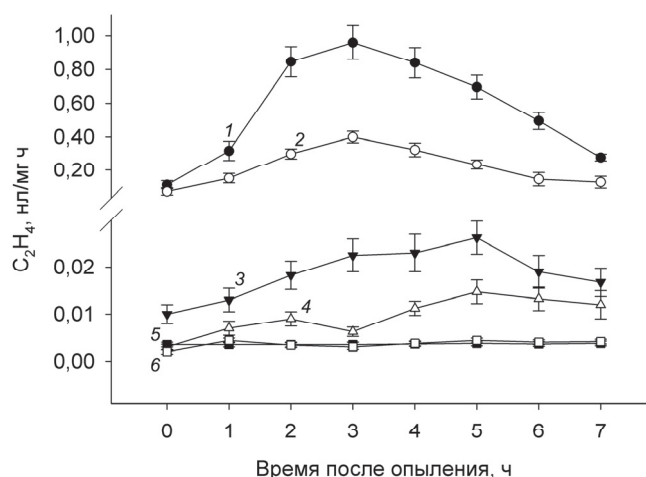


Рис. 3. Выделение этилена рыльцами (1, 2), столбиками (3, 4) и завязями (5, 6) петунии после самоопыления самосовместимого (светлые символы) и самонесовместимого (чёрные символы) клонов

Выводы

Полученные данные показали, что этилен участвует в регуляции гаметофитно-спорофитных отношений на всех этапах прогамной фазы оплодотворения у петунии. Изменение этой регуляции на генетическом уровне у стерильного и самонесовместимого клонов или

экзогенным этиленом и ингибитором его действия NBD у самосовместимого клона приводили к нарушению гаметофитно-спорофитных взаимодействий и в конечном итоге к блокированию оплодотворения.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 06-04-48870 и № 10-04-00356).

Литература

1. Lin Z., Zhon S., Grierson D. Recent advances in ethylene research // J. Exp. Bot. – 2009. – V. 60. – P. 3311–3336.
1. 2.Ishimaru K., Takada K., Watanabe S. et al. Stable male sterility induced by the expression of mutated melon ethylene receptor genes in *Nicotiana tabacum* // Plant Sci. – 2006. – Vol. 3. – P. 355–359.
2. Hirano K., Aya K., Hobo T. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and

- signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice // *Plant Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 49. – P. 1429–1450.
3. Singh A., Evensen K.B., Kao T-h. Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata* // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 99. – P. 38–45.
 4. Tang X., Woodson W.R. Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 112. – P. 503–511.
 5. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. // *Sex. Plant Reprod.* – 2003. – Vol. 16. – P. 191–196.
 6. Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Ковалева Л.В. Спорофито-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник-мужской гаметофит у петунии // *Физиология растений.* – 2009. – Т. 56. – С. 437–444.
 7. Ракитин В.Ю., Ракитин Л.В. Определение газообмена и содержание этилена, двуокиси и кислорода в тканях растений // *Физиология растений.* – 1986. – Т. 33. – С. 403–413.

KOVALEVA L.V., ZAKHAROVA E.V., TIMOFEEVA G.V., USTINOVA A., RAKITIN V.Yu.

Institute of Plant Physiology RAS

Russia, 127273, Moscow, Botanicheskaya str., 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

ETHYLENE IS INVOLVED IN THE CONTROL OF GAMETOPHYTE-SPOROPHYTE INTERACTIONS AT PROGAMIC PHASE OF FERTILISATION

Aims. Physiological role of ethylene in the gametophyte-sporophyte interactions remains unknown.

Methods. The ethylene production in the course of male gametophyte development and germination, in vitro and in vivo, in petunia fertile (self-compatible and self-incompatible) and sterile clones was investigated.

Results. Fertile male gametophyte development was accompanied by two peaks of ethylene production by anther tissues during microspore development and pollen grain maturation. In sterile line, tenfold higher ethylene production was observed at the meiosis stage and correlated with degeneration of both microsporocytes and tapetum. The male gametophyte germination, both in vitro and in vivo, was accompanied by an increase in ethylene production. The male gametophyte germination after self-incompatible pollination was accompanied by a higher level of ethylene production as compared to compatible pollination. **Conclusions.** These results suggest that ethylene is an important factor of male gametophyte development, germination, and growth at the progamic phase of fertilization.

Key words: *Petunia hybrida*, ethylene, male gametophyte, sterility, self-incompatibility.

КОЗАЧЕНКО М.Р., СОЛОНЕЧНИЙ П.М.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН

Україна, 61060, м. Харків, пр. Московський, 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ СЕЛЕКЦІЇ НА РОЗШИРЕННЯ РІЗНОВИДНІСНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО

У Державному Реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, є сорти ячменю лише шести різновидностей: *nutans Sch?bl.*, *medicum Koern.*, *submedicum Orl.*, *pallidum Ser.*, *rikotense Regel.*, *deficiens (Steud.) Koern* [1]. Використання інших різновидностей в селекції ячменю є недостатнім.

Недостатньо досліджено і використано в селекції джерела короткоостоті, безостоті, фуркатності, голозерності, багатовузлості, якими є колекційні форми і одержані на різних сортах мутанти, а також нові сорти ячменю ярого інших різновидностей. Не досліджено селекційно-генетичні особливості та закономірності мінливості ознак таких форм ячменю. Не визначено

кореляцію між кількісними ознаками у нових форм різних різновидностей. Важливо також встановити ефективність використання нових різновиднісних джерел в селекції ячменю ярого. Вирішення вказаних задач і стало підставою для проведення досліджень етичних основ селекції на розширення різновиднісного різноманіття ячменю ярого.

Метою досліджень було встановлення морфо-біологічних і селекційно-генетичних особливостей ознак і ефективності використання рідкісних мутантних і різновиднісних форм в селекції ячменю ярого та створення на цій основі селекційно цінного вихідного матеріалу.