

Оригинальные работы

УДК 581.154:582.926.2:632.954:576.311.348.7

О.А. СТЕЛЬМАХ, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

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

МУТАНТЫ *NICOTIANA SYLVESTRIS* L., УСТОЙЧИВЫЕ К ИЗОПРОПИЛ-*N*- ФЕНИЛКАРБАМАТУ, ОБЛАДАЮТ ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ ЦОМТОВ



Путем селекции *in vitro* с использованием γ -облучения получены мутанты *N. sylvestris* с устойчивостью к изопропил-*N*-фенилкарбамату (ИФК) — гербициду фенилкарбаматного ряда. Максимальной концентрацией, при которой удалось отобрать способные к регенерации и укоренению в условиях селективного давления мутантные линии *N. sylvestris*, была концентрация 30 мкМ ИФК. Устойчивость к ИФК у полученных мутантов была подтверждена рядом тестов, в частности тестами на способность листовых эксплантов мутантных линий регенерировать растения и их каллусных клеток выживать на средах с селективной концентрацией ИФК, а также с помощью генетического, морфометрического, цитологического и иммунофлюоресцентного анализов. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о повышенной резистентности мутантных растений к указанному антимитотическому веществу по сравнению с контролем. Показано, что в основе устойчивости к ИФК лежит повышенная резистентность ЦОМТов клеток данных линий. Установлено, что приобретенный признак устойчивости наследуется в F_1 и F_2 поколениях мутантов как доминантный ядерный признак.

© О.А. СТЕЛЬМАХ, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2007

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2007. № 6

Введение. *N*-фенилкарбаматы, к которым относятся наиболее распространенные гербициды изопропил-*N*-фенилкарбамат (ИФК) и хлоризопропил-*N*-фенилкарбамат (ХИФК), представляют собой антимитотические соединения, мишенью действия которых являются как центры организации микротрубочек (ЦОМТы), так и/либо микротрубочки. Хотя на сегодняшний день известно, что обработка растений этими веществами приводит к появлению корневого свеллинга и ряда нарушений в митозе [1, 2], их точные механизмы воздействия на цитоскелет растительной клетки до конца не установлены. Ряд данных, например, свидетельствует, что ХИФК нарушает функционирование только ЦОМТов, а не микротрубочек, приводя к фрагментации полюсов веретена деления и формированию трех- либо многополюсных митотических веретен с последующим образованием разветвленных фрагментов [3–5]. Другие данные указывают на то, что ХИФК в зависимости от концентрации может повреждать как ЦОМТы, так и микротрубочки [6]. Некоторые данные также демонстрируют, что ХИФК влияет только на микротрубочки, разрушая их [7] или ингибируя их полимеризацию *in vitro* [8].

Что касается механизма действия ИФК, то известно, что указанное соединение не влияет ни на процессы полимеризации животного тубулина в микротрубочки *in vitro* [9, 10], ни на сборку растительных микротрубочек *in vivo* [9]. Результаты некоторых исследований показывают, что ИФК, как и большинство *N*-фенилкарбаматов, вызывает образование трех- или мультиполярных полюсов у филогенетически отдаленных организмов [11–13]. Однако четких представлений о влиянии ИФК на клетки высших растений на сегодняшний день не существует. Возможно, использование мутантных линий растений с устойчивостью к ИФК позволило бы установить не только механизмы его действия на растительную клетку, но и дополнительно проанализировать функционирование растительных ЦОМТов, которые до сих пор являются недостаточно изученными. Поэтому целью настоящей работы было получение путем селекции *in vitro* мутантных линий *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к гербициду ИФК, и их детальный анализ для выяснения возможных причин приобретения устойчивости к данному соединению.

Материалы и методы. В качестве исходного материала для получения мутантов были использованы мезофильные протопласты гаплоидных растений *N. sylvestris* L. ($2n = 24$), которые изолировали согласно методике, предложенной ранее [14]. Очистку протопластов производили центрифугированием (100 g, 5 мин) и отмыванием в среде W-5 [15]. Мутагенез индуцировали путем γ -облучения взвеси свежеизолированных протопластов (с плотностью $1-2 \cdot 10^6$ клеток/мл) в дозе 15 Гр (^{60}Co , мощность дозы 0,24 Гр/с). Облученные протопласты отмывали, а затем переносили на питательную среду КМ8р [16] для их дальнейшего культивирования (освещение 100–400 лк, температура +25–26 °С).

На стадии 3–5 циклов клеточного деления (через 1 неделю после облучения) применяли селективное давление путем добавления в жидкую питательную среду ИФК в концентрациях 1–100 мкМ. Исходные растворы ИФК (Sigma Chemical Corp., США) готовили на основе 96%-ного этанола и хранили при –20 °С. Гербицид добавляли непосредственно перед проведением эксперимента в охлажденные питательные среды. При этом диапазон концентраций селективного агента определяли исходя из результатов наших предыдущих исследований по селекции мутантных линий растений *N. plumbaginifolia*, устойчивых к ИФК [17]. Спустя 2–3 недели колонии клеток переносили на твердую питательную среду для регенерации растений [17]. Среда содержала 1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л индолил-уксусной кислоты (ИУК) и соответствующие концентрации ИФК для первичного отбора мутантных линий. Выжившие в условиях селективного давления регенеранты в дальнейшем культивировали на безгормональной среде без гербицида (освещение 4000–5000 лк, температура +25–27 °С), как описано ранее [17]. После укоренения мутантные и контрольные растения *N. sylvestris* высаживали в закрытый грунт для их последующего анализа.

Для первичной проверки мутантов на устойчивость к ИФК был проведен анализ способности листовых дисков мутантных и контрольных линий *N. sylvestris* к регенерации растений на средах с селективной концентрацией (30 мкМ) указанного гербицида. Устойчивость к ИФК у полученных мутантов была

также оценена по относительному приросту массы их каллуса в присутствии разных концентраций гербицида через 30 дней культивирования, как описано раньше [17]. Для этого каллус индуцировали из стерильных листовых эксплантов растений на среде RMNO [18], содержащей 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 0,04 мг/л кинетина и 3 мг/л ИУК в темноте при температуре +25 °С.

Для проведения генетического анализа и установления типа мутации нами было осуществлено самоопыление мутантных линий с последующим получением семян. Для анализа наследования устойчивости к ИФК в первом (F_1) и втором (F_2) поколениях мутантных растений *N. sylvestris* полученные семена стерилизовали (70%-ный этанол и 10%-ный раствор гипохлорида натрия) и высаживали на питательные среды, содержащие $1/2$ набора макроэлементов МС [19], $1/10$ набора микроэлементов МС, 10 г/л сахарозы, 1 мг/л витамина B_1 и разные концентрации гербицида. Для стимуляции прорастания семена дополнительно обрабатывали 2%-ным раствором KNO_3 , содержащим 0,5 мг/л гибберелловой кислоты. Опыты проводили с трехкратным повторением, в каждом из которых брали по 300 семян.

Для изучения чувствительности делящихся и растущих клеток к действию ИФК был проведен морфометрический и цитологический анализ корней контрольных и мутантных растений *N. sylvestris*, как описано ранее [20]. Значения коэффициентов корневого свеллинга, наблюдаемого после обработки корней *N. sylvestris* эффективной концентрацией ИФК, рассчитывали по формуле

$$K_{\text{св}} = (D_{\text{ср.обр}} - D_{\text{ср.контр}}) / D_{\text{ср.контр}} \cdot 100 \%,$$

где $D_{\text{ср.контр}}$ – средний диаметр корней в контроле; $D_{\text{ср.обр}}$ – средний диаметр корней, обработанных ИФК.

Относительное количество клеток в метафазе + анафазе рассчитывали как соотношение суммарного количества метафаз и анафаз к суммарному количеству делящихся клеток, умноженное на 100 %. Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно общепринятому методу [21].

Иммунофлюоресцентный анализ чувствительности/устойчивости микротрубочек и ЦОМТов к действию ИФК у полученных мутантов выполняли по методу, описанному ранее [14]. Микротрубочки и ЦОМТы визуализировали с помощью мышиных моноклональных антител TU-01 против α -тубулина и мышиных моноклональных антител TU-31 против γ -тубулина соответственно, любезно предоставленных д-ром П. Драбером (Институт молекулярной генетики, Прага, Чешская Республика). В качестве вторичных антител использовали кроличьи антимышьи ФИТС-конъюгированные антитела («Sigma», США). Для детекции положения ДНК клетки дополнительно окрашивали пропидиум йодидом (1 мкг/мл). Исследования проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM META 510 («Carl Zeiss», Германия).

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенной селекции *in vitro* было установлено, что максимальной концентрацией, при которой удалось отобрать регенерировавшие и укоренившиеся мутантные линии *N. sylvestris*, была концентрация 30 мкМ ИФК (таблица). Максимальный уровень устойчивости указанных мутантов совпадает с уровнем ранее полученных мутантов *N. plumbaginifolia* [17].

Анализ способности листовых эксплантов полученных мутантов регенерировать на средах с ИФК показал, что в присутствии 30 мкМ ИФК на листовых эксплантах мутантов *N. sylvestris* наблюдалось формирование большого количества регенерирующих растений, тогда как у контрольных растений в этих условиях экс-

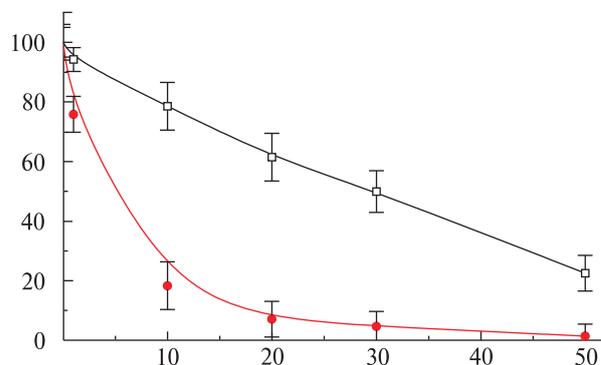


Рис. 1. Относительный прирост массы каллуса, % (по вертикали) контрольной (●) и мутантной (□) линий *N. sylvestris* на средах, содержащих различные концентрации ИФК, мкМ (по горизонтали)

планты уже через несколько дней темнели и впоследствии погибали.

По результатам тестирования каллусов на устойчивость к ИФК было установлено, что каллусные клетки мутантной линии являются примерно в 5–6 раз более устойчивыми к гербициду, чем клетки контрольных растений, что свидетельствует о наличии у них повышенного уровня резистентности по сравнению с контролем (рис. 1). Так, концентрацией, вызывающей гибель 50 % клеток (ЛД₅₀), для клеток каллуса контроля была концентрация 5–6 мкМ ИФК, тогда как для мутанта она составляла 30 мкМ. Сходные результаты по устойчивости к упомянутому гербициду были получены на линиях *N. plumbaginifolia*, устойчивых к 30 мкМ ИФК, после проведения аналогичных тестирований [17].

С помощью генетического анализа нами дополнительно были изучены особенности репродуктивного развития мутантов *N. sylvestris*, устойчивых к ИФК. Проведенные исследования позволили обнаружить ряд нарушений со стороны развития мужской и женской генеративных систем у мутантов [22]. Так, в тапетальном слое стенок пыльников мутантных растений *N. sylvestris* иногда наблюдались трофические изменения ткани — вакуолизация цитоплазмы, образование микроядер и пикноз ядер. Кроме того, во время микроспорогенеза были обнаружены деструктивный цитомиксис, аномальное расхождение хромосом в ходе 1-го и 2-го мейотических делений, выпадение второго деления в одной или обеих диа-

Селекция ИФК-устойчивых линий из протопластов *N. sylvestris*

Концентрация ИФК, мкМ	Количество линий в присутствии ИФК	
	отселектированных	регенерировавших и укоренившихся
1	118	75
10	49	34
20	25	11
30	17	3
50	—	—
80	—	—
100	—	—

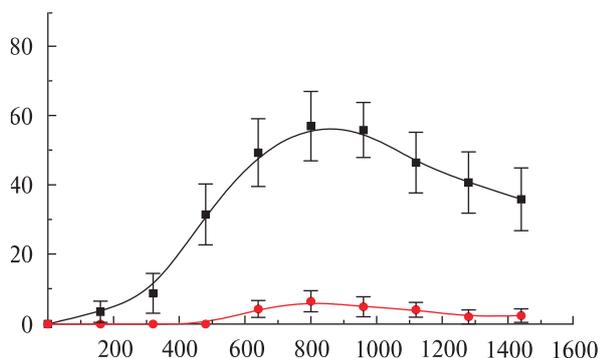


Рис. 2. Профили корневого свеллинга у контрольных (●) и мутантных (■) растений *N. sylvestris*, обработанных ИФК в концентрации 30 мкМ: по вертикали — коэффициент корневого свеллинга, %; по горизонтали — расстояние от кончика корня, мкм

дах, формирование многополюсного веретена деления и образование полиад. Дальнейшее исследование женской генеративной системы обнаружило присутствие в завязи мутанта большого количества неоплодотворенных семязпочек, что вместе с коррелирующей стерильностью пыльцы могло обусловить низкую продуктивность семян мутантных растений. Однако следует отметить, что 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 [22].

Перед выяснением характера наследования признака устойчивости к ИФК у мутантных растений *N. sylvestris* был проведен сравнительный анализ всхожести семян F_1 и F_2 , полученных от самоопыления мутантных и контрольных растений *N. sylvestris*, на средах с ИФК. Семена мутантов, как выяснилось, в условиях селективного давления способны были прорасти только спустя два месяца, хотя в норме без гербицида их прорастание наблюдается уже через неделю после высадки. Результаты проведенных исследований показали, что на 30 мкМ ИФК процент прорастания семян F_1 , полученных от самоопыления мутантных растений, составлял примерно 78,03 %, тогда как семенное потомство F_1 контрольной линии в этих условиях не было способно к развитию.

Фенотипическое расщепление по признаку ИФК-устойчивости у анализируемых самоопыленных мутантов оказалось близким к 3 : 1, что может свидетельствовать о менделевском характере наследования данного признака. Семена F_2 мутантов, полученные от самоопыления потомства F_1 , при прорастании на средах с селективной концентрацией ИФК также сохраняли способность прорасти в присутствии данного вещества. Причем скорость прорастания семян F_2 на 30 мкМ ИФК превосходила таковую семян F_1 . Исходя из полученных данных, мы предполагаем, что устойчивость к ИФК у мутантов наследуется как доминантный ядерный признак. Необходимо отметить, что это первые данные по получению ИФК-устойчивых мутантных растений, у которых удалось провести генетический анализ и изучить характер наследования признака резистентности к упомянутому веществу в поколениях F_1 и F_2 , поскольку ранее подобные попытки не увенчались успехом [17, 23].

Для дальнейшего выяснения механизмов действия ИФК был проведен морфометрический и цитологический анализы корней контрольных и мутантных растений *N. sylvestris*. Результаты проведенных морфометрических исследований показали, что обработка интактных корней *N. sylvestris* эффективной концентрацией (30 мкМ) ИФК приводит к увеличению диаметра кончиков корней у контрольных растений. При этом формирование корневого свеллинга наблюдалось как в меристематической зоне, так и в зоне элонгации корней (100–1550 мкм от кончика корня), а средний коэффициент свеллинга для этих зон составлял $37,39 \pm 8,05$ %. В то же время у мутантных растений незначительный корневой свеллинг был обнаружен только в зоне элонгации (550–1550 мкм от кончика корня), и его коэффициент не превышал $6,56 \pm 0,21$ % (рис. 2). Таким образом, незначительный свеллинг только в зоне элонгации корней ИФК-устойчивых растений, наблюдаемый после обработки 30 мкМ ИФК, подтверждает их низкую чувствительность к действию упомянутого вещества.

Исследование влияния ИФК на деление клеток продемонстрировало значительные нарушения морфологии митотических фигур у контрольных растений *N. sylvestris*. Так, раньшее

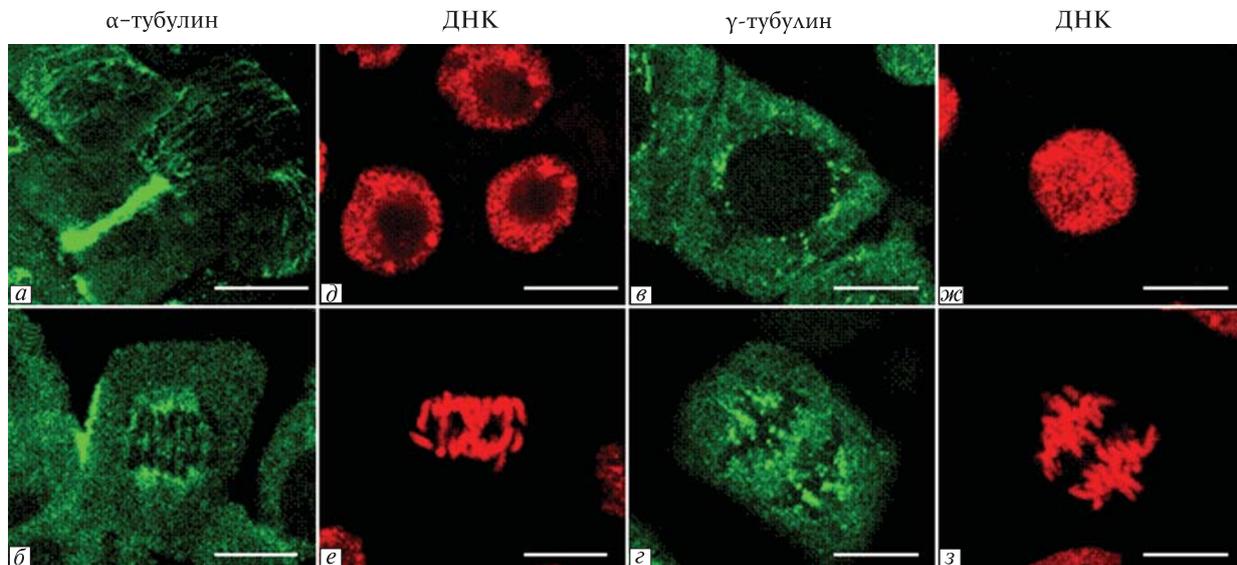


Рис. 3. Результаты визуализации микротрубочек и ЦОМТов с использованием моноклональных антител TU-01 против α -тубулина (а, б), TU-31 против γ -тубулина (в, г) и окрашивание ДНК пропидиум йодидом (д–з) в клетках корней мутантных растений *N. sylvestris*, обработанных 30 мкМ ИФК на протяжении 24 ч: а – кортикальные микротрубочки и препрофазная лента; б – микротрубочки веретена деления; в – локализация γ -тубулина в примембранной области и на периферии ядра в интерфазных клетках; г – локализация γ -тубулина в области полюсных и кинетохорных микротрубочек в делящейся клетке. Масштаб = 10 мкм

нами было показано, что обработка корней чувствительных растений эффективной концентрацией гербицида приводит к появлению трехполюсных ана- и телофаз [20]. Такие нарушения являются типичными для фенилкарбаматных гербицидов [2]. Кроме того, после обработки ИФК было обнаружено постепенное увеличение относительного количества клеток в метафазе + анафазе (от $32,48 \pm 3,13$ без обработки до $80,07 \pm 4,51$ после обработки ИФК), что свидетельствует о формировании у чувствительных растений метафазного блока. В то же время в клетках корней мутантных растений *N. sylvestris* после обработки 30 мкМ ИФК не было найдено аналогичных нарушений в митозе. Полученные результаты также свидетельствуют о повышенной резистентности делящихся клеток мутантных растений *N. sylvestris* к действию ИФК.

Последующий иммунофлюоресцентный анализ с использованием специфических антител против тубулина позволил установить, что без обработки ИФК в клетках корней контрольных и мутантных растений присутствуют нормальные структуры микротрубочек,

свойственные растительным клеткам: кортикальная сетка, препрофазная лента, веретено деления и фрагмопласт (данные не представлены). Обработка корней обеих линий растений 30 мкМ ИФК на протяжении 3, 6, 12 и 24 ч не приводила ни к каким существенным изменениям в организации кортикальных микротрубочек (рис. 3, а и 4, а). Известно, что более чувствительными к действию антимиотрубочковых соединений являются митотические структуры (препрофазная лента, веретено деления и фрагмопласт) [6]. Однако при обработке корней мутантных растений 30 мкМ ИФК на протяжении 3, 6, 12 и 24 ч митотические структуры микротрубочек не повреждались (рис. 3, а, б), тогда как после длительной обработки (30 мкМ ИФК на протяжении 24 ч) корней контрольных растений было обнаружено появление большого количества аномальных митотических фигур. В частности, наблюдали формирование многополюсных веретен деления (рис. 4, б) и разветвленных фрагмопластных структур (Y- и C-подобные фигуры), что является характерным для N-фенилкарбаматных гербицидов и ИФК в частности [11].

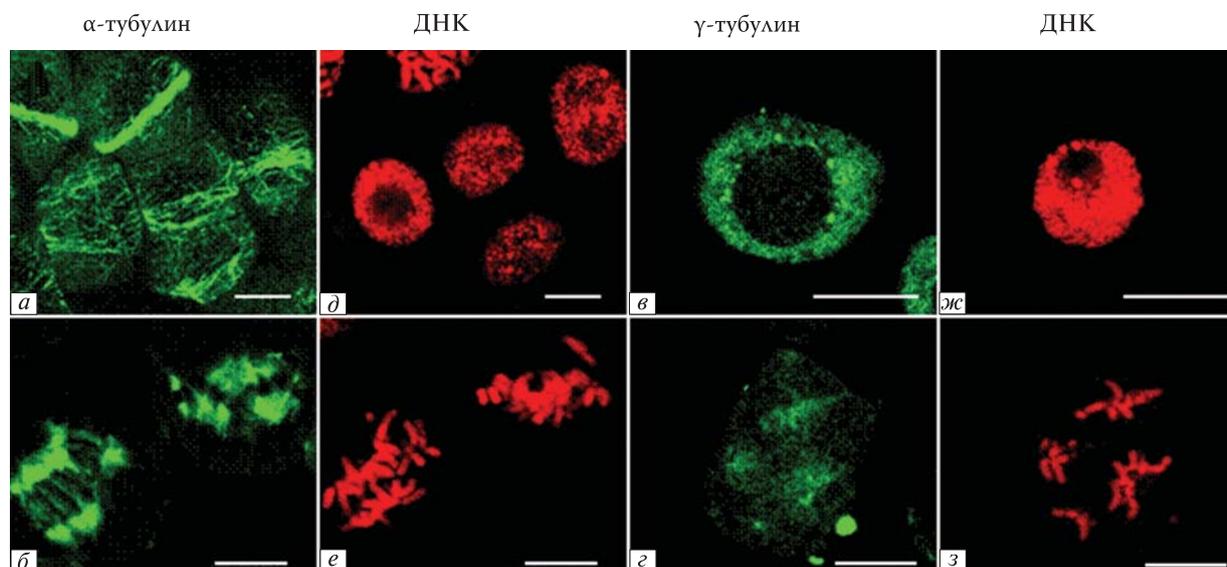


Рис. 4. Результаты визуализации микротрубочек и ЦОМТов с использованием моноклональных антител TU-01 против α -тубулина (а, б), TU-31 против γ -тубулина (в, г) и окрашивание ДНК пропидиум йодидом (б–г) в клетках корней контрольных растений *N. sylvestris*, обработанных 30 мкМ ИФК на протяжении 24 ч: а – кортикальные микротрубочки и препрофазная лента; б – трехполюсные веретена деления; в – дисперсная локализация γ -тубулина в интерфазной клетке; г – локализация γ -тубулина в кинетохорной области трехполюсного веретена деления. Масштаб = 10 мкм

Интересно, что препрофазная лента при аналогичных условиях обработки оставалась нечувствительной к действию упомянутого соединения (рис. 4, а). Полученные нами результаты, наряду с ранее представленными данными [11, 12], позволяют утверждать, что ИФК не разрушает микротрубочки растений, а влияет непосредственно на ЦОМТы растений, вызывая их фрагментацию и последующую дезориентацию уже сформированных микротрубочек.

Кроме того, при тестировании чувствительности непосредственно ЦОМТов к действию ИФК с использованием специфических антител к γ -тубулину нами было установлено, что в контрольных условиях (без обработки ИФК) в клетках корней мутантных и контрольных растений γ -тубулин ко-локализовался со всеми структурами микротрубочек. Так, в интерфазных клетках антитела иммуноокрашивали антигены в виде множественных точек, локализованных как на периферии ядра, так и в примембранной области клетки. При вхождении клеток в профазу свечение антигенов наблюдалось вокруг ядра, образуя полярную шапку, от которой формировались буду-

щие микротрубочки веретена. В митотических клетках, в отличие от интерфазных, наблюдалось точечное свечение на полюсах клеток. Кроме того, сигнал аккумулировался вдоль проксимальных концов тяжей веретена, радиально отходящих от полюсов клетки. Очень четкое и интенсивное окрашивание наблюдалось на кинетохорных микротрубочках и на микротрубочках фрагмопластов (данные не представлены). Аналогичные результаты по образцам окрашивания γ -тубулина в растительных клетках с использованием специфических моноклональных и поликлональных антител к этому белку были получены ранее [24, 25].

После обработки ИФК в клетках корней мутантных линий *N. sylvestris* наблюдалась такая же иммунолокализация γ -тубулина, как и без обработки данным гербицидом, что свидетельствует об устойчивости их ЦОМТов к действию этого соединения (рис. 3). Однако в клетках контрольных линий *N. sylvestris*, обработанных 30 мкМ ИФК, характер окрашивания антигенов был иным: свечение было менее интенсивным в силу более дисперсного распределения γ -тубулина, что, как мы полагаем, является

следствием возникших нарушений в организации ЦОМТов. В клетках, где наблюдался многополюсный митоз, иммуноокрашивание γ -тубулина было сконцентрировано в местах расщепления ЦОМТов (рис. 4, з). Полученные данные еще раз подтверждают предположение о том, что мишенью действия ИФК в растительной клетке являются ЦОМТы, а не непосредственно микротрубочки.

Таким образом, нами впервые в условиях *in vitro* получены мутантные растения *N. sylvestris*, устойчивые к фенилкарбаматному соединению – ИФК, и с помощью ряда анализов продемонстрировано, что в основе устойчивости лежит повышенная резистентность ЦОМТов клеток данных линий к его действию. Установлено, что приобретенный признак устойчивости к ИФК наследуется в F₁ и F₂ поколениях мутантов как доминантный ядерный признак.

SUMMARY. By *in vitro* selection using γ -irradiation the *N. sylvestris* mutants resistant to isopropyl-N-phenylcarbamate (IPC) – herbicide from phenylcarbamate class have been obtained. Maximal concentration, at which *N. sylvestris* mutant lines were able to regenerate and induce root formation under selective pressure, was concentration of 30 μ M IPC. IPC-resistance of mutants was confirmed by different tests, in particular by tests on an ability of their leaf explants to regenerate plantlets, and of their callus cells to survive on media with selective concentration of IPC; and also by genetic, morphometric, cytological and immunofluorescence analyses. The obtained results shown an increased resistance of mutant lines to this antimetabolic drug action as compared to the control. It was shown that an increased resistance of MTOCs in the cells of these lines is a basis of IPC-resistance formation. It was established that acquired trait of the resistance is inherited in F₁ and F₂ generations of mutants as dominant nuclear trait.

РЕЗЮМЕ. Шляхом селекції *in vitro* з використанням γ -опромінення отримано мутанти *N. sylvestris* зі стійкістю до ізопропил-N-фенілкарбамату (ИФК) – гербіциду фенілкарбаматного ряду. Максимальною концентрацією, при якій вдалось відібрати мутантні лінії *N. sylvestris*, здатні до регенерації та укорінення в умовах селективного тиску, була концентрація 30 мкМ ИФК. Стійкість до ИФК у отриманих мутантів була підтверджена рядом тестів, зокрема тестами на здатність листових експлантів мутантних ліній регенерувати рослини і їх калусних клітин виживати на середовищах із селективною концентрацією ИФК, а також за допомогою генетичного, морфометричного, цитологічного та імунофлуоресцентного аналізів. Результати

проведених досліджень свідчать про підвищену резистентність мутантних рослин до даної антимиотичної сполуки порівняно з контролем. Показано, що в основі стійкості до ИФК лежить підвищена резистентність ЦОМТів клітин даних ліній. Встановлено, що набута ознака стійкості успадковується в F₁ і F₂ поколіннях мутантів як доміантна ядерна ознака.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morejohn L.C., Fosket D.E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // Pharm. Ther. – 1991. – 51. – P. 217–230.
2. Vaughn K.C. Anticytoskeletal herbicides // Plant microtubules: potential for biotechnology / Ed. P. Nick. – Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2000. – P. 193–205.
3. 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.
4. Gunning B.E., Wick S.M. Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis // J. Cell Sci. Suppl. – 1985. – 2. – P. 157–179.
5. Lehnen L.P., Vaughan M.A., Vaughn K.C. Terbutol affects spindle microtubule organizing centres // J. Exp. Bot. – 1990. – 41, № 226. – P. 537–546.
6. Hoffman J.C., Vaughn K.C. Mitotic disrupter herbicides act by a single mechanism but vary in efficacy // Protoplasma. – 1994. – 179. – P. 16–25.
7. 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.
8. Morejohn L.C., Fosket D.E. Tubulins from plants, fungi and protists: a review // Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton. – New York : Plenum Press, 1986. – P. 257–329.
9. Bartels P.G., Hilton J.L. Comparison of trifluralin, oryzalin, pronamide, propham, and colchicine treatments on microtubules // Pest. Biochem. Physiol. – 1973. – 3. – P. 462–472.
10. Coss R.A., Bloodgood R.A., Brower D.L., Pickett-Heaps J.D., McIntosh J.R. Studies on the mechanism of action of isopropyl N-phenyl carbamate // Exp. Cell Res. – 1975. – 92. – P. 394–398.
11. Hepler P.K., Jackson W.T. Isopropyl N-phenylcarbamate affects spindle microtubule orientation in diving endosperm cells of *Haemanthus katerina* Baker // J. Cell Sci. – 1969. – 5. – P. 727.
12. Coss R.A., Pickett-Heaps J.D. The effects of isopropyl N-phenyl carbamate on the green alga *Oedogonium cardiacum* // J. Cell. Biol. – 1974. – 63. – P. 84–98.
13. Oliver J.M., Krawiec J.A., Berlin R.D. A carbamate herbicide causes microtubule and microfilament disruption and nuclear fragmentation in fibroblasts // Exp. Cell Res. – 1978. – 116. – P. 229–237.
14. Blume Ya.B., Strashnyuk N.M., Smertenko A.P., Solodu-

- shko V.G., Sidorov V.A., Gleba Yu.Yu. Alteration of β -tubulin in *Nicotiana plumbaginifolia* confers resistance to amiprofos-methyl // Theor. Appl. Genet. – 1998. – 97, № 3. – P. 464–472.
15. Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // Theor. Appl. Genet. – 1981. – 59, № 1. – P. 191–195.
 16. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. – 1975. – 126, № 1. – P. 105–110.
 17. Емец А.И., Милейко А.А., Блюм Я.Б. Получение мутантов *Nicotiana plumbaginifolia* L., устойчивых к гербициду изопропил-*N*-фенилкарбамату // Доп. НАН України. – 2000. – № 10. – С. 182–187.
 18. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. – К.: Наук. думка, 1985. – 132 с.
 19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.
 20. Yemets A., Stelmakh O., Kundelchuk O., Blume Ya.B. Obtaining and analysis of isopropyl-*N*-phenyl carbamate resistant lines of *Nicotiana* species // Cell Biol. Int. – 2003. – 27, № 3. – P. 307–310.
 21. Плохинский Н.А. Биометрия. – Новосибирск: Наука, 1961. – С. 101–157.
 22. Стельмах О.А., Кравец Е.А., Емец А.И., Блюм Я.Б. Особенности репродуктивного развития мутантов *Nicotiana sylvestris*, устойчивых к изопропил-*N*-фенилкарбамату // Цитология и генетика. – 2005. – 39, № 6. – С. 15–23.
 23. Aviv D., Galun E. Isolation of tobacco protoplasts in the presence of isopropyl-*N*-phenyl carbamate and their culture and regeneration into plants // Z. Pflanzenphysiol. – 1977. – 83. – P. 267–273.
 24. Liu B., Marc J., Joshi H.C., Palevitz B.A. A γ -tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in cell cycle-dependent manner // J. Cell Sci. – 1993. – 104. – P. 1217–1228.
 25. Binarova P., Hause B., Dolezel J., Draber P. Association of gamma-tubulin with kinetochore/centromeric region of plant chromosomes // Plant J. – 1998. – 14. – P. 751–757.

Поступила 02.04.07