

Л. В. КОВАЛЕВА, Н. А. МУСАТОВА, Е. А. БРИТИКОВ

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ
САМОНЕСОВМЕСТИМОСТИ У ПЕТУНИИ С ПОМОЩЬЮ
ИНГИБИТОРОВ БЕЛКОВОГО И НУКЛЕИНОВОГО ОБМЕНА**

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханов 28 II 1975)

Несовместимость половых элементов при опылении у растений проявляется в неспособности пыльцы прорасти на рыльце (спорофитный тип несовместимости) или неспособности пыльцевых трубок проникать на всю длину столбиков и осуществлять оплодотворение (гаметофитный тип несовместимости), хотя и пыльца и пестики функционально активны. Установлено, что возможность оплодотворения обуславливает специальный ген (S-ген), представленный в популяциях самонесовместимых растений серией множественных аллелей (¹⁻³). Попадание пыльцы с определенным комплексом аллелей на рыльце с тем же составом аллелей при самоопылении вызывает характерную для несовместимости реакцию торможения. В случае, если пыльца и пестик содержат неодинаковые S-аллели, прорастание пыльцевых трубок идет нормально, и осуществляется оплодотворение. Согласно «димерной» гипотезе Льюиса (⁶), предложенной для объяснения механизма гаметофитной самонесовместимости, каждый из S-аллелей кодирует синтез специфического полипептида. При самоопылении идентичные полипептиды пыльцы и пестика в зоне контакта пыльцевой трубки с тканями пестика полимеризуются в тетрамеры, действующие как репрессоры роста пыльцевых трубок. Однако прямых экспериментальных данных, подтверждающих гипотезу Льюиса, до сих пор не получено.

Вопрос о времени становления механизма самонесовместимости также не ясен. Рядом авторов (^{1, 7-10}) отмечался тот факт, что опыление цветков некоторых самонесовместимых растений в фазе бутонов приводит к оплодотворению и завязыванию семян. Наличие «фертильного» периода на ранних стадиях развития цветков можно объяснить тем, что механизм самонесовместимости в это время еще не функционирует. Исходя из этой предпосылки, мы попытались в данной работе воспрепятствовать формированию самонесовместимости, заингибируя на каком-либо участке передачу информации с помощью ингибиторов белкового и нуклеинового обмена. Снятие самонесовместимости под действием ингибиторов должно было бы указать на те звенья, которые участвуют в формировании механизма самонесовместимости как в пыльце, так и пестике.

Удобным объектом для изучения самонесовместимости половых элементов при опылении является представитель семейства пасленовых *Petunia hybrida*. Среди растений этого вида встречаются экземпляры, для которых характерна самонесовместимость гаметофитного типа. Путем черенкования одного такого растения, выделенного нами в 1968 г., и был получен самонесовместимый клон петунии, оставшийся самонесовместимым в течение всего периода вегетации. Опыты проводили в вегетационном домике и оранжерее Института физиологии растений АН СССР в течение 1970—1974 гг. с июня по ноябрь.

Водные растворы ингибиторов различной концентрации вводили в бутон за 2—3 дня до раскрытия цветков с помощью микропипетки (0,2—0,3 мл). Жизнеспособность пыльцы и пестиков, получивших воздействие ингибитора, проверяли перекрестным опылением. О действии ингибиторов судили по количеству завязавшихся семян. Опыление проводили по нескольким вариантам: 1) как пыльца, так и пестик получали воздействие ингибитора; 2) пестик, получивший воздействие ингибитора, опыля-

ли пылью из необработанных цветков этого же растения; 3) пестики необработанных цветков опыляли пылью из цветков, получивших воздействие ингибитора. Контрольным вариантом было самоопыление цветков, в которых пестики и пыльца получали обработку водой в бутонах. После опыления пестики изолировали ватными тампонами.

В предварительных опытах было установлено, что пыльца становится функционально активной после растрескивания пыльников: только такая пыльца способна прорасти и произвести оплодотворение; пыльца же, взятая из закрытых пыльников, ни при самоопылении, ни при перекрестном опылении не дает завызывания семян. В противоположность с ть пыльце, пестики способны к восприятию пыльцы задолго до раскрытия бутонов, причем завязывание семян наблюдается как при перекрестном опылении, так и при самоопылении (рис. 1). Из рис. 1 видно, что в бутонах, самоопыленных за 5, 4, 2 суток до раскрытия, произошло завязывание семян, а в бутонах, самоопыленных накануне раскрытия, семена не завязывались. Следовательно, механизм самонесовместимости у петунии начинает функционировать только за сутки до раскрытия цветков.

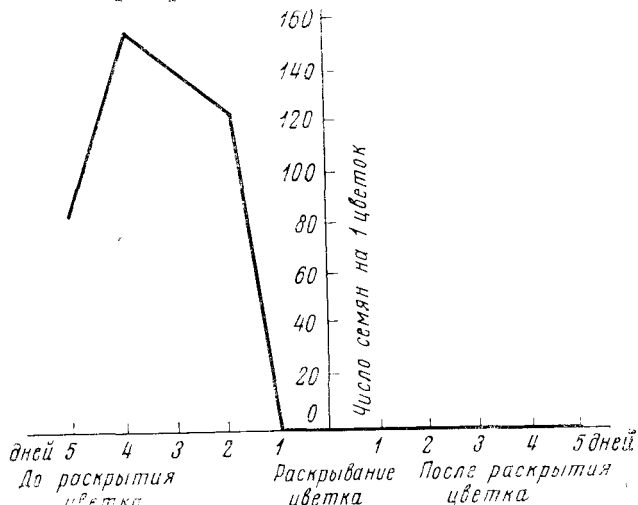


Рис. 1. Динамика завязывания семян у самонесовместимого клона петунии в процессе развития цветка

В опытах по проверке сохранения жизнеспособности пестиков и самонесовместимости по мере старения цветков проводили перекрестное опыление и самоопыление через 1—5 суток после открытия цветков. Было установлено, что пестики остаются функционально активными в течение этого периода (при перекрестном опылении происходит завязывание семян), а сформированная самонесовместимость сохраняется у петунии по крайней мере в течение пяти суток (завязывания семян при самоопылении не наблюдали).

В опытах по проверке сохранения жизнеспособности пестиков и самонесовместимости по мере старения цветков проводили перекрестное опыление и самоопыление через 1—5 суток после открытия цветков. Было установлено, что пестики остаются функционально активными в течение этого периода (при перекрестном опылении происходит завязывание семян), а сформированная самонесовместимость сохраняется у петунии по крайней мере в течение пяти суток (завязывания семян при самоопылении не наблюдали).

На основании проведенных опытов выбрано время введения ингибиторов: их вводили за 2—3 дня до раскрытия цветков, т. е. в период формирования самонесовместимости. При обработке бутонов ингибитором синтеза ДНК — митомидином в концентрациях 5, 25, 50 мкг/мл не наблюдали самонесовместимости (табл. 1). Следовательно, на реакцию самонесовместимости, детерминированную в ДНК, нам не удалось воздействовать на этом уровне.

Эффект снятия самонесовместимости наблюдали при использовании ингибиторов синтеза РНК — оливомицина и актиномицина D, т. е. на уровне транскрипции (табл. 1). При оптимальных концентрациях оливомицина (100—200 мкг/мл) число цветков с завязавшимися семенами достигало 66%, причем завязывание семян на один цветок составляло 33% от перекрестного опыления. Снятие самонесовместимости при использовании оливомицина происходило в случае воздействия как на пыльцу, так и на пестики. Воздействие 200 мкг/мл оливомицина при разной температуре приводило к следующим результатам*:

* Над чертой — число цветков, обработанных оливомицином, в скобках — число цветков с завязавшимися семенами; под чертой — среднее число семян в одном цветке.

Температура, °C	18	25	35	свыше 40
Пестик и пыльца	<u>26(11)</u> 289	<u>9(3)</u> 144	<u>8(0)</u> —	<u>9(0)</u> —
Пестик	<u>25(11)</u> 185	<u>40(2)</u> 296	<u>8(2)</u> 279	<u>9(0)</u> —
Пыльца	<u>25(19)</u> 138	<u>40(2)</u> 273	<u>9(2)</u> 256	<u>8(0)</u> —
Контроль (вода)	<u>48(0)</u> 0	<u>9(0)</u> —	<u>40(0)</u> —	<u>7(0)</u> —

В описанных опытах оливомицин вводили в бутоны в период формирования самонесовместимости, т. е. за 2—3 суток до раскрытия цветков. В другой серии опытов, когда оливомицин в концентрации 200 мкг/мл вводили в бутоны только за 1 день до раскрытия цветков и он действовал уже на сформированную систему самонесовместимости, завязывания семян не наблюдали. Следовательно, ингибирование механизма самонесовместимости под действием оливомицина происходит именно в процессе его формирования.

Из наших данных видно, что оливомицин снижал самонесовместимость в широком диапазоне температур от 18 до 35°. Наибольшее число цветков с завязавшимися семенами при обработке оливомицином в концентрации 200 мкг/мл наблюдали при температуре 18°. Оно составляло 54%. При температуре 35° семена завязывались только в 16% цветков, однако число завязавшихся семян на 1 цветок оставалось высоким. При температуре свыше 40° обработкой оливомицином не удалось остановить формирование самонесовместимости.

Другой ингибитор синтеза РНК — актиномицин D оказался менее эффективным, чем оливомицин (табл. 1). Оптимальная концентрация актиномицина 10 мкг/мл. Снижение самонесовместимости в этом случае достигало 31%, но завязывание семян на 1 цветок составляло 10% от перекрестного опыления. При этом снятие самонесовместимости наблюдали в вариантах, где воздействию ингибитора подвергались пестики. В вариантах,

Таблица 1

Снятие самонесовместимости у петунии с помощью ингибиторов
белкового и нуклеинового обмена

Ингибитор	Концентрация ингибитора, мкг/мл	Число цветков, получивших воздействие ингибитора	Число цветков с завязавшимися семенами	Число семян на 1 цветок	Число семян на 1 цветок, % от перекрестного опыления
Митомицин С	20	15	0	0	0
	25	15	0	0	0
	5	15	0	0	0
Оливомицин	500	75	1	14	3
	200	139	85	172	33
	100	60	38	167	33
	30	60	1	15	3
	10	60	0	0	0
Актиномицин D	500	75	2	4	1
	200	15	1	4	1
	100	15	0	0	0
	10	19	6	54	10
Циклогексими́д	50	45	5	32	6
	25	45	3	55	10
	10	45	3	6	1
Хлорамфени́кол	500	75	0	0	0
	200	15	4	11	2
	100	15	0	0	0
Контроль (вода)		160	0	0	0

где воздействию ингибитора подвергалась только пыльца, завязывания семян не обнаружено.

Данные о различиях в механизме действия оливомицина и актиномицина имеются в литературе: например, отмечены различные условия комплексобразования с ДНК⁽¹¹⁾, показано, что актиномицин оказывает ингибирующее действие на иммунореакции, а оливомицин не оказывает такого действия⁽¹²⁾. В наших опытах также видно различное влияние этих ингибиторов: актиномицин снимал самонесовместимость только при действии на пестики, а оливомицин — как на пыльцу, так и на пестики и в значительно большей степени, чем актиномицин. На основании опытов с актиномицином у лилии Ашером⁽¹³⁾ высказано предположение об участии в реакции самонесовместимости РНК пестиков. По нашим данным, актиномицин снимал самонесовместимость только при обработке пестиков, что указывает на участие РНК пестиков в формировании механизма несовместимости. Однако в случае использования оливомицина самонесовместимость снималась как при действии на пестики, так и на пыльцу, что свидетельствует о том, что в формировании самонесовместимости принимают участие РНК и пестиков, и пыльцы.

Из ингибиторов белкового синтеза использованы циклогексимида и хлорамфеникол (табл. 1). Самой эффективной концентрацией циклогексимида была 25 мкг/мл, в этом случае завязывание семян составляло 10%, при концентрации 50 мкг/мл составляло 6%, а при 10 мкг/мл 1,2%. При обработке бутонов растворами хлорамфеникола только при действии одной из использованных концентраций (200 мкг/мл) удалось свять самонесовместимость, но завязывание семян составляло всего 2%. Различия в степени снятия самонесовместимости этими ингибиторами можно объяснить более специфическим действием хлорамфеникола: он ингибирует синтезы белков только на 70 S рибосомах⁽¹⁴⁾. В наших опытах оба ингибитора снимали самонесовместимость только при действии на пестики; если же обработке подвергалась только пыльца, то завязывания семян не наблюдали. Следовательно, в исследуемый период развития цветка синтез белков, специфических для реакции несовместимости, происходит только в пестиках. Если специфические белки самонесовместимости имеются в пыльце, то можно допустить, по Хеслону-Харрисону⁽¹⁵⁾, что они представлены белками «узнавания», синтезирующимися на очень ранних стадиях развития.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм самонесовместимости, будучи детерминированным в ДНК, формируется в процессе развития цветка и начинает функционировать накануне его раскрытия. Снятие самонесовместимости оливомицином показало, что в исследуемый период развития цветка в формировании механизма несовместимости существенными являются метаболические процессы, связанные с синтезом РНК в пыльце и пестиках. Опыты с хлорамфениколом и циклогексимидом позволяют говорить о синтезе белков, принимающих участие в формировании механизма самонесовместимости, только в пестиках.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 II 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. M. East, A. S. Mangelsdorf, Proc. Nat. Sci. U.S.A., v. 11, 116 (1925). ² E. Emerson, Genetics, v. 23, 190 (1938). ³ A. S. Bateman, Heredity, v. 8, 305 (1954). ⁴ W. S. Ewens, Genetics, v. 50, 1433 (1954). ⁵ D. R. Sampson, Genetics, v. 56, 241 (1967). ⁶ D. Lewis, Genetics to Day, v. 3, 657 (1965). ⁷ W. H. Eyster, Science, v. 94, 144 (1941). ⁸ K. F. Thompson, Genetics, v. 55, 45 (1957). ⁹ K. K. Pandey, Gen. Res., v. 5, 397 (1964). ¹⁰ R. M. Adamson, Canad. J. Plant. Sci., v. 45, 493 (1965). ¹¹ D. C. Ward, E. Reich, I. H. Goldberg, Science, v. 149, 3689, 1259 (1965). ¹² В. А. Шорин, С. П. Шаповалова, Антибиотики, т. 11, 963 (1966). ¹³ P. D. Ascher, Theor. Appl. Genet., v. 41, 75 (1971). ¹⁴ В. Б. Иванов, Клеточные основы роста растений, «Наука», 1974. ¹⁵ J. Heslop-Harrison, Y. Heslop-Harrison et al., Ann. Bot., v. 37, 451, 403 (1973).