

УДК 581.1.581.14

РОЛЬ ЭТИЛЕНА В РЕГУЛЯЦИИ ГАМЕТОФИТНО-СПОРОФИТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПРОГАМНОЙ ФАЗЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* L.)

© 2013 г. Л. В. Ковалева, Г. В. Тимофеева, Г. Б. Родионова, Е. В. Захарова, В. Ю. Ракитин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева

127276 Москва, ул. Ботаническая, д. 35

E-mail: kovaleva_l@mail.ru

Поступила в редакцию 16.11.11 г.

Окончательный вариант получен 19.01.12 г.

Исследовали динамику содержания 1-аминоциклопропан 1-карбоновой кислоты (АЦК) и образования этилена в процессе развития и прорастания мужского гаметофита петунии трех клонов (стерильного, самосовместимого и самонесовместимого). Развитие мужского гаметофита у фертильных клонов сопровождалось двумя максимумами содержания АЦК и выделения этилена в системе пыльник—мужской гаметофит. Первый сопровождал развитие микроспор, разрушение тапетума и средних слоев стенки пыльника, второй — дегидратацию и созревание пыльцевых зерен. Пыльники стерильного клона уже на стадии мейоза выделяли в 10 раз больше этилена, чем пыльники фертильных клонов, что приводило к разрушению тапетума и гибели микроспороцитов. Обработка этиленом (1–100 мкл/л) бутонов фертильных клонов на стадии мейоза мужского гаметофита также вызывала гибель генеративных клеток. Накопленная во время дегидратации и созревания в пыльцевых зернах АЦК расходовалась на синтез этилена при их прорастании. Всплеск выделения этилена сопровождал прорастание мужского гаметофита как на среде культивирования, так и на поверхности рыльца. Основным местом синтеза этилена в опыленном пестике были ткани рыльца. Прорастание мужского гаметофита после совместимого опыления сопровождалось более высоким содержанием АЦК, но менее интенсивным образованием этилена, чем после несовместимого опыления. Более интенсивное образование этилена после самонесовместимого опыления вызывало торможение роста пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика. Ингибитор действия этилена 2,5-норборнадиен (NBD) блокировал как развитие, так и прорастание мужского гаметофита. Полученные данные показывают, что этилен участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения.

Ключевые слова: этилен, мужской гаметофит, дифференциация, прорастание, рост, стерильность, самонесовместимость, петуния.

DOI: 10.7868/S0475145013020055

В настоящее время накапливается все больше данных об участии этилена в регуляции репродуктивного процесса растений (Kende, 1993; Woltering et al., 1995; Liu et al., 1999; Bleecker, Kende, 2000; Alexander, Grierson, 2002; Butenko et al., 2006; Trusov, Botella, 2006; Achard et al., 2007; Xue et al., 2008; Lin et al., 2009).

Показано, что трансгенные растения петунии со сниженной экспрессией гена *PhEIN2* проявляли низкую чувствительность к этилену при старении цветков и созревании плодов (Shibuya et al., 2004), а сверхэкспрессия в трансгенных растениях табака гена *Cm-ETR1/H69A* или *Cm-ERS1/H70A* индуцировала стерильность пыльцы или снижала ее фертильность (Ishimaru et al., 2006).

LM-array (laser microdissection technique) 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 (ACO3)* на последних стадиях развития пыльцевого зерна, что указывало на то, что эти стадии характеризуются активным синтезом этилена (Hirano et al., 2008).

Опыление у многих растений инициирует каскад событий, включающих в себя образование этилена, способного координировать дальнейшее развитие цветка (O'Neill et al., 1993). Исследования, проведенные на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, предполагают, что индуцированное опы-

лением образование и выделение этилена тканями пестика необходимо для роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения (Hoekstra, Weges, 1986; Singh et al., 1992; Nadeau et al., 1993; Tang et al., 1994; Tang, Woodson, 1996; Bui, O'Neill, 1998; Weterings et al., 2002; Holden et al., 2003; Kovaleva, Zakharova, 2003). Однако вопрос о физиологической роли этилена в гаметофитно-спорофитных взаимодействиях в прогамной фазе оплодотворения как при нормальном развитии репродуктивного процесса, так при наличии генетически детерминированных барьеров самооплодотворения еще далек от своего решения.

Цель данной работы составило изучение образования и действия АЦК и 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.

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 приводило к нарушению гаметофитно-спорофитных взаимодействий и в конечном итоге к блокированию оплодотворения.

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 в оранжерее.

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 (Добровольская и др., 2009).

Самоопыление кастрированных и изолированных накануне раскрытия цветков самосовместимого и самонесовместимого клонов проводили пылью, собранной из раскрытых цветков соответствующего клона.

Стадии развития микроспор и пыльцевых зерен в развивающихся пыльниках определяли в соответствии с общепринятой классификацией (Koltunow et al., 1990) по методике Матвеевой и др. (1998). Пыльники извлекали из бутонов длиной от 2.5 до 50 мм, раздавливали пестиком в фиксирующей жидкости (ацетон : 96% этанол, 1 : 1). Полученную взвесь клеток фильтровали через капроновую сет-

ку (поры 40 мкм), центрифугировали 3 мин при 200 g, ресуспендировали в 70% спирте, снова центрифугировали и окрашивали флюоресцентным красителем Hoechst 33258 ("Serva" Германия) для идентификации стадий развития микроспор, основанной на специфичном связывании красителя с ДНК ядер (Матвеева и др., 1998). Для определения каждой стадии использовали пыльники из 15 бутонов. Препараты анализировали под микроскопом Axio Imedger D1 (Carl Zeiss, Германия).

Изучение влияния экзогенного этилена и ингибитора его действия 2,5-норборнадиена (NBD) на развитие мужского гаметофита петунии самосовместимого клона

Обработка побегов с бутонами этиленом. За 0.5 ч до начала эксперимента побеги с бутонами, находящимися на разных стадиях развития мужского гаметофита, срезали с растений, ставили в стаканы с 100 мл водопроводной воды и помещали в герметичные стеклянные камеры объемом 20 л, снабженные штуцерами для ввода этилена. С помощью шприца вводили этилен, создавая в камерах следующие концентрации: 1, 10 и 100 мкл/л. Обработку побегов с бутонами этиленом проводили в течение трех суток, пробы брали каждые 24 часа. После отбора бутонов и проветривания в камерах создавали необходимые концентрации этилена. В качестве контроля использовали пыльники из бутонов, находившихся в камере без добавления этилена.

Обработку побегов с бутонами и прорастающую на среде культивирования пыльцу NBD проводили в 5-литровых стеклянных камерах при температуре 26°C и 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения люминисцентными лампами ЛБ-80-8000 люкс. Для создания в камерах концентрации газообразного NBD 500, 2000 и 6000 мкл/л на полосу фильтровальной бумаги, прикрепленной к крышке сосуда, наносили соответственно 12, 48 или 144 мкл жидкого NBD, после чего сосуд немедленно закрывали и герметизировали. Камеры ежедневно проветривали, после чего восстанавливали концентрацию NBD.

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 (Carl Zeiss, Германия).

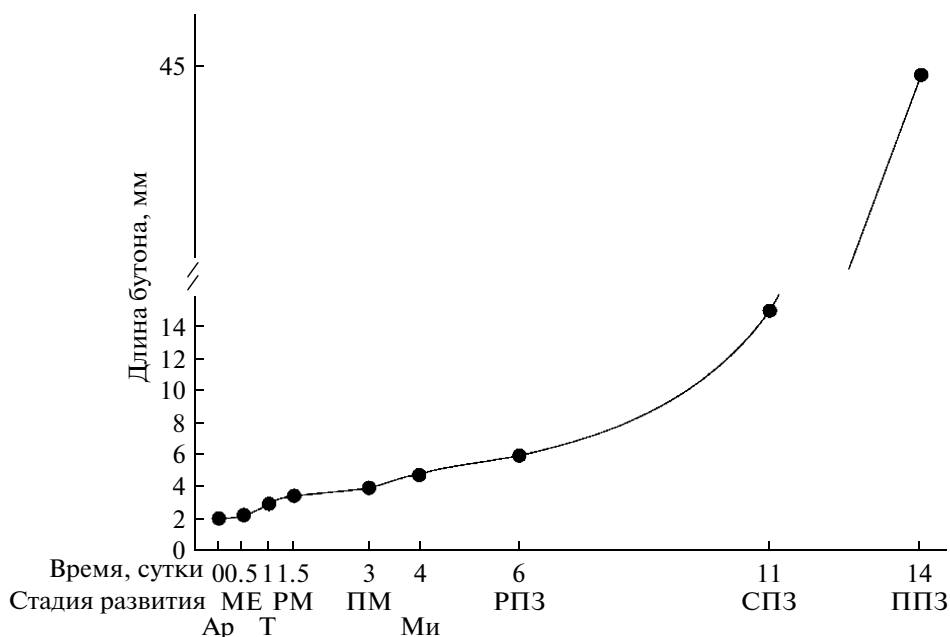


Рис. 1. Корреляция между длиной бутона и стадиями развития пыльника и мужского гаметофита петунии фертильного клона. Ар — археспорий, Ме — мейоз, Т — тетрады, РМ — ранние микроспоры, ПМ — поздние микроспоры, Ми — митоз, РПЗ — ранние пыльцевые зерна, СПЗ — средние пыльцевые зерна, ППЗ — поздние пыльцевые зерна.

Выделение этилена определяли газохроматографическим методом (Ракитин В., Ракитин Л., 1986). По 30 пыльников из бутонов одного размера, 20 мг пыльцы + 2 мл питательной среды, 5–7 неопыленных или опыленных пестиков или их частей (рылец, столбиков, завязей) помещали в отдельные флаконы объемом 15 мл и герметично закрывали резиновыми пробками (Septa, Red Rubber, O.D. 13 мм, Aldrich, США). Одновременно для контроля исходного уровня этилена в воздухе закрывали пустой флакон. Образцы инкубировали в темноте при 26°C в термостате ТСН 100 (Laboratorni Pristole, Прага) не более 30 мин до начала анализа. Весь воздух из флакона использовали для определения содержания этилена на газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно ионизационным детектором и концентрирующей системой для углеводородов, позволяющей в десятки раз повышать чувствительность прибора, которая необходима для максимального сокращения времени инкубации и проведения анализа до начала выделения “раневого” этилена.

Определение содержания АЦК проводили по методу Лизада и Янга (Lizada, Yang, 1979) с модификациями. Свежесобранный материал (пыльники, неопыленные и опыленные пестики) замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C. Навески образцов (50 мг) гомогенизировали в 1.2 мл 0.2 М ТХУ. АЦК экстрагировали в течение 2 ч. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 2300 g. Затем во флакон объемом 15 мл добавляли 1 мл экстракта АЦК и 0.2 мл 0.01 М HgCl₂. Флакон герметично закры-

вали резиновой пробкой, через которую шприцем вводили 0.2 мл охлажденной смеси 5.25% гипохлорита натрия и насыщенного раствора NaOH (в соотношении 2 : 1). Все операции проводили при 4°C. Образующийся из АЦК этилен определяли на газовом хроматографе (Ракитин В., Ракитин Л., 1986).

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика содержания АЦК и образования этилена в развивающихся пыльниках

Содержание АЦК и образование этилена исследовали на девяти стадиях развития пыльника: стадия материнских клеток пыльцы, археспорий (Ар), мейоз (Ме), тетрады (Т), ранние микроспоры (РМ), поздние микроспоры (ПМ), митоз (Ми), ранние пыльцевые зерна (РПЗ), средние пыльцевые зерна (СПЗ), поздние пыльцевые зерна (ППЗ) (рис. 1). Стадии определяли по экспериментально выявленной корреляции между длиной бутона и стадией развития мужского гаметофита (Добровольская и др., 2009).

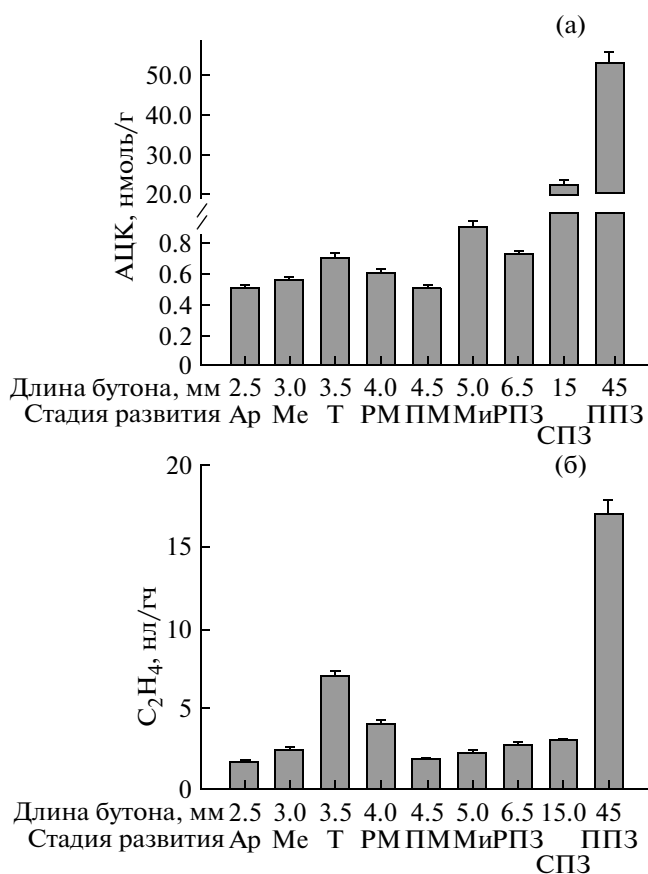


Рис. 2. Динамика содержания АЦК (а) и выделения этилена (б) в развивающихся пыльниках петунии самосовместимого клона.

Пыльники фертильного клона

Развитие мужского гаметофита у обоих фертильных клонов (самосовместимого и самонесовместимого) сопровождалось двумя периодами повышения содержания АЦК и образования этилена в тканях пыльника: первый происходил во время развития микроспор, второй – при созревании пыльцевых зерен (рис. 2). Поскольку динамика выделения этилена у обоих клонов была идентична, мы приводим данные только по самосовместимому клону.

Микроспоры являются первыми клетками гаметофитной генерации, образующимися в микроспорангии в результате мейотического деления материнских клеток микроспор. Развитие микроспоры – наиболее длительный этап формирования пыльцевого зерна, в ходе которого микроспоры и стенка пыльника подвергаются структурным и функциональным изменениям.

Тапетум, внутренний слой стенки пыльника, непосредственно прилегает к спорогенной ткани. Запасные вещества тапетума гидролизуются и секретируются в гнездо пыльника, обеспечивая про-

хождение мейоза, развитие микроспор и созревание пыльцевых зерен (Резникова, 1984; Goldberg et al., 1993).

У петунии разрушение тапетума происходило по мере созревания микроспор и завершалось к моменту образования двуядерной пыльцы (Добровольская, 2009). Так, средние слои стенки пыльника уже на стадии Т были в значительной степени разрушены. На стадии РМ наблюдали полное разрушение двух средних слоев стенки и дезорганизацию тапетума. Полное разрушение тапетума происходило перед стадией РПЗ. Трехкратное повышение выделения этилена пыльниками, сопровождавшее развитие микроспор на стадии Т (рис. 2), 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 NBD (во всех концентрациях) бутонов длиной до 5 мм уже на 2-й день приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита.

Зрелые микроспоры вступают в дифференцирующей Ми, в результате которого образуются две клетки мужского гаметофита: вегетативная и генеративная. Период развития пыльцевых зерен на стадиях РПЗ и СПЗ характеризовался низким уровнем выделения этилена (рис. 2).

Финальным этапом созревания пыльцы, без которой она практически утрачивала способность к прорастанию, являлась дегидратация пыльцы, которая начиналась после разрушения тапетума, и к моменту растрескивания пыльника пыльцевые зерна были частично дегидратированы. Созревание и дегидратация пыльцевых зерен (стадия ППЗ) сопровождалась значительным повышением содержания АЦК и выделения этилена пыльниками (рис. 2). Повышение содержания АЦК в пыльниках на последней стадии созревания сопряжено с ее накоплением в созревающих пыльцевых зернах. Следует отметить, что выделение этилена пыльниками на стадии позднего двуядерного пыльцевого зерна возрастало приблизительно в 10 раз, а содержание АЦК в 100 раз. Содержание АЦК в зрелой пыльце составляло 300 нмоль/г сырого веса. Накопление АЦК при созревании пыльцы также было обнаружено у гвоздики (Whitehead et al., 1983).

Значительное увеличение образования и, следовательно, содержания этилена запускает 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 высвобожде-

нию пыльцы (Rogers, 2006; Goldberg et al., 1993). Так растрескивание пыльников у табака задерживалось при обработке цветков ингибитором действия этилена 1-метилциклопропеном (1-МСП) и ускорялось при обработке этиленом (Rieu et al., 2003). В наших опытах семидневная обработка бутонов (длина 10–15 мм) петунии самосовместимого клона ингибитором действия этилена NBD в концентрации 6000 мкл/л предотвращала растрескивание пыльников и прорастание полученной из них пыльцы. Эффект от воздействия NBD в концентрациях 2000 и 500 мкл/л был менее значителен, и хотя бутоны продолжали свое развитие, процент прорастания пыльцы из них составлял 50% от контроля (пыльца из бутонов, развивавшихся в сосудах без NBD), что указывало на участие этилена в развитии мужского гаметофита также и на поздних стадиях развития.

Пыльники стерильного клона

У стерильного клона, разрушение тканей тапетума наблюдали очень рано, уже в профазе Me, одновременно с нарушениями в развитии спорогенной ткани (Добровольская и др., 2009). Гибель микроспороцитов сопровождалась плазмолизом тапетальных клеток. Однако, не смотря на гибель микроспороцитов и разрушение тапетума, стенка пыльника продолжала расти. Растрескивание пыльников у стерильного и фертильных клонов происходило в одно и то же время.

Гибель микроспороцитов и дегенерация клеток тапетума у стерильного клона сопровождалась аккумуляцией АЦК и высоким уровнем выделения этилена на стадии материнских клеток пыльцы (рис. 3). Следует отметить, что образование этилена пыльниками стерильного клона, сопровождающее плазмолиз тапетума и гибель микроспороцитов было в 10 раз выше, чем у фертильного во время разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника (рис. 2).

Влияние экзогенного этилена на развитие мужского гаметофита

Результат воздействия экзогенного этилена на развивающийся мужской гаметофит петунии самосовместимого клона зависел от концентрации гормона и стадии развития генеративных клеток (табл. 1).

Наиболее чувствительными к действию этилена оказались генеративные клетки на стадии Me, которые погибали через сутки воздействия этилена в концентрациях 10 и 100 мкл/л и через двое суток воздействия этилена в концентрации 1 мкл/л.

Генеративные клетки на стадии T погибали через 3 суток воздействия этилена в концентрациях 10 и 100 мкл/л, в то время как клетки на стадии PM

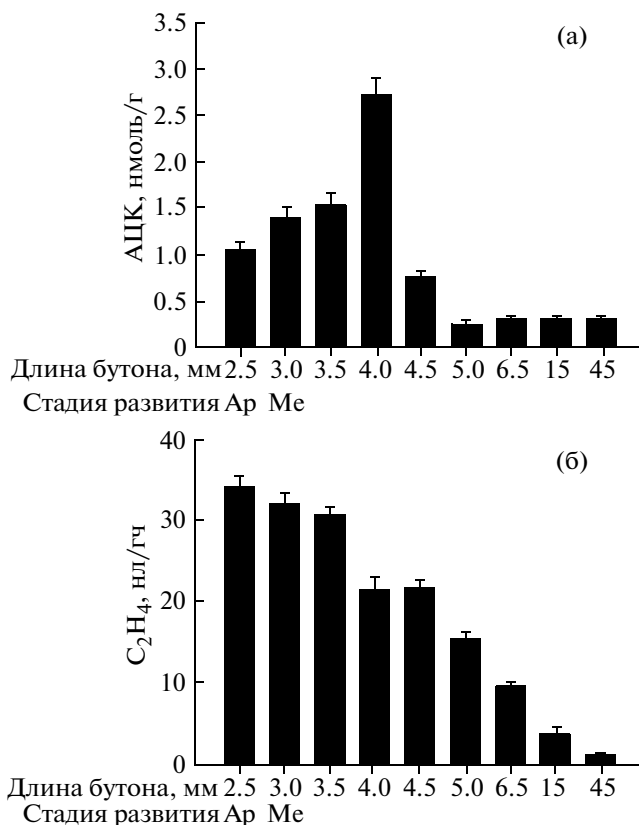


Рис. 3. Динамика содержания АЦК (а) и выделения этилена (б) в развивающихся пыльниках петунии стерильного клона.

только повреждались после 3-х суток воздействия этилена в концентрации 10 мкл/л или после 2-х суток в концентрации 100 мкл/л.

Каких-либо признаков деградации после воздействия экзогенного этилена на генеративные клетки на стадиях PM и Mi, а также на последующих стадиях созревания пыльцевых зерен не наблюдали.

Таким образом, 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 тетрады, так же, как это происходило при высоком уровне выделения и, следовательно, содержания эндогенного этилена у стерильного клона.

Образование и действие этилена в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите

Прорастающая *in vitro* пыльца практически сразу же после начала культивирования интенсивно выделяла этилен (рис. 4), возможно, за счет аккумуляции в пыльцевых зернах АЦК (рис. 2а).

Влияние экзогенного этилена на развивающийся мужской гаметофит петунии самосовместимого клона

Стадии развития мужского гаметофита	Концентрация этилена											
	0 (Контроль)			1 мкл/л			10 мкл/л			100 мкл/л		
	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки	1-е сутки	2-е сутки	3-и* сутки
Мейоз												
Тетрады												
Ранние микроспоры												
Поздние микроспоры												
Митоз												
Пыльцевые зерна												

* Длительность обработок.

□ — контрольные и неповрежденные клетки, ■ — поврежденные клетки, ■ — гибель клеток.

Экзогенный этилен в концентрации 0.1 мкл/л на 20% стимулировал, а в концентрациях 1 и 10 мкл/л на 20% ингибировал прорастание пыльцы петунии (рис. 5а).

NBD в концентрациях 500 и 2000 мкл/л подавлял прорастание пыльцы на 30–40% и на 95% ингибировал этот процесс в концентрации 6000 мкл/л (рис. 5б).

Образование и действие этилена в системе мужской гаметофит–пестик самосовместимого и самонесовместимого клонов

Ранее было показано, что опыление вызывает усиление выделения этилена тканями пестика (Sign et al., 1992; O'Neill et al., 1993; Kovaleva, Zakharova, 2003; Tang et al., 1994). В данной работе мы исследовали динамику содержания предше-

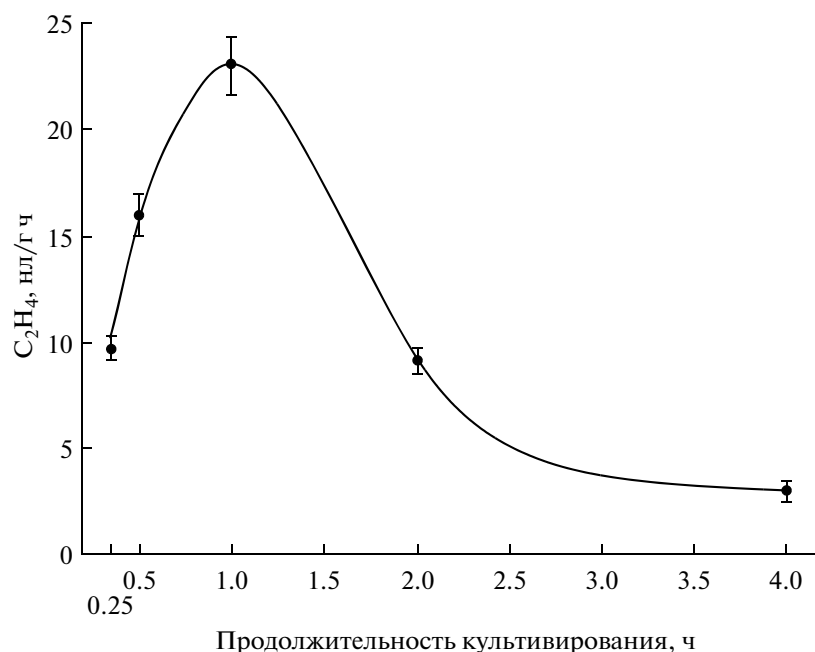


Рис. 4. Выделение этилена *in vitro* прорастающим мужским гаметофитом петунии самосовместимого клона.

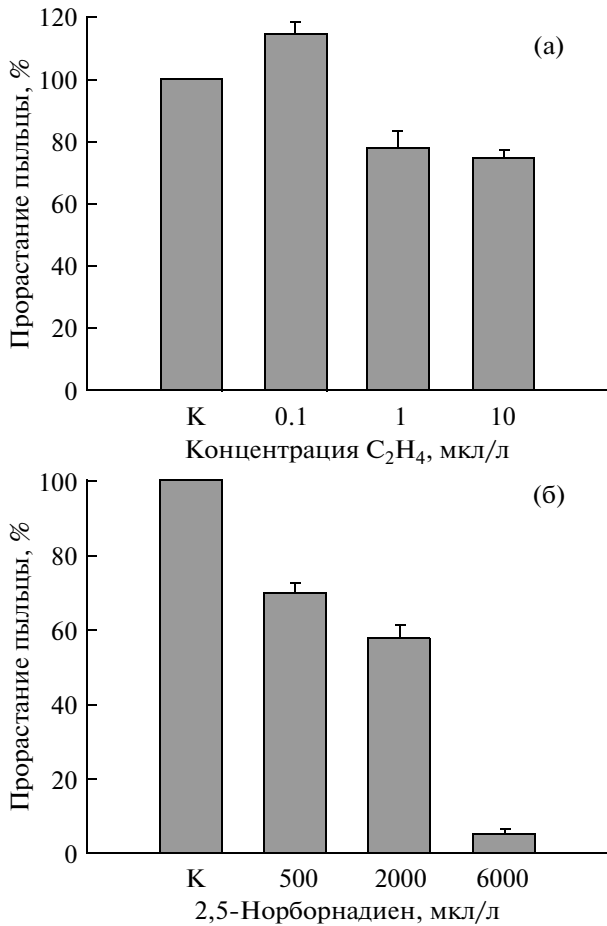


Рис. 5. Влияние этилена (а) и ингибитора действия этилена NBD (б) на *in vitro* прорастание мужского гаметофита петунии самосовместимого клона.

ственника этилена – АЦК и образования этилена в тканях рыльца при прорастании и во время роста пыльцевых трубок после самоопыления самосовместимого и самонесовместимого клонов петунии.

Опыление очень быстро запускало синтез АЦК в системе рыльца–рыльце (рис. 6). Содержание АЦК в тканях рыльца достигало максимума через 1.5–2 часа после опыления. После совместимого опыления ее содержание в рыльцах было в 2.5 раза больше, чем после несовместимого. Концентрация АЦК в столбиках и завязях в течение 7 часов после опыления менялась незначительно и была в 100 раз ниже, чем в рыльцах.

Рыльце являлось основным местом синтеза этилена после обоих типов опыления. Прорастание пыльцы и рост пыльцевых трубок после несовместимого опыления сопровождались в 3 раза большим образованием этилена в системе мужской гаметофит–пестик, чем при совместимом опылении (рис. 7). Полагаем, что повышенный уровень этилена связан с функционированием механизма самонесовместимости (de Nettancourt, 2001; Hua et al., 2008), вследствие которого рост пыльцевых трубок останавливается в проводниковых тканях столбика. В пользу такого предположения могут служить наши данные о том, этилен в высокой концентрации (10 мкл/л) на 45% замедлял скорость роста пыльцевых трубок петунии на среде культивирования (данные не представлены). Как полагают, одной из причин ингибирования роста пыльцевых трубок после самонесовместимого опыления может быть ПКС (Wang et al., 2009;

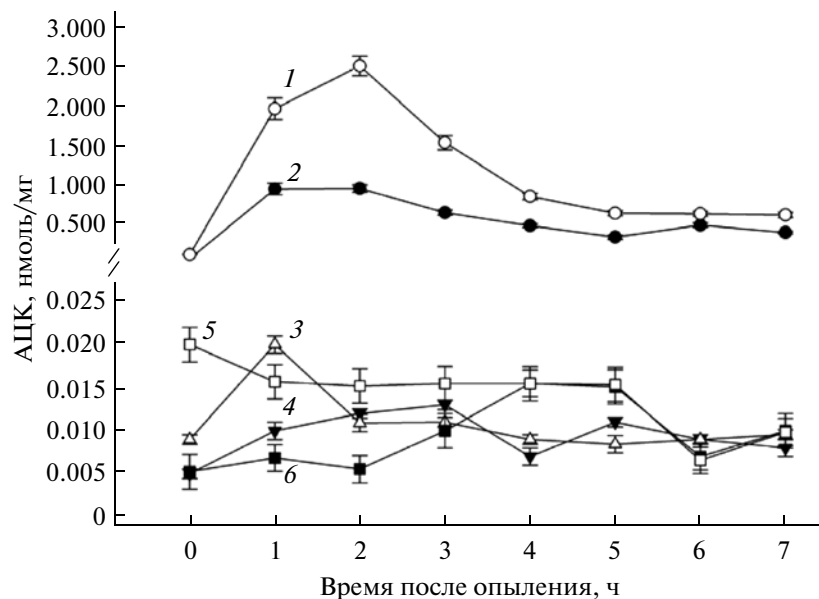


Рис. 6. Динамика АЦК в рыльцах (1, 2), столбиках (3, 4) и завязях (5, 6) петунии после самоопыления самосовместимого (светлые символы) и самонесовместимого (черные символы) клонов.

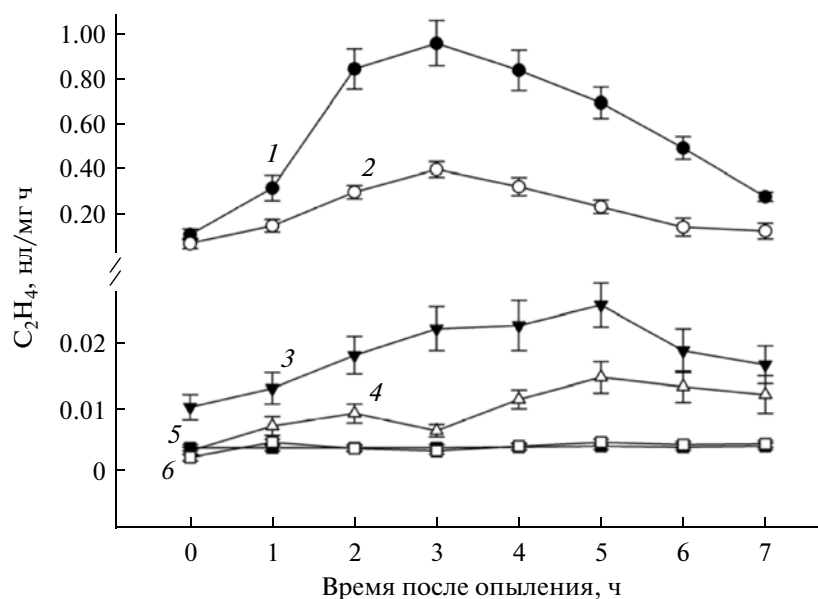


Рис. 7. Выделение этилена рыльцами (1, 2), столбиками (3, 4) и завязями (5, 6) петунии после самоопыления самосовместимого (светлые символы) и самонесовместимого (черные символы) клонов.

Serrano et al., 2010), индуцируемая этиленом (Woltering et al., 1999; Rogers, 2006).

Таким образом, полученные результаты дают основание заключить, что этилен участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие мужской гаметофитной генерации — пыльцы полностью зависит от спорофитных тканей стенки пыльника, в котором осуществляется микроспорогенез, образуются и созревают пыльцевые зерна. Результаты настоящей работы показали, что этилен необходим для ранних стадий микроспорогенеза. Структурные изменения в стенке развивающегося пыльника у фертильных клонов (разрушение тапетума и средних слоев стенки пыльника) сопровождаются повышением выделения этилена на стадиях формирования микроспор и созревания пыльцевых зерен. Обработка бутонов петунии фертильного клона ингибитором синтеза этилена NBD на ранней стадии развития (до инициации Me) приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита. Гибель мужского гаметофита у стерильного клона происходила в профазе мейоза вследствие преждевременного разрушения тапетума и сопровождалась всплеском образования этилена. Высокие концентрации экзогенного этилена приводили к деградации и смерти мужских генеративных клеток фертильного клона на ранних стадиях развития (от мейоза до выхода микроспор из тетрады).

Полагаем, что этилен включается в координацию последовательных событий в пыльнике, необходимых для развития мужского гаметофита, участвуя в инициации ПКС, прежде всего в клетках тапетума.

Согласно полученным в работе данным, *in vitro* прорастание мужского гаметофита петунии сопровождается выделением этилена, образующимся из АЦК, накопленной на завершающих стадиях созревания пыльцевого зерна. Ингибитор синтеза этилена NBD ингибирует прорастание пыльцы.

После опыления пыльцевые зерна прорастают на воспринимающей поверхности рыльца, пыльцевые трубки растут в межклеточном пространстве проводниковой ткани столбика, входят в завязь, доставляя спермии к семязпочке. Компоненты межклеточного матрикса проводниковой ткани пестика чрезвычайно важны для успешного полового воспроизведения. Синтез этилена сопровождается прорастанием и ростом пыльцевых трубок в тканях пестика. Полагаем, что этилен контролирует рост пыльцевых трубок. Кроме этого, наши данные свидетельствуют о возможном участии этилена в механизме гаметофитной самонесовместимости, одного из основных барьеров самооплодотворения.

Суммируя полученные данные, полагаем, что этилен является регулятором гаметофитно-спорофитных взаимодействий в прогамной фазе оплодотворения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Воронков А.С., Ковалева Л.В. Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник—мужской гаметофит у петунии // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 437–444.
- Матвеева Н.П., Старостенко Н.В., Тулеева М.И. и др. Изменение пути развития микроспор табака под влиянием внеклеточных факторов, выделяемых *in vitro* // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 730–734.
- 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.
- Резникова С.А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. М.: Наука, 1984. 270 с.
- Achard P., Baghour M., Chapple A. et al. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem – identity genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 6484–6489.
- Bleecker A.B., Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2000. V. 16. P. 1–18.
- Bui A.Q., O'Neill S.D. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 419–428.
- Butenko M.A., Stenvik G.-E., Alm V. et al. Ethylene-dependent and -independent pathways controlling floral abscission are revealed to converge using promoter::reporter gene constructs in the *ida* abscission mutant // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3627–3637.
- de Nettancourt D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin: Springer-Verlag, 2001. 322 p.
- Goldberg R.B., Beals T.P., Sanders P.M. Anther development: basic principles and practical applications // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1217–1229.
- 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. V. 49. P. 1429–1450.
- Hoekstra A.F., Weges R. Lack of control by early pistillate ethylene of the accelerated wilting of *Petunia hybrida* flowers // Plant Physiol. 1986. V. 80. P. 403–408.
- Holden M.J., Marty J.A., Singh-Cundy A. Pollination-induced ethylene promotes the early phase of pollen tube growth in *Petunia inflata* // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 261–269.
- Hua Z.-H., Fields A., Kao T.-h. Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility // Molecular Plant. 2008. V. 1. P. 575–585.
- 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. V. 3. P. 355–359.
- Kende H. Ethylene biosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. 1993. V. 44. P. 283–307.
- Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H. et al. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development // Plant Cell. 1990. V. 2. P. 1201–1224.
- 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. V. 16. P. 191–196.
- Lin Z., Zhon S., Grierson D. Recent advances in ethylene research // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3311–3336.
- Liu X., Shiomi S., Nakatsuka A. et al. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit // Plant Physiol. 1999. V. 121. P. 1257–1265.
- Lizada M.C., Yang S. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // Anal. Biochem. 1979. V. 100. P. 140–145.
- Nadeau J.A., Zhang X.S., Nair H. et al. Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in the pollination-induced senescence of orchid flowers // Plant Physiol. 1993. V. 103. P. 31–39.
- O'Neill S.D., Nadeau J.A., Zhang X.S. et al. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 419–432.
- Rieu I., Wolters-Arts M., Derksen J. et al. Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco // Planta. 2003. V. 217. P. 131–137.
- Rogers H.J. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? // Ann. Botany. 2006. V. 97. P. 309–315.
- Serrano I., Salvatore P., Adela O. Programmed-cell-death hallmarks in incompatible pollen and papillar stigma cells of *Olea europaea* L. under free pollination // Plant Cell Rep. 2010. V. 29. P. 561–572.
- Shibuya K., Barry K.G., Ciardi J.A. et al. The central role of *PhEIN2* in ethylene responses throughout plant development in petunia // Plant Physiol. 2004. V. 136. P. 2900–2912.
- Singh A., Evensen K.B., Kao T.-h. Ethylene synthesis and floral senescence following compatible and incompatible pollinations in *Petunia inflata* // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 38–45.
- Tang X., Gomes A.M.T.R., Bhatia A. et al. Pistil-specific and ethylene-regulated expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase genes in petunia flowers // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 1227–1239.
- 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. V. 112. P. 503–511.
- Trusov Y., Botella J.R. Silencing of the ACC synthase gene *ACS2* causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. P. 3953–3960.
- Wang C.-l., Xu G.-H., Jiang X.-T. et al. S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia in vitro* // Plant Journal. 2009. V. 57. P. 220–229.
- Weterings K., Pezzotti M., Cornelissen M. et al. Dynamic 1-aminocyclopropane-1-carboxylate-synthase and -oxidase transcript accumulation patterns during pollen tube growth in tobacco styles // Plant Physiology. 2002. V. 130. P. 1190–1200.
- Whitehead C.S., Fujino D.W., Reid M.S. Identification of the ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-

carboxylic acid (ACC), in pollen // *Sci. Hortic.* 1983. V. 21. P. 291–297.

Woltering E.J., de Jong A.J., Yakimova E.T. Apoptotic cell death in plants: the role of ethylene / *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene.* Dordrecht: Kluwer, 1999. P. 209–216.

Woltering E.J., Somhorst D., van der Veer P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 1219–1225.

Xue J., Li Y., Tan F. et al. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene enhanced flower opening // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. P. 2161–2169.

Role of Ethylene in the Control of Gametophyte-Sporophyte Interactions in the Course of the Progamic Phase of Fertilization

L. V. Kovaleva, G. V. Timofeeva, G. B. Rodionova, E. V. Zakharova, and V. Yu. Rakitin

*Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia
e-mail: kovaleva_l@mail.ru*

Abstract—We investigated dynamics of the content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ethylene production in male gametophyte development and germination in fertile (self-compatible and self-incompatible) and sterile clones of petunia. Fertile male gametophyte development was accompanied by two peaks of ethylene production by anther tissues. The first peak occurred during the microspore development simultaneously with the degeneration of both the tapetal tissues and the middle layers of the anther wall. The second peak coincided with dehydration and maturation of pollen grains. In the anther tissues of the sterile line of petunia, tenfold higher ethylene production was observed at the meiosis stage compared with that in fertile male gametophytes. This fact correlated with the degeneration of both microsporocytes and tapetal tissues. Exogenously applied ethylene (1–100 ppm) induced a degradation of the gametophytic generation at the meiosis stage. According to the obtained data, ethylene synthesis in germinating male gametophyte is provided by a 100-fold ACC accumulation in mature pollen grains. The male gametophyte germination, both in vitro, on the culture medium, and in vivo, on the stigma surface, was accompanied by an increase in ethylene production. Depending on the type of pollination, germination of pollen on the stigma surface and the pollen tube growth in the tissues of style were accompanied by various levels of ACC and ethylene release. The male gametophyte germination after self-compatible pollination was accompanied by higher content of ACC as compared with the self-incompatible clone, whereas, after the self-incompatible pollination, we observed a higher level of ethylene production compared with compatible pollination. For both types of pollination, ACC and ethylene were predominantly produced in the stigma tissues. Inhibitor of ethylene action, 2,5-norbornadiene (NBN), blocked both the development and germination of the male gametophyte. These results suggest that ethylene is an important factor in male gametophyte development, germination, and growth at the progamic phase of fertilization.

Keywords: ethylene, male gametophyte, differentiation, germination, growth, sterility, self-incompatibility, petunia.