

О.А. СТЕЛЬМАХ, Е.А. КРАВЕЦ,
А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины,
ул.Заболотного, 148, Киев, 03143
E-mail: StelmakhOA@univ.kiev.ua

ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОГО РАЗВИТИЯ МУТАНТОВ *NICOTIANA SYLVESTRIS*, УСТОЙЧИВЫХ К ИЗОПРОПИЛ-*N*-ФЕНИЛКАРБАМАТУ



Проведен анализ мутантных растений *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к изопропил-*N*-фенилкарбамату (ИФК) — одному из веществ класса *N*-фенилкарбаматных гербицидов. Растения характеризовались полустерильностью пыльцы, обусловленной нарушениями в ходе микроспорогенеза и синтеза цитоплазмы в микроспорах. Низкая семенная продуктивность мутантов была обусловлена высокой стерильностью пыльцы и лишь отчасти — пониженной жизнеспособностью семян. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что мутации, вызывающие устойчивость к ИФК, приводят к цитогенетическим и морфологическим anomalies в развитии мужской генеративной системы, что вызывает резкое снижение семенной продуктивности мутантных растений *N. sylvestris*. Характер обнаруженных цитологических нарушений свидетельствует о возможных дефектах в организации и функционировании микротрубочек мутантных растений, что может быть связано с мутациями (мутацией) по одному или нескольким генам белков микротрубочек.

© О.А. СТЕЛЬМАХ, Е.А. КРАВЕЦ, А.И. ЕМЕЦ,
Я.Б. БЛЮМ, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2005. № 6

Введение. Известно, что *N*-фенилкарбаматы наряду с динитроанилинами и фосфоротиоамидами относятся к одним из наиболее эффективных соединений, разрушающих микротрубочки растений [1–4]. Однако неоднократно было отмечено, что в отличие от двух других упомянутых групп соединений *N*-фенилкарбаматы не только разрушают микротрубочки в делящихся и интерфазных клетках растений [2, 3], но и необратимо разрушают центры организации микротрубочек (ЦОМТ) [1, 3]. Именно следствием этих первичных эффектов является нарушение ориентации микротрубочек [3], геометрии митотического веретена и плоскости деления клеток [1], а также появление миниполюсов, двухъядерных и полиплоидных клеток, нарушение цитокинеза [3], что, в конечном счете, приводит к аномальной пролиферации клеток и нарушениям морфогенеза растений [2, 4–6].

Однозначно установлено, что *N*-фенилкарбаматы высокоспецифическим образом связываются с β -тубулином растений [5]. Однако высокое сродство к тубулину далеко не всегда может быть использовано в качестве исчерпывающего ответа на вопрос о главных клеточных мишенях для реализации действия этих соединений. Множественные эффекты *N*-фенилкарбаматов на уровне цитоскелета растений, перечисленные выше, могут быть следствием их взаимодействия с другими белками.

Более исчерпывающий вывод можно было бы сделать при получении мутантов растений, устойчивых к *N*-фенилкарбаматам, и их последующем изучении. Впервые мутанты *Nicotiana tabacum*, устойчивые к изопропил-*N*-фенилкарбамату (ИФК), были получены достаточно давно [7], однако для их получения не использовались никакие мутагенные факторы. Поэтому впоследствии нами были получены мутанты *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris* с использованием γ -облучения в качестве индуктора мутагенеза [6, 8]. Наряду с устойчивостью к нарушениям митотического цикла под действием *N*-фенилкарбаматов [6] они характеризовались, как и в случае мутантов *N. tabacum* [7], нарушениями репродуктивного цикла [6, 8]. Именно поэтому в задачи нашей работы входило исследование особенностей репродуктивного развития и фертильности ранее полученных мутантов *N. sylvestris*, устойчивых к ИФК.

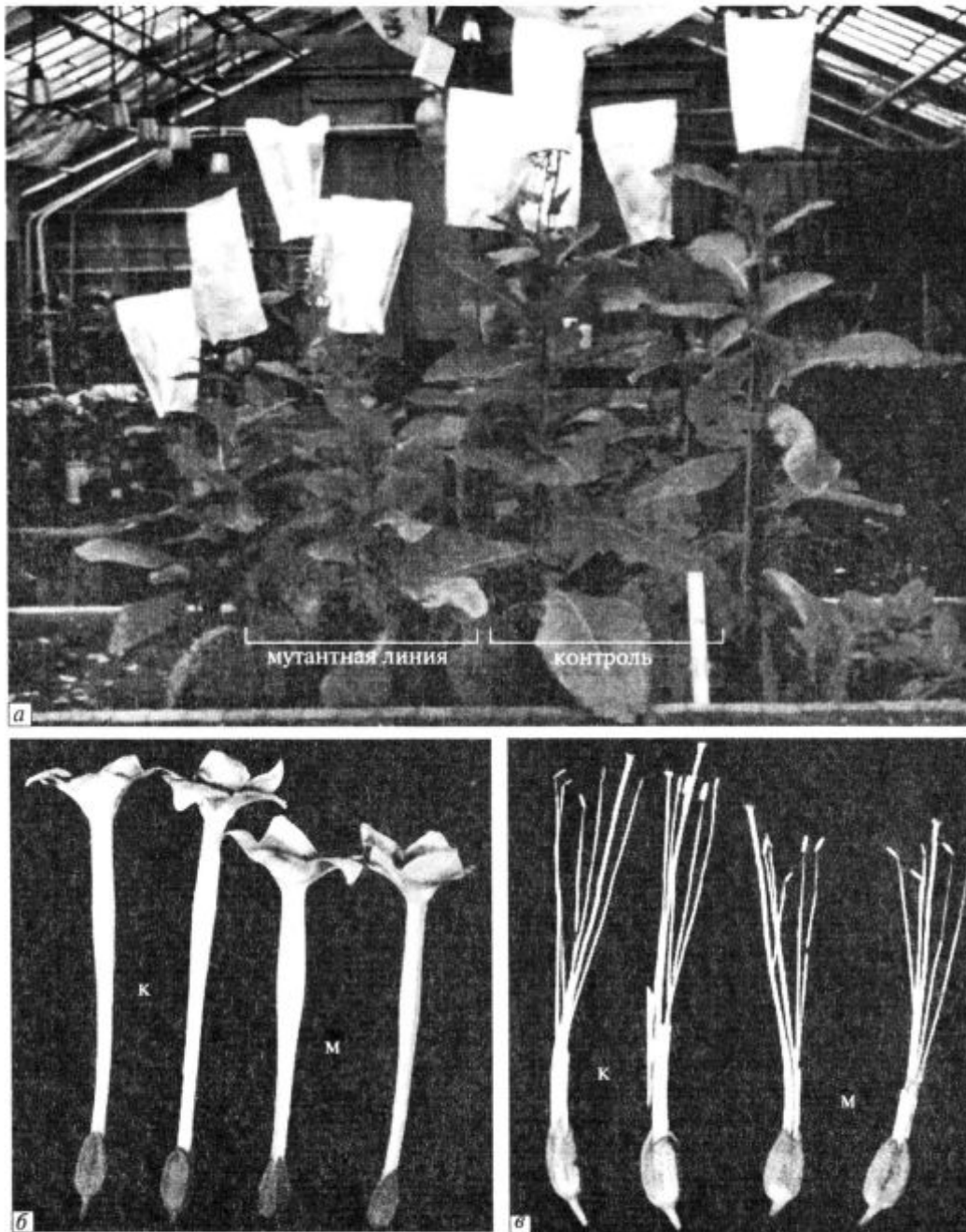


Рис. 1. Морфологическая характеристика растений *N. sylvestris* контрольной и мутантной линий: а — общий вид растений; б — внешний вид цветков контрольной (к) и мутантной (м) линий *N. sylvestris*; в — генеративные структуры цветков контрольной (к) и мутантной (м) линий *N. sylvestris*

Материалы и методы. В работе исследовали устойчивую к 30 мкМ ИФК линию *Nicotiana sylvestris*, полученную ранее путем селекции *in vitro* с использованием γ -облучения [6, 8]. Мутантные и контрольные растения, регенерированные в условиях *in vitro*, переносили в закры-

тый грунт, где их выращивали в летне-осенний период при естественных условиях освещения и температуры. На стадии полного формирования соцветий перед началом цветения растений проводили их принудительное само- и перекрестное опыление с предварительной

изоляция цветков. Для анализа использовали по 20—30 цветков от 15—20 растений. Бутоны и пыльники фиксировали по методу Карнуа (этиловый спирт : хлороформ : ледяная уксусная кислота в соотношении 6 : 3 : 1), семяпочки и завязи — по методу Бродского (формалин : этиловый спирт : ледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1 : 0,3) в течение 6 ч [9]. После промывки материал сохраняли в 70%-ном этаноле.

Для изучения микроспорогенеза и гаметогенеза получали временные препараты пыльников, окрашенных ацетокармином. Всего было проанализировано 506 микроспороцитов и 1939 микроспор контроля, а также 300 микроспороцитов и 1049 микроспор мутанта. Кроме того, на развитие спорогенной ткани как контрольных, так и мутантных растений в осенний сезон 2002 г. оказывали влияние низкие положительные температуры выращивания. Количество пыльцевых зерен при установлении жизнеспособности пыльцы составило 2500 зерен у контроля и 2610 зерен у мутанта. Показатели развития гинецея изучали через три недели после опыления. Семяпочки окрашивали ацетоорсеином, препарировали и раздавливали в капле 45%-ной уксусной кислоты. При необходимости для мацерации тканей семяпочек использовали обработку ферментами (1%-ная целлюлаза и 0,5%-ная пектиназа) в течение 1 ч. Морфометрический анализ и микрофото съемку проводили на микроскопе «Jenaval» («Carl Zeiss», Германия) при увеличении 40×.

Жизнеспособность семян контрольной и мутантной линий, полученных от само- и перекрестного опылений, определяли путем проращивания семян на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри при комнатной

температуре на свету. Перед высаживанием семена стерилизовали в 70%-ном этаноле и 10%-ном растворе «Белизны». Для стимуляции прорастания семена обрабатывали 2%-ным раствором KNO_3 , содержащим 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. Всхожесть семян, длину проростков и сырой вес фитомассы определяли на 8-е сутки. Полученные результаты статистически обрабатывали [10, 11].

Результаты исследований и их обсуждение. Растения *N. sylvestris* контрольных и мутантных линий, выросшие в условиях закрытого грунта, характеризовались большой разветвленностью и имели варьирующую высоту $127,80 \pm 12,08$ см у контроля и $103,60 \pm 9,81$ см у мутанта (рис. 1, а). В целом мутантные и контрольные растения не проявляли существенных морфологических отличий, хотя для первых была характерной определенная депрессия, выраженная в уменьшении габитуса и размеров вегетативных и генеративных органов (табл. 1 и рис. 1).

Изучение репродуктивных органов как контрольных, так и мутантных растений *N. sylvestris* показало, что их строение было типичным для этого вида. В обоих случаях цветки были обоеполыми, трубчатыми, пятичленными, имели сложный околоцветник. У мутантных растений цветок по размерам, а именно по длине трубки венчика, несколько уступал контролю (рис. 1, б). Соответственно, тычиночные нити и пестик у мутанта были короче, чем у исходных растений (табл. 1 и рис. 1, в). Для мужской генеративной системы контрольных и мутантных растений общей чертой являлось наличие пяти тычинок (четыре более длинные, а одна короче) (рис. 1, в). Удлиненные нити тычинок в узкой части трубки были сращены с венчиком. В моло-

Таблица 1
Морфологические показатели развития репродуктивных органов у растений *Nicotiana sylvestris* ($M \pm m$)

Растительная линия	Высота растения, см ²	Площадь листа, см ²	Длина венчика, см ²	Высота пестика, см ²	Длина тычинок, см ²	Длина пыльника, см ²
Контроль	$127,80 \pm 12,08$	$155,08 \pm 6,33$	$8,66 \pm 0,39$	$8,15 \pm 0,09$	$8,03 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,01$
Мутант	$103,60 \pm 9,81^*$	$80,15 \pm 6,43^*$	$7,43 \pm 0,15^*$	$7,01 \pm 0,02^*$	$6,53 \pm 0,15^*$	$0,38 \pm 0,01$

* Здесь и в табл. 2—6: отличия между чувствительными и устойчивыми растениями статистически достоверны при $P < 0,05$.

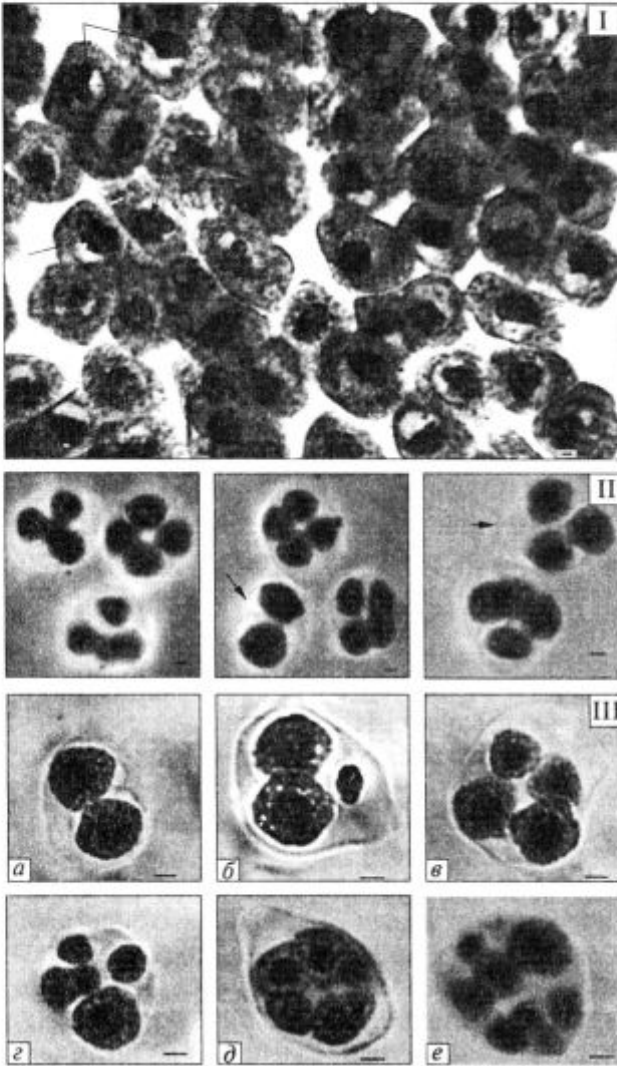


Рис. 2. Микроспорогенез в пыльниках контрольных (I, II) и мутантных (III) растений *N. sylvestris*: I — стадия зиготены (синапсиса) профазы I мейоза (указана стрелками) (масштаб 0,001 мм); II — стадия поздних тетрад (указаны стрелками триады и диады) (масштаб 0,003 мм); III — нарушения микроспорогенеза на стадии поздних тетрад в пыльниках мутантных растений: а — диада, б — триада, в — атипичная тетрада, г — пентада, д — гексада, е — семиспоровая полиада (масштаб 0,005 мм)

дом цветке тычинки были короче пестика, однако впоследствии тычиночные нити удлинялись и дорастали до рыльца пестика, обеспечивая автогамию (самоопыление), что, однако, не исключает возможности перекрестного опыления.

Известно, что пыльники у видов рода *Nicotiana*, как и в случае других пасленовых, являются четырехгнездными. Сформированная стенка пыльника состоит из эпидермиса, фиброзного слоя, двух средних и тапетального слоев. Тапетум принадлежит к секреторному типу, его зрелые клетки являются двухъядерными, а стенка пыльника вскрывается путем образования продольной трещины [12]. Было обнаружено, что у мутантных растений *N. sylvestris* размеры пыльников часто варьировали, но в большинстве случаев обладали нормально развитой пятислойной стенкой. В то же время у некоторых пыльников наблюдались трофические изменения тапетальной ткани — вакуолизация цитоплазмы, образование микроядер и пикноз ядер.

При изучении микроспорогенеза, проходящего по симультанному типу, было показано, что у контрольных растений, несмотря на незначительные нарушения в предмейотической интерфазе, в результате мейоза образовывались правильные тетрады (у $88,54 \pm 1,4$ % микроспороцитов), характеризующиеся тетраэдрическим или изобилатеральным взаиморасположением (рис. 2, II). При этом иногда наблюдалась некоторая асинхронность деления — $5,34 \pm 0,99$ % микроспороцитов отставали в развитии, оставаясь на двухъядерной стадии, а также и аномалии — около $6,13 \pm 1,07$ % микроспороцитов содержали нечетное число микроспор или дегенерирующие ядра (табл. 2 и рис. 2, II).

Обнаружено, что у мутантных растений в предмейотической интерфазе часть спорогенной ткани подвергалась деструктивному цитомиксису с агглютинацией хроматина в ядрах части микроспороцитов. В результате микроспорогенеза у мутантов образовывались микроспоры различного размера (гигантские, средние и карликовые — $15,05 \pm 0,06$; $7,50 \pm 0,23$; $5,15 \pm 0,13$ мкм соответственно), а также с нарушенной структурой, в результате чего появлялись диады, триады и полиады (табл. 2, 3 и рис. 2, III). Варьирование размеров и числа микроспор в тетрадах указывает на нарушения в расхождении хромосом в ходе 1-го и 2-го делений, выпадение второго деления в одной (в случае триад) или обеих диадах, формирование многополюсного веретена (в полиадах).

Как известно, формирование пыльцевого зерна у видов *Nicotiana* происходит в ходе одного митотического деления, после обособления микроспор из тетрад [12]. При этом микроспоры округляются, вакуолизируются и увеличиваются в размерах. В результате асимметричного деления возникают две разные в морфо-функциональном отношении клетки — вегетативная и генеративная. Вегетативная клетка содержит крупное лопастное тонкоструктурированное ядро с ядрышком. Генеративная клетка имеет овальную или веретеновидную форму, с крупным структурированным ядром (ядрышко в нем не визуализируется) и небольшим количеством цитоплазмы. Зрелая пыльца у *N. sylvestris* является двухклеточной, трехпоровой, обладает отчетливо выраженной экзиной и интиной. Цитоплазма пыльцевых зерен содержит крахмал и жировые включения [12].

У исходных растений пыльцевые зерна характеризовались высоким уровнем фертильности ($97,12 \pm 0,33\%$), однородностью и синхронностью развития. Размеры фертильного пыльцевого зерна в диаметре составляли в среднем $30,23 \pm 0,01$ мкм (рис. 3, а). У мутантных растений после распада тетрад генетически несбалансированные микроспоры оказывались неспособными к дальнейшему развитию. Большая часть таких микроспор останавливалась в развитии, в них не происходил синтез

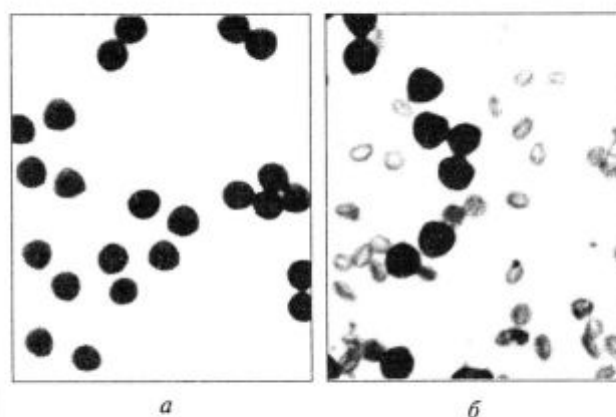


Рис. 3. Зрелые пыльцевые зерна у контрольной (а) и мутантной (б) линий *N. sylvestris* (фертильные пыльцевые зерна — окрашенные, стерильные пыльцевые зерна — неокрашенные)

цитоплазмы (табл. 3). Поэтому лишь $14,73 \pm 1,09\%$ образующихся микроспор приступали к делению с образованием вегетативной и генеративной клеток. При этом общее количество пыльцы в пыльниках мутантных растений было снижено. Около $2,88 \pm 0,33\%$ двухклеточных пыльцевых зерен вакуолизируются и останавливаются в развитии. В то же время зрелая пыльца мутанта была морфологически и функционально неоднородной (рис. 3, б). Уровень ее фертильности в разных цветках колебался и в среднем составлял $15,49 \pm 0,71\%$ (табл. 3). Общее количество пыльцы в пыль-

Таблица 2

Средняя частота нормальных и дефектных тетрад микроспор у контрольной и мутантной линий *Nicotiana sylvestris*

Растительная линия	Тетрады, %		Диады, %	Триады, %	Полиады, %		
	нормальные равновеликие	атипичные разновеликие			пятиспоровые	шестиспоровые	семиспоровые
Контроль	$88,54 \pm 1,42$	—	$5,34 \pm 0,99$	$6,13 \pm 1,07$	—	—	—
Мутант	$13,33 \pm 1,96^*$	$36,33 \pm 2,78^*$	$5,33 \pm 2,08^*$	$18,04 \pm 2,22^*$	$11,66 \pm 1,85^*$	$5,00 \pm 1,26^*$	$0,66 \pm 0,47^*$

Таблица 3

Нарушения микроспорогенеза и фертильности пыльцы у контрольной и мутантной линий *Nicotiana sylvestris*

Растительная линия	Размеры микроспор, мкм			Микроспоры, %		Фертильность пыльцы, %
	карликовые	средние	гигантские	развитые	неразвитые	
Контроль	—	$8,01 \pm 0,11$	$15,05 \pm 0,06$	$96,54 \pm 0,42$	$3,46 \pm 0,42$	$97,12 \pm 0,33$
Мутант	$5,15 \pm 0,13$	$7,50 \pm 0,23$	$15,05 \pm 0,06$	$14,73 \pm 1,09^*$	$85,27 \pm 1,09^*$	$15,49 \pm 0,71^*$

никах мутантных растений было сниженным. Стерильные пыльцевые зерна были мелкими, неокрашенными либо слабо окрашенными (рис. 3, б). Для них было характерным наличие меньшего количества цитоплазмы по сравнению с пыльцевыми зернами исходных растений, что, по-видимому, являлось следствием нарушения либо полного подавления синтеза цитоплазмы вегетативной клетки пыльцевых зерен. Из запасных веществ цитоплазма стерильной пыльцы иногда содержала небольшое количество жиров. Размер стерильных пыльцевых зерен составлял $15,35 \pm 0,01$ мкм (табл. 4).

Таким образом, в ходе исследования особенностей микроспорогенеза мутантов были обнаружены следующие аномалии: нарушения структурно-функционального состояния тапетальной ткани стенки пыльника, влияющие на трофику спорогенной ткани, микроспорозитов и микроспор; деструктивный цитомиксис; нарушения расхождения хромосом в ходе 1-го и 2-го мейотических делений и формирование генетически несбалансированных микроспор; выпадение второго деления в одной

или обеих диадах; формирование многополюсного веретена и образование полиад.

Перечисленные аномалии микроспорогенеза могут быть обусловлены особенностями генетической конституции мутанта. В свою очередь анеугенный характер большинства аномалий (нарушения формирования веретена деления и его ориентации в ходе мейоза) также может свидетельствовать о дефектах в организации и функционировании микротрубочек в генеративных клетках мутантной линии *N. sylvestris*. Поскольку на последующих стадиях большинство микроспор останавливались в развитии, высокая стерильность пыльцы, по-видимому, связана с нарушениями микроспорогенеза, а также с причинами трофического характера (на что указывают и аномалии развития тапетума стенки пыльника). Стерильность пыльцы в постмейотический период, обусловленная нарушением синтеза цитоплазмы в вегетативных клетках пыльцевых зерен, у мутантов выражена незначительно.

Дальнейший анализ женской генеративной системы контрольных и мутантных растений *N. sylvestris* позволил также обнаружить неко-

Таблица 4

Показатели стерильности генеративной системы у *Nicotiana sylvestris*

Растительная линия	Размеры пыльцевых зерен, мкм		Стерильность пыльцы, %	Неразвитые семечки, %
	фертильные	стерильные		
Контроль	$30,23 \pm 0,01$	$15,40 \pm 0,01$	$2,88 \pm 0,33$	$2,96 \pm 1,54$
Мутант	$30,19 \pm 0,01$	$15,35 \pm 0,01$	$84,51 \pm 0,71^*$	$86,04 \pm 3,16^*$

Таблица 5

Показатели развития гинцея у растений *Nicotiana sylvestris*

Комбинация скрещивания	Количество исследованных завязей, шт.	Объем завязи, мм ³	Количество исследованных семечек, шт.	Длина семечки, мм	Стадия развития зародыша	Длина зародыша, мм	Развитые семечки, %
Контроль самоопыленный	30	$135,82 \pm 6,31$	120	$0,75 \pm 0,01$	Торпедовидная	$0,53 \pm 0,01$	$97,04 \pm 1,54$
Контроль, опыленный мутантом	30	$100,15 \pm 6,45$	120	$0,71 \pm 0,01$	Сердцевидная	$0,50 \pm 0,01$	$89,65 \pm 1,32$
Мутант самоопыленный	30	$61,29 \pm 6,62^*$	120	$0,64 \pm 0,02^*$	Глобулярная	$0,13 \pm 0,01^*$	$13,96 \pm 3,16^*$
Мутант, опыленный контролем	30	$82,23 \pm 6,33^*$	120	$0,66 \pm 0,02^*$	Глобулярно-сердцевидная	$0,15 \pm 0,01^*$	$21,17 \pm 3,05^*$

торые нарушения ее развития у мутантов. Контрольные растения характеризовались наличием двухгнездной с центральной колонкой завязи, к которой прикреплялось множество семяпочек (лизикарпный гинецей с колончатой плацентацией) [13]. Семяпочка характеризовалась анатропным строением и наличием многослойного интегумента и эндотелия, а ее центральная часть была заполнена зародышевым мешком. Для зародышевого мешка *Polygonum*-типа развития (что характерно для всех видов рода *Nicotiana*) типичным было наличие трехклеточного яйцевого аппарата, двухъядерной центральной клетки и трех антипод [12, 14].

Известно, что для обеспечения оплодотворения всех семяпочек завязи и семенной репродукции у табака на рыльце пестика должно прорасти 1,5–2 тысячи фертильных пыльцевых зерен, что возможно лишь при условии высокого уровня фертильности пыльцы [12]. При успешном опылении и оплодотворении быстрое развитие эндосперма и зародыша должно приводить к появлению полностью дифференцированного зародыша на 10-е сутки после опыления. В ходе развития зародыша происходит поглощение ткани нуцеллуса, интегумента и самого эндосперма, поэтому зрелое семя табака состоит из развитого зародыша, занимающего большую часть объема семени, нескольких слоев эндосперма и семенной кожуры, состоящей из остатков эндотелия и интегумента [14].

Результаты исследований женской генеративной системы как у перекрестно-, так и у самоопыленных мутантных растений *N. sylvestris* позволили установить, что развитие завязи по размерам у мутантов примерно в 1,5–2 раза уступало контролю (табл. 5 и рис. 4). Отставание в росте обуславливалось сохранением в

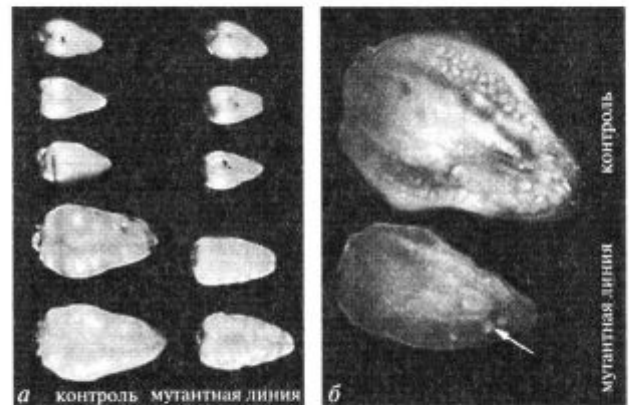


Рис. 4. Завязи контрольных и мутантных линий *N. sylvestris*: а — целые завязи (0–4 нед после опыления), б — в продольном разрезе (3 нед после опыления) (стрелкой указаны оплодотворенные семяпочки мутанта)

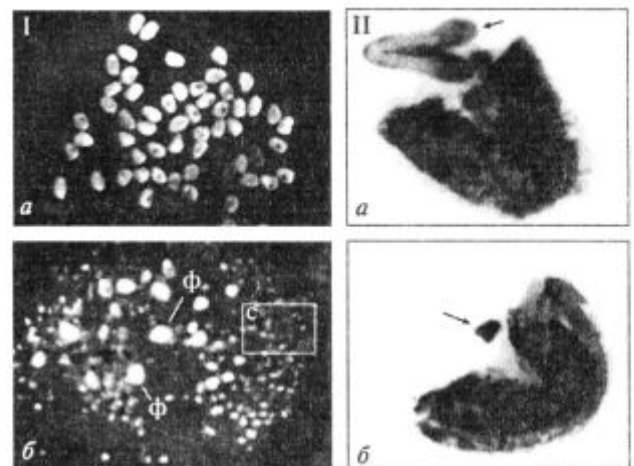


Рис. 5. Семяпочки контрольной (а) и мутантной (б) линии *N. sylvestris* (3 нед после опыления): I — общий вид семяпочек (ф — фертильные, с — стерильные); II — препарированные семяпочки; зародыши указаны стрелками

Таблица 6

Масса и качество прорастания семян контрольной и мутантной линий *Nicotiana sylvestris*

Растительная линия	Количество семян, шт.	Масса 1000 шт. семян, г	Длина проростков, мм (8 сут)	Сырой вес фитомассы, мг (8 сут)	Всхожесть семян, % (8 сут)
Контроль самоопыленный	1000	0,04	2,59 ± 0,30	160	71,50 ± 4,50
Контроль, опыленный мутантом	1000	0,05	2,89 ± 0,23	153	67,89 ± 4,34
Мутант самоопыленный	1000	0,08	4,28 ± 1,25*	265	88,00 ± 6,00*
Мутант, опыленный контролем	1000	0,08	4,11 ± 0,29*	260	89,34 ± 5,43*

завязи большого числа неоплодотворенных семязпочек — около $86,04 \pm 3,16$ % (при самоопылении) и $78,83 \pm 3,05$ % (при перекрестном опылении) (табл. 5 и рис. 4, б). Количество оплодотворенных семязпочек коррелировало с уровнем фертильности пыльцы, составляя в среднем около $13,96 \pm 3,16$ % при самоопылении. При опылении мутанта пыльцой контрольных растений число оплодотворенных семязпочек возрастало до $21,17 \pm 3,05$ %. Следовательно, низкая семенная продуктивность мутантов во многом была обусловлена отсутствием оплодотворения вследствие высокой стерильности пыльцы.

Различия оплодотворенных семязпочек мутантов по размерам (рис. 5, I, б) свидетельствует об их неоднородности и асинхронности развития в отличие от однородных семязпочек исходных растений *N. sylvestris* (рис. 5, I, а). Препарирование семязпочек позволило установить, что в случае оплодотворения темпы развития зародышей у мутанта либо отставали от зародышей в контроле, либо развитие эмбриона мутанта прерывалось на ранней глобулярной стадии, хотя эндосперм обычно формировался (табл. 5 и рис. 5, II, б). Как следствие, мутантные растения характеризовались низкой семенной продуктивностью, обусловленной как стерильностью пыльцы, так и пониженной жизнеспособностью развивающихся семязпочек, значительная часть которых после оплодотворения не развивалась.

Однако при анализе прорастания семян, полученных от принудительного само- и перекрестного опылений, было обнаружено, что семена мутантных растений *N. sylvestris* превосходили контрольные примерно в 1,5 раза по некоторым показателям прорастания (табл. 6). В частности, была отмечена положительная корреляция между такими показателями, как масса семян, частота всхожести и степень развития проростков.

Превышение индексов прорастания у семян мутанта можно объяснить тем обстоятельством, что в процессе формирования плода меньшее количество семязпочек могло оказаться в более благоприятных трофических условиях, которые и способствовали развитию более жизнеспособных семян. Поэтому, невзирая на низкую семенную продуктивность

мутантных растений, обусловленную стерильностью пыльцы, жизнеспособность оставшихся семян оказывалась выше, чем в контроле.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что мутантные растения *N. sylvestris* характеризуются некоторой депрессией развития, выраженной в уменьшении их габитуса, и варьированием размеров генеративных органов. Стенка их пыльников характеризуется типичным строением, хотя в ее тапетальном слое иногда наблюдались следы дегградации. Микроспорогенез у мутантов протекал с нарушениями, в результате которых образовывались микроспоры разной величины, а также диады, триады и полиады. Анеугенный характер большинства аномалий (нарушения в расхождении хромосом в ходе 1-го и 2-го мейотических делений, выпадение второго деления в одной из диад, формирование многополюсного веретена и образование полиад) могут свидетельствовать о дефектах в организации и функционировании микротрубочек микроспороцитов мутантных растений. Для пыльцы мутанта характерна морфологическая и функциональная неоднородность, а ее фертильность резко снижена. Завязь мутанта по размерам и темпам развития уступает контролю в связи с наличием в ней большого количества неоплодотворенных семязпочек, что коррелирует с высокой стерильностью пыльцы. При опылении мутантных растений пыльцой исходных форм количество оплодотворенных семязпочек возрастало, а завязавшиеся семена обладали повышенной (по сравнению с контролем) жизнеспособностью, что косвенно свидетельствует о преимущественной стерильности со стороны мужской генеративной системы.

В целом, полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что цитогенетические и морфологические аномалии в развитии мужской генеративной системы устойчивых к ИФК растений *N. sylvestris*, приводящие к резкому снижению их семенной продуктивности, могут быть обусловлены соответствующими мутациями (или мутацией). Характер обнаруженных нарушений мейоза, сопровождаемых соответствующими дефектами в организации и функционировании микротрубочек мутант-

ных растений, может быть также связан с наличием соответствующих мутаций и в генах белков микротрубочек.

SUMMARY. An analysis of *Nicotiana sylvestris* mutant plants resistant to isopropyl-*N*-phenylcarbamate (IPC), one of the representative from phenylcarbamate herbicides, was carried out. The plants were characterized by pollen semi-sterility caused by disruptions during microsporogenesis and cytoplasm synthesis in microspores. Low seed productivity of mutant plants was caused by the high pollen sterility and partially by the low vital activity of seed-buds. Obtained data testify that mutations inducing IPC-resistance lead to cytogenetical and morphological abnormalities in male generative system development, that results in decreasing of seed productivity in *N. sylvestris* mutants. Character of discovered cytological disruptions testifies about possible defects in organization and functioning of microtubules in mutant plants that can correlate with mutation(s) in one or several microtubule protein genes.

РЕЗЮМЕ. Проведено аналіз мутантних рослин *Nicotiana sylvestris*, стійких до ізопропіл-*N*-фенілкарбамату (ІФК) — однієї з речовин класу *N*-фенілкарбаматних гербіцидів. Рослини характеризувались напівстерильністю пилку, що обумовлено порушеннями в ході мікроспорогенезу і синтезу цитоплазми в мікроспорах. Низька насіннева продуктивність мутантів була обумовлена високою стерильністю пилку і, частково, зниженою життєздатністю насінневих зачатків. Отримані результати свідчать на користь того, що мутації, які спричиняють стійкість до ІФК, викликають цитогенетичні та морфологічні аномалії у розвитку чоловічої генеративної системи, що призводить до різкого зниження насінневої продуктивності мутантних рослин *N. sylvestris*. Характер виявлених цитологічних порушень свідчить про можливі дефекти в організації і функціонуванні микротрубочок мутантних рослин, що може бути пов'язано з мутацією (або мутаціями) за одним чи декількома генами білків микротрубочок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clayton L., Lloyd C.W. The relationship between the division plane and spindle geometry in *Allium* cells treated with CIPC and griseofulvin: an anti-tubulin study // *Eur. J. Cell Biol.* — 1984. — 34. — P. 248–253.
2. Hoffman J.C., Vaughn K.C. Mitotic disrupter herbicides act by a single mechanism but vary in efficacy // *Protoplasma.* — 1994. — 179. — P. 16–25.
3. Eleftheriou E. P., Bekiari E. Ultrastructural effects of the herbicide chlorpropham (CIPC) in root tip cells of wheat // *Plant Soil.* — 2000. — 226. — P. 11–19.
4. Vaughn K.C. Anticytoskeletal herbicides // *Plant microtubules: potential for biotechnology* / Ed. P. Nick. — Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2000. — P. 193–205.
5. Young D. H., Lewandowski V. Covalent binding of the benzamide RH-4032 to tubulin in suspension-cultured tobacco cells and its application in cell-based competitive-binding assay // *Plant Physiol.* — 2000. — 124. — P. 115–124.
6. Yemets A., Stelmakh O., Kundelchuk O., Blume Ya.B. Obtaining and analysis of isopropyl-*N*-phenylcarbamate resistant lines of *Nicotiana* species // *Cell Biol. Int.* — 2003. — № 27. — P. 307–310.
7. Aviv D., Galun E. Isolation of tobacco protoplasts in the presence of isopropyl *N*-phenylcarbamate and their culture and regeneration into plants // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1977. — 83. — P. 267–273.
8. Емец А.И., Милейко А.А., Блюм Я.Б. Получение мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивых к гербициду изопропил-*N*-фенилкарбамату // *Докл. НАН Украины.* — 2000. — № 10. — С. 182–187.
9. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1974. — С. 189–219.
10. Плохинский Н.А. Биометрия. — Новосибирск : Наука, 1961. — С. 101–157.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — М.: Колос, 1973. — С. 87–123.
12. Жукова Г.Я., Поддубная-Арнольди В.А. Сем. *Solanaceae* // *Сравнительная эмбриология цветковых.* — Л.: Наука, 1987. — С. 241–247.
13. Тахтаджян А.Л. Вопросы эволюционной морфологии растений. — Л.: Наука, 1954. — С. 212.
14. Банникова В.П. Цитозембриология межвидовой несовместимости у растений. — К.: Наук. думка, 1975. — 284 с.

Поступила 25.05.05