

На правах рукописи

УДК 631.526.323:633.415:576.53



Юданова Софья Станиславовна

**Миксоплоидия клеточных популяций сахарной
свеклы и ее связь с репродуктивными признаками**

03.00.15 - Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2004

Работа выполнена в лаборатории популяционной генетики растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Малецкий С.И.
Институт цитологии и генетики СО РАН
г. Новосибирск

Официальные оппоненты: доктор сельскохозяйственных наук, профессор
Буренин В.И.
ГНЦ РФ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова
г. Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор
Пыжинков В.И.
Санкт-Петербургский государственный аграрный университет
г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Институт Общей Генетики РАН
Г.Москва

Защита диссертации состоится "28" мая в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 006.041.01 при ГНЦ ВНИИР им. Н.И. Вавилова по адресу: 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ВНИИР им. Н.И. Вавилова.

Автореферат разослан "21" апреля 2004г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

Э.А. Гончарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Многие признаки и свойства организменного уровня у покрытосеменных растений определяются изменчивостью нуклеарных признаков. К их числу относятся такие признаки как число ядер в клетке, число геномов на ядро, число копий хроматид в хромосомах и др.

Закон постоянства числа хромосом в ядрах клеток был сформулирован в конце XIX века (Вермель Е.М., 1970). Однако в клеточных популяциях может наблюдаться миксоплоидия, когда наряду с доминирующей фракцией встречаются клетки, где число хромосом в ядрах меньше или больше их основного числа. Миксоплоидия клеточных популяций может быть как с эуплоидными, так и с анеуплоидными числами хромосом в ядрах. В данной работе речь будет идти только об эуплоидной миксоплоидии. Один из путей возникновения миксоплоидности клеток - эндомитоз (редупликация хромосом не сопровождается кариокинезом). В этом случае образуются эндополиплоидные клетки, у которых число хромосом кратно увеличено по сравнению с основным набором. Второй путь возникновения миксоплоидности клеток - редукция числа хромосом в соматических клетках, в результате которой образуются эндогаплоидные клетки. Это происходит, если кариокинезу не предшествовала фаза удвоения числа хромосом.

Для покрытосеменных растений явление миксоплоидии универсально: у диплоидных растений гаметофиты гаплоидные, меристемы диплоидные, а в дифференцированных тканях наблюдается соматическая полиплоидия (полисоматия) (Липаева Л.И., 1962; Р.Л Берг, 1993). Увеличение дозы геномов на ядро создает новые условия экспрессии генов, и полиплоидию можно рассматривать как эпимутагенный фактор. Эволюция покрытосеменных растений идет в значительной мере путем смены уровней ploидности геномов с помощью как полиплоидизации, так и деплоидизации в пределах биологически оптимального уровня ploидности (Хохлов С.С., 1965). При повышении уровня миксоплоидности возрастает вероятность попадания полиплоидных клеток в зародышевый путь и формирование полиплоидных мега- и микроспор, в частности, мега- и микроспор с соматическим числом хромосом. Идея о связи миксоплоидии и гамет с соматическим числом хромосом была высказана еще в 30-х годах (Лусс А.И., 1935). Сегодня эта тема, формирование 2п гамет, интенсивно изучается во всем мире.

Существует взаимосвязь между изменчивостью нуклеарных признаков в популяциях клеток и изменчивостью репродуктивных признаков растений (Малецкий С.И., Колодяжная Я.С., 1999). Если меристематическая ткань представлена ди- и тетраплоидными клетками, то создается гетероплоидная популяция мегagamетофитов: одна часть будет иметь редуцированное гаплоидное число хромосом, другая часть — редуцированное диплоидное число хромосом. Если в популяции преобладает свободное переопыление, то отбор благоприятствует развитию эмбрионов из диплоидных зигот. Если же гаплоидная пыльца отсутствует (беспыльцевой режим репродукции), то потомство диплоидного растения может быть представлено гаплоидами и дигаплоидами. При одновременном развитии гаплоидных и дигаплоидных эмбрионов преимущество получают дигаплоиды, обладающие сбалансированными наборами хромосом.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы — изучить миксоплоидию у сахарной свеклы и исследовать некоторые причины ее возникновения. Изменчивость клеточных популяций по уровню ploидности геномов позволяет изучать связь мик-

соплоидии с фенотипическими признаками растений, в частности, с изменчивостью репродуктивных признаков. В диссертационной работе были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменчивость клеточных популяций по числу ядер в клетке (одно- и многоядерность клеток).
2. Исследовать изменчивость клеточных популяций по числу геномов на ядро (миксоплоидия).
3. Оценить роль способов репродукции (гибридизация, инбридинг, апозиготия) на миксоплоидность клеточных популяций.
4. Разработать косвенные методы описания миксоплоидии клеточных популяций.
5. Разработать экспериментальные методы изменения уровня миксоплоидии клеточных популяций.
6. Исследовать связь уровня миксоплоидии с репродуктивными признаками растений: а) с завязываемостью семян апозиготическим способом (партеногенез); б) со временем вступления растений в фазу цветения; в) с формированием различных типов цветonoсных побегов растениями ("цветущие", "упрямцы", "холостяки"); г) с вариацией числа цветков в частных соцветиях у свеклы.

Научная новизна. Впервые показано, что инбридинг приводит к повышению уровня миксоплоидии, а гибридизация (свободное опыление) - к ее снижению. Линии склонные к партеногенетическому завязыванию семян (апозиготия) имеют более высокий уровень миксоплоидности клеточных популяций, чем линии, размножающиеся путем перекрестного опыления. Впервые показано, что эпимутаген 5-азациитидин снижает уровень миксоплоидности клеточных популяций у растений сахарной свеклы.

Практическая ценность. В работе показана связь признаков клеточного уровня с репродуктивными признаками растений. Разработан метод повышения доли гамет с соматическим числом хромосом. Повышая миксоплоидность клеточных популяций, можно получать растения, формирующие 2n гаметы с достаточно высокой частотой. Предложены различные способы изучения миксоплоидии. В работе также показана связь эпигенетической изменчивости и миксоплоидии с репродуктивными признаками растений: длительностью периода вегетации, временем вступления растения в фазу цветения и склонностью растений к партеногенетическому формированию семян (апозиготия).

Апробация работы. Результаты работы докладывались на российских и международных конференциях: научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.Л. Мазлумова, Рамонь, 1996; XXXVI Международной научной студенческой конференции, Новосибирск, 1998; 2-м съезде ВОГиС, Санкт-Петербург, 2000; Mendel Centenary Congress, Brno, Czechia 2000; XVIIth International Congress on Sexual plant reproduction, Lublin, Poland 2003.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы. Работа изложена на 108 старницах машинописного текста и содержит 14 таблиц, 17 рисунков, 5 фотографий, 12 приложений. Библиографический указатель включает 125 источников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал

В работе использовали различный по происхождению и способу репродукции диплоидный материал сахарной свеклы из коллекции лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН. Материалом для исследования служили:

1. Две мужскостерильные линии с признаком ЦМС, контрастные по склонности к апозиготическому завязыванию семян: *mcCOAH-41* (склонна) и *mcCOAH-210* (склонность выражена очень слабо).
2. Апозиготические потомства семи растений линии *mcKHBC2* польской селекции.
3. Синтетическая популяция *РИС* и ее самоопыленные потомства различной глубины инбридинга: I_0 - исходная популяция РНС, полученная от свободного переопыления РЦ линий селекции ИЦиГ СО РАН и ВНИИСС; I_1 - потомство от однократного самоопыления; I_2 - потомство от двукратного самоопыления; G_1 - потомство от однократного внутрилинейного (брат-сестринского) размножения; G_2 - потомство от двукратного внутрилинейного (брат-сестринского) размножения.
4. Инбредные линии *COAH-241* и *742-24-8* после 5-6 поколений инбридинга, созданные на основе РЦ материалов, полученных из НИИ Свекловодства ГДР.
5. Гибриды сахарной свеклы: а) синтетический гибрид *H1* селекции ВНИИСС; межлинейный гибрид на стерильной основе *H2* (*mc704-8* x *741-1-21*), полученный от скрещивания двух инбредных линий из НИИ Свекловодства ГДР.
6. Апозиготические (партеногенетические) потомства пыльцестерильных растений межлинейного гибрида *H2*.
7. Инбредная линия *mcCOAH-31* и ее гибрид *mcCOAH-31* x *PEK-45*.

Для обозначения однородительской (апозиготической) семенной репродукции были использованы следующие символы: A_i - поколение апозиготической репродукции, индекс (i) обозначает номер поколения; C_i - указывает номер миксопloidного поколения; Az_i - поколения репродукции после обработки 5-азацитидином (5-azaC). Итак, A_0 - контрольные растения; A_0C_0 - растения, обработанные колхицином; A_1 — апозиготическое поколение; A_1C_1 - апозиготическое поколение, полученное от растений A_0C_0 ; A_1Az_0 - растения A_1 , обработанные 5-azaC; A_2Az_1 - апозиготическое поколение, полученное от растений A_1Az_0 ; $A_1C_1Az_0$ - растения A_1C_1 , обработанные 5-azaC; $A_2C_2Az_1$ - апозиготическое поколение, полученное от растений $A_1C_1Az_0$.

Методы исследования.

Содержания ДНК в ядре. Содержание ДНК измеряли в ядрах клеток зародышевых корешков, зафиксированных в смеси Карнуа. Для выявления ДНК в ядре проводили реакцию Фельгена, включающая горячий гидролиз и окрашивание стандартным методом (Паушева З.П., 1980). Массу ДНК измеряли двухволновым методом абсорбционной цитофотометрии на однолучевом цитофотометре конструкции Шерудио А.И. (Шерудио А.И., 1968). Массу ДНК оценивали в единицах оптической плотности. Минимальная масса ДНК, обнаруживаемая в гаплоидных ядрах, была взята за точку отсчета, равную 1С (Шерудио А.И., 1968; Мендельсон, 1969).

Подсчет числа хромосом. Прямой подсчет числа хромосом проводился на листовых точках роста, зафиксированных в смеси Карнуа. Хромосомы окрашивали ацетокармином по стандартной методике (Паушева З.П., 1980). На каждом препарате подсчитывались хромосомы в 10 делящихся клетках.

Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. У растений первого года жизни в исследование брали листья через 6-8 недель после всходов. У растений второго года жизни - розеточные листья во второй половине фазы нарастания листьев и стеблеобразования, в первой половине фазы стеблеобразования и цветения. Для окрашивания хлоропластов в замыкающих клетках устьиц на эпидерму, снятую с нижней стороны листа, наносили каплю раствора AgNO_3 . По каждому препарату подсчитывали хлоропласты в 50 - 100 клетках.

Экспериментальное изменение миксоплоидности клеточных популяций. Обработка растений колхицином. Наклонувшиеся семена замачивали на сутки в 0,1% растворе колхицина (опыт) и в дистиллированной воде (контроль). После этого семена высевали в грунт. Обработка растений 5-азациридином. Наклонувшиеся опытные семена оставляли на 24 часа при комнатной температуре в 0,5 μM растворе 5-азациридина (5-azaC), контрольные семена оставались в дистиллированной воде. Затем семена высевались в грунт.

Апозиготический способ получения семян у сахарной свеклы. Для получения апозиготических семян использовали пыльцестерильные инбредные линии с признаком цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС). Пыльцестерильные растения выращивали на изолированном участке в беспыльцевом режиме. Чтобы избежать пылевого загрязнения от растений с опытного участка проводили строгую браковку растений по фенотипу пыльцевых зерен. На поле оставляли только растения с полностью дефектной пыльцой - фенотипы мс0 и мс1 по классификации Оуэна (Owen F.V., 1945). По завершению цветения и созревания плодов, с каждого растения проводили индивидуальную уборку. Потомства, получаемые при беспыльцевом режиме семенной репродукции, являются по большей части дигаметоидными, которые образуются из диплоидных яйцеклеток, сформированных из диплоидных мегаспор, возникших, в свою очередь, из тетраплоидных мейоцитов.

Динамика цветения и формирование цветonoсных побегов. Наблюдения за началом цветения осуществляли в течение 60 дней с момента распускания первых цветков. Растения подразделяли по дате цветения и по типу цветonoсного побега: «цветущие» - формируют цветonoсный побег с множеством цветков; «холостяки» - формируют цветonoсный побег без цветков; «упрямцы» - формируют только розетку листьев без цветonoсного побега.

Статистические методы. Достоверность различий между эмпирическими распределениями оценивалась с помощью критериев G и χ^2 (Пирсона) для многопольных таблиц. Сравнение дисперсий проводилось с помощью критерия Фишера; средних - с помощью критерия Стьюдента ("t-критерий"); выборочных долей - с помощью u -критерия (Урбах В.Ю., 1964; Лакин Г.Ф., 1968; Weber E., 1986).

Распределение числа хлоропластов оценивали по следующим статистическим параметрам: а) среднее число хлоропластов на клетку (M); б) среднее значение биномиального распределения (\bar{x}) и дисперсия экспериментального ряда (σ^2); в) устанавливали тип биномиального распределения - недорассеянное распределение (биномом с целым положительным показателем степени, $\sigma^2 / \bar{x} < 1$); перерассеянное распределение (биномом с отрицательным или дробным показателем степени, $\sigma^2 / \bar{x} > 1$), распределение Пуассона ($\sigma^2 / \bar{x} \approx 1$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Изменчивость содержания ДНК в ядрах.

Содержание ДНК в ядре зависит от: а) числа геномов в ядре; б) степени поли-тенизации хромосом; в) стадии митотического цикла. Основную часть в клеточной популяции составляют клетки в стадии интерфазы и профазы, поэтому самые многочислен- ные измерения проводились на ядрах таких клеток. У линии мсСОАН-210 масса ДНК определена в 807 ядрах, а у линии мсСОАН-41 в 833 ядрах. Кроме этого, содержание ДНК измерялось в клетках на стадии метафазы и телофазы.

Таблица 1

Содержание ДНК в ядрах зародышевых корешков сахарной свеклы линий СОАН-210 и СОАН-41 на стадии профазы и интерфазы.

Линия	Содержание ДНК в ядрах									Общее число ядер
	1С	2С	4С	8С	16С	32С	64С	128С	256С	
СОАН-210	34	102	210	281	146	27	5	2	0	807
СОАН-41	1	13	98	203	242	187	78	9	2	833
Σ	35	115	308	484	388	214	83	11	2	1640

В клетках линии СОАН-210 на стадии профазы и интерфазы встречаются ядра с массой ДНК от 1С до 128С на ядро, а в клеточных популяциях линии СОАН-41 от 1С до 256С (табл. 1). У линии СОАН-210 среднее содержание ДНК на ядро составило 8,8С, а у линии СОАН-41 - 22,3С. Хотя сравниваемые линии диплоидные ($2x = 18$), масса ДНК в ядрах СОАН - 41 более чем в два с половиной раза больше, чем у СОАН-210. Статистическая оценка эмпирических распределений свидетельствует, что различие между вариантами достоверно ($G = 414,907$, $P > 0,999$).

Не менее существенными оказались различия по изменчивости содержания ДНК в клетках на стадии метафазы (табл. 2). У линии СОАН-210 содержание ДНК варьировало от 1С до 32С, а у СОАН-41 - от 4С до 256С. В этом случае среднее содержание ДНК на клетку у линии СОАН-41 было в 4,7 раза больше, чем у СОАН-210. Оценка достоверности различий между опытами свидетельствует, что распределение массы ДНК на стадии метафазы у двух линий неслучайное ($G = 45,123$; $P > 0,999$).

Таблица 2

Содержание ДНК в клетках зародышевых корешков сахарной свеклы у линий СОАН-210 и СОАН-41 на стадии метафазы.

Линия	Содержание ДНК									Общее число ядер
	1С	2С	4С	8С	16С	32С	64С	128С	256С	
СОАН-210	1	1	10	8	7	5				32
СОАН-41			3	11	43	31	13	14	1	116
Σ	1	1	13	19	50	36	13	14	1	148

На стадии телофазы содержание ДНК у обеих линий варьировало от 1 с до 32с (табл.3). При этом наблюдалась такая же тенденция: содержание ДНК в телофазных клетках линии СОАН-41 более чем в два раза превышало аналогичный показатель у СОАН-210. Оценка эмпирических распределений свидетельствует, что распределение массы ДНК по двум линиям неслучайное ($G = 48,795$; $P > 0,999$).

Варьирование содержания ДНК на стадии телофазы зависит как от массы ДНК в ядре родительской клетки, так и от точности распределения хроматид при расхо-

ждении хромосом. При редупликации хромосом и последующем кариокинезе, дочерние клетки должны иметь одинаковое содержание ДНК. Однако это наблюдали не всегда. У линии СОАН-210 из тридцати девяти клеток в двадцати семи оба дочерних ядра в телофазе имели одинаковое содержание ДНК, а в двенадцати - разное. У линии СОАН-41 из восьмидесяти двух клеток только в восемнадцати клетках содержание ДНК в дочерних ядрах оказалось равным, а в 64 клетках наблюдались довольно большие различия. Равными по массе считали ядра, если значения массы ДНК в единицах оптической плотности были либо полностью идентичными, либо отличались между собой незначительно (до 5% от наименьшего значения массы в одном из дочерних ядер). В некоторых клетках различия по массе дочерних ядер были достаточно велики (в несколько раз). У линии СОАН-210 обнаружено три клетки, с большими различиями в содержании ДНК в дочерних ядрах (1С-2С; 2С-4С; 4С-8С). Для СОАН-41 отмечена гораздо более высокая варибельность: 4 клетки (2С-4С), 10 клеток (4С-8С), 6 клеток (8С-16С), а в двух клетках отмечена еще большая разница 8С-32С и 4С-16С. Оценка достоверности различий между вариантами опыта свидетельствует, что точность распределения ДНК в телофазных ядрах зависит от генотипа линии: $\chi^2 = 25,293$ ($\chi^2_{0,999} = 10,8$, $df = 1$).

Таблица 3

Содержание ДНК в ядрах зародышевых корешков сахарной свеклы линий СОАН-210 и СОАН-41 на стадии телофазы.

Линия	число ядер с массой ДНК:						Итого
	1С	2С	4С	8С	16С	32С	
СОАН-210	13	32	18	9	4	2	78
СОАН-41	0	6	69	59	25	5	164
Итого	13	38	87	68	29	7	242

Как видно из приведенных результатов, изменчивость содержания ДНК в клетках у сахарной свеклы является нормой. Диапазон изменчивости зависит от исходного материала, взятого в опыт, т.е. содержание ДНК на ядро - это нуклеотипическая характеристика как линии, так и отдельного растения.

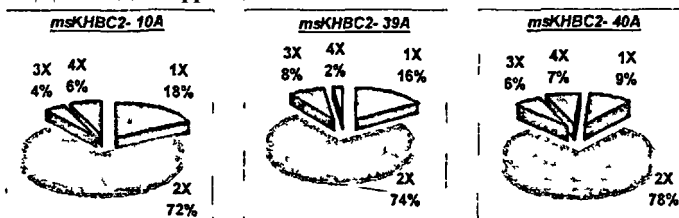
2. Изменчивость числа хромосом и числа ядер в клетках сахарной свеклы.

Иллюстрацией исследований миксоплоидности клеточных популяций сахарной свеклы, проведенных с помощью прямого подсчета числа хромосом, являются данные, представленные на рисунке 1. У диплоидных растений клеточные популяции должны состоять на 100% из диплоидных клеток. Однако в апозиготических потомствах диплоидной линии мсКНВС2 наблюдалась миксоплоидность клеточных популяций. Растения разделились на три группы в зависимости от доли диплоидной фракции (u-критерий). Первая группа представлена потомствами с диплоидной фракцией клеток от 71% до 80% (рис.1 А); вторая группа - с диплоидной фракцией 61-71% (рис.1 Б); третья - с диплоидной фракцией менее 60% (рис.1 В). Выделим два потомства: 1) мсКНВС2 - 6А, относящееся ко второй группе, у которого в клеточной популяции присутствует достаточно высокий процент гаплоидной фракции клеток (30%); 2) мсКНВС2-37А, являющееся единственным представителем третьей группы, у которого в клеточной популяции присутствует достаточно высокий процент триплоидной фракции (30%).

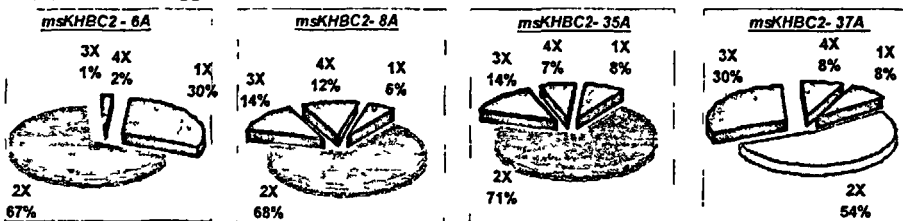
Изучение явления многоядерности на этом же материале представлено в таблице 4. Как и следовало ожидать, более 90% клеток почти во всех вариантах были одноядерными. Исключением является потомство мсКНВС2-39А: доля одноядерных клеток здесь составила лишь немного более 60%, а доля двухъядерных достигала 35%. Встречались растения, у которых в клеточной популяции присутствовали единичные клетки с большим числом ядер: трех-, четырех-, пяти- и даже шести-ядерные клетки.

Рис. 1. Изменчивость числа геномов на клетку в апозиготических потомствах диплоидной пыльцестерильной линии мсКНВС2

А. Диплоидная фракция 71-80%



Б. Диплоидная фракция 60-71%



В. Диплоидная фракция менее 60%

Таблица 4
Изменчивость числа ядер на клетку в апозиготических потомствах пыльцестерильной линии мсКНВС2

Потомство	число ядер на клетку, %						Число учтенных клеток
	1 ядро	2 ядра	3 ядра	4 ядра	5 ядер	6 ядер	
мсКНВС2 - 6А	92,2	7,8	—	—	—	—	284
мсКНВС2 - 8А	93,1	5,8	0,7	0,4	—	—	725
мсКНВС2- 10А	94,8	4,9	0,3	—	—	—	1183
мсКНВС2- 35А	84,2	13,6	1,5	0,4	0,2	0,1	1129
мсКНВС2- 37А	92,1	7,3	0,6	—	—	—	355
мсКНВС2- 39А	60,7	34,9	3,2	1,2	—	—	873
мсКНВС2- 40А	92,2	7,3	0,4	0,1	—	—	2009
Итого, %	90,18	8,75	0,81	0,23	0,021	0,01	9597

Итак, несмотря на то, что исследуемая линия диплоидна, ей присуща миксополиплоидность и многоядерность клеток. В клеточных популяциях ее апозиготических потомств наряду с диплоидными присутствуют гаплоидные, три- и тетраплоидные клетки. Более того, в некоторых потомствах наблюдаются существенные отклонения: а) наличие достаточно большой доли гаплоидных клеток (30%) у мсКНВС2 - 6А; б) наличие достаточно большой доли триплоидных клеток

(30%) у мсКНВС2-37А. Вероятно, система репродукции, а именно инбридинг, поскольку исследовалась именно инбредная линия, ведет к различным нарушениям, приводящим к изменению состава клеточной популяций.

3. Влияние способа репродукции, длительности жизненного цикла, обработки растений колхицином, 5-*aza*C на миксоплоидность клеточных популяций.

Влияние инбридинга и гибридизации на миксоплоидность клеточных популяций. Влияние инбридинга на миксоплоидность клеточных популяций сахарной свеклы исследовали на растениях популяции РНС (I_0) и линиях различного уровня инбридинга, полученных на основе этой популяции (I_1 ; I_2 ; I_2G_1 ; I_2G_2). В таблице 5 представлены данные цитологических исследований верхушечных меристем листьев (подсчет числа хромосом), проведенных на этом материале. Как следует из наблюдений, популяции метафазных клеток представлены гаплоидными, диплоидными, триплоидными и тетраплоидными клетками, т.е. в верхушечных меристемах наблюдается процесс как эндополиплоидизации, так и редукции числа хромосом (эндогаплоидные клетки). Даже в норме (I_0) митотические деления идут с нарушениями, приводящими к возникновению гаюю-, три- и тетраплоидных клеток. С углублением инбридинга (I_1 ; I_2 ; I_2G_1 ; I_2G_2) нарушения усугубляются: доля гаплоидных и диплоидных клеток падает, а доля три- и тетраплоидных клеток возрастает. Оценив эмпирические распределения числа хромосом на ядро с помощью критерия G, получим: а) различия между " I_0 " и " I_2 , I_2G_1 , I_2G_2 " достоверны с вероятностью превышающей 99,9%; б) различия между " I_0 " и " I_1 " достоверны при $P > 0,95$. Данные этой таблицы коррелируют с результатами изменчивости числа хлоропластов в замыкающих устьичных клетках (табл. 6).

Таблица 5

Изменчивость числа геномов на ядро в метафазных клетках верхушечных меристем в популяции РНС и у линий разного уровня инбридинга.

Образец	Плоидность клеток				Всего клеток
	1x	2x	3x	4x	
I_0	17 (12,1%)	114 (81,43%)	4 (2,86%)	5 (3,6%)	140
I_1	30 (9,61%)	235 (75,32%)	14 (4,49%)	33 (10,58%)	312
I_2 ; I_2G_1 ; I_2G_2	37 (8,22%)	320 (71,11%)	24 (5,33%)	69 (15,33%)	450

Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (табл. 6) показал, что при инбридинге возрастает: а) среднее число хлоропластов на клетку (с 16 до 19 штук); б) дисперсия распределений с 11,25 до 18,43; в) доля растений, описываемых перерасеянным распределением (биномом с отрицательным показателем степени $\sigma^2 / \bar{x} > 1$). Сравнение типов распределений у растений исходной популяции (I_0) и у растений разного поколения инбридинга (I_1 ; I_2 ; I_2G_1 ; I_2G_2) позволяет судить о роли инбридинга в изменчивости нуклеарных (размер генома) и цитоплазматических (число хлоропластов) признаков (табл. 6 и 7). Во всех трех образцах встречаются растения трех типов: а) $\sigma^2 / \bar{x} < 1$; б) $\sigma^2 / \bar{x} > 1$; в) $\sigma^2 / \bar{x} \approx 1$. С углублением инбридинга возрастает доля растений, у которых распределение числа хлоропластов описывается перерасеянным распределением ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$). Если сравнить исходную популяцию (I_0) и третью группу растений с более глубоким уровнем инбридинга (I_2 ;

$I_2G_1; I_2G_2$), то различия будут высоко достоверны ($P > 0.99$). Если объединить все инбредные потомства ($I_1 + I_2; I_2G_1; I_2G_2$), то различия также будут достоверны ($P > 0.95$). Сравнение исходной популяции (I_0) и первой группы растений (I_1) свидетельствует о недостоверности различий ($0.93 < P < 0.95$). Однако тенденция увеличения числа хлоропластов в клеточных популяциях четко прослеживается. Аналогичный результат получился и при сравнении второго и третьего образцов (" I_1 " и " $I_2; I_2G_1; I_2G_2$ "): различия оказались достоверны только при $0.93 < P < 0.95$. Таким образом, с углублением инбридинга наблюдается статистически достоверное смещение эмпирических рядов в сторону перерассеянных распределений ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$), т.е. возрастает доля растений, у которых вариация числа хлоропластов сочетается как случайную изменчивость, так и дополнительные внутренние или внешние факторы, оказывающие влияние на этот признак.

Таблица 6

Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у растений популяции РНС и линий разного уровня инбридинга.

Образец	Распределение числа хлоропластов							
	Всего клеток	M	$\bar{X} \pm m$	σ^2	ч-ло раст. σ^2 / \bar{x} **			Всего раст.
					< 1	≈ 1	> 1	
I_0	948	16,02	10,02 ± 0,11	11,25	5	6	8	19
I_1	2094	18,33	12,33 ± 0,09	16,63	3	10	29	42
$I_2; I_2G_1; I_2G_2$	3502	19,02	12,02 ± 0,07	18,43	5	9	55	69

Сравнение дисперсий распределений хлоропластов показывает, что дисперсия в первом поколении инбридинга (I_1) достоверно выше чем у исходной популяции (I_0) при $P > 0.99$: $F_{эмпр} = 1.47$; $F_{0,99} = 1,19$ при $f_1 = 400$ и $f_2 = \infty$, где f_1 - число степеней свободы для большей дисперсии, а f_2 - для меньшей. Аналогичный результат наблюдается при сравнении исходной популяции (I_0) и третьей группы (" $I_2; I_2G_1; I_2G_2$ "), а также первого и второго поколений инбридинга (" I_1 " и " $I_2; I_2G_1; I_2G_2$ ").

Итак, у инбредных растений возрастает: а) доля полиплоидных клеток в клеточных популяциях и, как следствие этого, среднее число хлоропластов на клетку; б) увеличивается размах изменчивости распределений (σ^2); в) увеличивается доля растений, вариация числа хлоропластов которых сочетается как случайную изменчивость, так и влияние дополнительных внутренних или внешних факторов, определяющих фенотип растений по этому признаку (растения с $\sigma^2 / \bar{x} > 1$).

Влияние длительности жизненного цикла и обработки растений колхицином на миксоплоидность клеточных популяций. Изучались следующие факторы:

1) длительность жизненного цикла - растения первого и второго годов вегетации; 2) влияние полиплоидизирующего агента колхицина, а также действие этих факторов в комплексе (табл. 7). Средние значения числа хлоропластов у контрольных растений в первый год жизни варьировали от 13.6 до 16.8, а на второй год жизни от 12.7 до 18.6, что вполне характерно для диплоидных растений. В контрольных популяциях как первого, так второго годов жизни, встречались растения, распределение числа хлоропластов которых было как недорассеянным ($\sigma^2 / \bar{x} < 1$), так и перерассеянным ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$). У опытных же растений (поколение C_0) во всех вариантах наблюдали только перерассеянные распределения ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$). Таким образом, в поколении C_0 вариация числа хлоропластов связана не только со случайной изменчи-

востью, но и с дополнительными факторами (полиплоидизация части клеток), влияющими на этот признак.

Средние значения числа хлоропластов у контрольных растений первой и второй вегетации очень близки. Между тем, если сравнивать биномиальные средние, то они всегда достоверно выше у растений второго года жизни (табл.7 графа " $\bar{x} \pm m$ "). Это свидетельствует, что на второй год вегетации расширяется размах изменчивости в популяции клеток (табл.7 графа "min-max"). Увеличение размаха изменчивости можно оценить также, сравнив дисперсии у растений первого и второго годов жизни (табл.7, графа "критерий F"). Такое сравнение свидетельствует о том, что в контроле у растений второго года жизни дисперсия всегда выше по сравнению с дисперсией растений первого года жизни $\sigma^2_{II} / \sigma^2_I > 1$.

Таблица 7

Число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы в I и II

Образец	N	вегетация	годы вегетации			σ^2	σ^2 / \bar{x}	Критерий F
			min-max	M	$\bar{x} \pm m$			
Контроль								
СОАН-241	300	I	10 - 26	16,9	$5,9 \pm 0,15$	6,65	1,13	1,14
	250	II	10 - 25	16,4	$6,4 \pm 0,17$	7,57	1,18	$(\sigma^2_{II} / \sigma^2_I)^*$
Н-1	300	I	11 - 21	15,23	$4,23 \pm 0,11$	3,95	0,93	1,72
	300	II	10 - 23	15,7	$5,7 \pm 0,15$	6,8	1,19	$(\sigma^2_{II} / \sigma^2_I)^*$
Н-2	300	I	9 - 18	13,5	$4,5 \pm 0,11$	3,61	0,8	1,7
	390	II	7 - 22	13,51	$6,51 \pm 0,13$	6,15	0,94	$(\sigma^2_{II} / \sigma^2_I)^*$
742-24-8	550	I	10 - 26	15,79	$5,79 \pm 0,11$	6,74	1,16	1,8
	600	II	8 - 30	19,72	$11,72 \pm 0,14$	12,13	1,03	$(\sigma^2_{II} / \sigma^2_I)^*$
Поклоение C₀								
СОАН-241	300	I	12 - 28	18,04	$6,04 \pm 0,17$	8,84	1,46	1,03
	250	II	18 - 34	23,43	$5,43 \pm 0,18$	8,55	1,57	$(\sigma^2_I / \sigma^2_{II})^*$
Н-1	300	I	12 - 31	18,0	$6,0 \pm 0,20$	11,86	1,9	1,22
	1000	II	10 - 25	19,1	$9,1 \pm 0,01$	9,76	1,07	$(\sigma^2_I / \sigma^2_{II})^*$
Н-2	300	I	13 - 33	20,52	$7,52 \pm 0,17$	12,85	1,71	1,17
	450	II	10 - 28	18,15	$8,15 \pm 0,16$	11,02	1,35	$(\sigma^2_I / \sigma^2_{II})^*$

* $p > 0,99$;

Обработка семян колхицином ведет к резкому увеличению миксоплоидности клеточных популяций. Повышается среднее число хлоропластов (18,0-23,4), дисперсия распределений и разброс min-max значений. И, как было сказано ранее, вариация числа хлоропластов связана как со случайной изменчивостью, так и с дополнительными факторами, влияющими на признак ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$).

Наиболее интересным оказалось то, что на второй год вегетации в поколении C₀, в отличие от контрольных растений, наблюдается снижение уровня миксоплоидии клеточных популяций и сужение размаха изменчивости. Если средние значения числа хлоропластов у растений второго года жизни в поколении C₀ либо увеличиваются, либо сохраняются на прежнем уровне, то диапазон изменчивости у расте-

ний второго года жизни снижается (табл.9, графа " σ^2 " и "min-max"). Растения в поколении C_0 стабилизируют геномный состав клеток на новом уровне, и этот уровень у растений второго года жизни оказывается ниже, чем у растений первого года. Этот феномен можно наблюдать также, сравнивая дисперсии у растений первого и второго годов жизни растений. В контроле значения дисперсий на второй год вегетации выросли ($\sigma^2_{II} / \sigma^2_I > 1$), тогда как в миксоплоидном поколении (C_0) картина обратная - значения дисперсий на второй год вегетации уменьшились ($\sigma^2_I / \sigma^2_{II} > 1$).

3. Влияние апозиготического способа репродукции, обработки растений колхицином и 5-азациитидином на миксоплоидность клеточных популяций. Кроме факторов, перечисленных в предыдущем разделе, изучалось также влияние апозиготического способа репродукции, колхицина и эпимутагена 5-azaC на изменчивость числа хлоропластов. Результаты исследования представлены в таблице 8. Достоверность различий между средними значениями оценивалась с помощью t-критерия.

Таблица 8

Сравнительная изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гибрида Н2 в ряду смежных поколений репродукции: влияние апозиготического способа репродукции семян, обработки семян колхицином и 5- азациитидином

п.п.	Поколение	Число клеток	min - max	$M \pm m.$	σ^2	\bar{x}	σ^2 / \bar{x}
Контроль							
1	A_0	1100	7-22	$13,51 \pm 0,075$	6,15	6,51	0,94
Апозиготическая репродукция							
2	A_1	500	11-20	$14,98 \pm 0,057$	1,63	3,98	0,41
Апозиготическая репродукция миксоплоидов							
3	A_0C_0	1000	10-28	$18,16 \pm 0,105$	11,03	8,15	1,36
4	A_1C_1	500	12-21	$15,42 \pm 0,079$	3,12	3,42	0,91
Апозиготическая репродукция эпимутантов							
5	A_1Az_0	450	8-18	$12,89 \pm 0,094$	3,99	4,89	0,82
6	A_2Az_1	500	9-23	$14,26 \pm 0,101$	5,12	5,26	0,97
Апозиготическая репродукция миксоплоидных эпимутантов							
7	$A_1C_1Az_0$	650	9-23	$15,28 \pm 0,116$	6,73	6,28	1,07
8	$A_2C_2Az_1$	2160	3-24	$13,29 \pm 0,071$	11,09	10,29	1,08

Апозиготическая репродукция приводит к достоверному сужению диапазона изменчивости и снижению уровня дисперсии (табл.8 пп.1 и 2). Сравнивая числа хлоропластов в контрольной популяции и после одного поколения апозиготической репродукции ($A_0 \Rightarrow A_1$), находим, что число хлоропластов в опыте возросло на 1,5 штуки на клетку, и это увеличение статистически достоверно.

Колхицин привел к увеличению уровня миксоплоидности клеточной популяции и к резкому увеличению среднего числа хлоропластов. Как видно из таблицы 8 (п.п. 1 и 3), число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у растений поколения A_0C_0 в среднем возросло на 4,5 штук на клетку, достигнув 18,16 штук. Изменился и диапазон распределения: от 7 до 22 в контроле и от 10 до 28 в опыте. Как следствие этого возросла дисперсия распределения. В поколении A_0C_0 число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц образует перерасеянное распределе-

ние ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$), тогда как в контроле (поколение A_0) распределение было недорасеянным ($\sigma^2 / \bar{x} < 1$). Апоzigотическая репродукция семян миксоплоидных растений (поколение A_1C_1) привела к достоверному снижению среднего числа органелл на клетку и к резкому снижению дисперсии распределения (табл. 8 п.п.3 и 4). Снижение уровня дисперсии при апоzigотическом способе семенной репродукции у индуцированных миксоплоидов примерно такое же, как и при апоzigотической репродукции контрольных растений (поколения A_1).

В отличие от варианта с обработкой семян колхицином, обработка 5-azaC привела к достоверному снижению в клетках числа хлоропластов: в контроле - 14,98, в опыте - 12,89 (табл. 8 п.п. 2 и 5). Число хлоропластов в клетках в среднем уменьшилось на 2 штуки. Под влиянием 5-azaC изменился диапазон распределения: в контроле число хлоропластов на клетку варьировало от 11 до 20, в опыте от 8 до 18. Несмотря на 20% снижение среднего значения у опытных растений (A_1Az_0), дисперсия распределения возросла более чем в два раза. Апоzigотическая репродукция семян у «эпимутантов» ($A_1Az_0 \Rightarrow A_2Az_1$) привела: а) к росту диапазона изменчивости в поколении A_2Az_1 (8-18 в контроле и 9-23 в опыте); б) к увеличению среднего числа хлоропластов в клетках (с 12,89 до 14,26); в) к росту дисперсии распределения (табл. 8 п.п. 5 и 6). По статистическим параметрам популяция замыкающих клеток устьиц в поколении A_2Az_1 ближе всего к исходным растениям (A_0).

Обработка миксоплоидных семян 5-azaC ($A_1C_1 \Rightarrow A_1C_1Az_0$) не приводит к изменению среднего числа хлоропластов на клетку, однако более чем вдвое возрастает дисперсия распределения: 3,12 (контроль) и 6,73 (опыт). Увеличение дисперсии произошло за счет расширения параметра "min-max": 12-21 в контроле, 9 - 23 в опыте. Кроме того, в поколении $A_1C_1Az_0$ распределение стало перерасеянным ($\sigma^2 / \bar{x} > 1$). В отличие от предыдущих вариантов, апоzigотическая репродукция миксоплоидных «эпимутантов» ($A_1C_1Az_0$ - контроль $\Rightarrow A_2C_2Az_1$ - опыт) привела, с одной стороны, к снижению среднего числа органелл на клетку, а с другой, к росту дисперсии распределения (6,73 - контроль, 11,09 - опыт). У «эпимутантов» встречались клетки с очень малым числом хлоропластов (2-3 штуки на клетку), чего не встречалось в других вариантах наблюдений.

Итак, у диплоидных растений сахарной свёклы в норме наблюдается «спонтанная» изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Колхицин, блокируя веретено деления в митозе, приводит к полиплоидизации клеток. Однородительская репродукция (апоzigотия) также влияет на изменчивость числа хлоропластов: происходит небольшое увеличение среднего числа хлоропластов за поколение и резко сокращается дисперсия распределения (почти в 4 раза). Снижение варибельности числа хлоропластов при однородительской репродукции растений свидетельствует, что экспериментальные растения (A_1) более однообразны по цитогенетическим признакам, чем контрольные (A_0). Снижение изменчивости отмечено и в варианте с однородительской репродукцией миксоплоидов ($A_0C_0 \Rightarrow A_1C_1$). Однако в отличие от контрольного варианта ($A_0 \Rightarrow A_1$) у миксоплоидных растений однородительская репродукция снижает среднее число хлоропластов. Эпимутаген 5-azaC не вызывает ни полиплоидизацию ядер, ни изменение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК. Однако он деметилирует остатки 5'-метилцитозина в молекулах ДНК, вызывая дерепрессию многих генов (эффект гипометилирования

гена). Обработка семян 5-azaC приводит к существенному снижению среднего числа хлоропластов в клетках и заметно увеличивает размах изменчивости.

4. Влияние способа репродукции, обработки растений колхицином, 5-азацитидином на репродуктивные признаки растений

Влияние обработки 5-азацитидином на динамику цветения и формирование цветonoсных побегов у растений сахарной свеклы. В таблице 9 приведены наблюдения за временем вступления в фазу цветения и за формированием цветonoсных побегов в алозиготических потомствах межлинейного гибрида Н2: опыт - растения, обработанные 5-azaC; контроль - без обработки.

Наблюдение за цветением показало, что опытные растения на 30-40 суток зацвели раньше, чем контрольные (табл.9). Статистическая оценка достоверности различий между контрольными и опытными растениями (критерий G) свидетельствует, что 5-azaC достоверно ускоряет время вступления растений в фазу цветения: для поколений A_1 и A_1Az_0 при $P>0,95$, а для поколений A_1C_1 и $A_1C_1Az_0$ при $P>0,99$.

Наблюдение за формированием цветonoсных побегов показало, что во всех вариантах опыта, встречаются три типа растений: "цветущие" (на цветonoсных побегах закладывается множество цветков), "холостяки" (развивается цветonoсный побег без цветков) и "упрямцы" (формируется только розетка листьев без цветonoсного побега). Однако в опыте доля цветущих растений повышается (табл.9).

Таблица 9

Динамика цветения и формирование цветonoсных побегов в алозиготических потомствах межлинейного гибрида Н2, обработанных (опыт) и необработанных (контроль) 5-азацитидином.

Поколение	Варианты	Начало цветения		Типы растений в зависимости от формирования цветonoсных побегов			Всего растений
		18.06-17.07	18.07-16.08	"Цветущие"	"Холостяки"	"Упрямцы"	
A_1	Контроль	-	3	3	4	5	12
A_1Az_0	опыт	5	2	7	1	2	10
A_1C_1	Контроль	-	4	4	4	5	13
$A_1C_1Az_0$	опыт	31	11	42	4	7	53

Как видно из приведенных фактов, 5-azaC оказывает влияние на долю цветущих растений и ускоряет время вступления растений в фазу цветения. Кроме того, 5-azaC приводит к увеличению побегообразования - ветвление побегов второго порядка в опыте выражено в гораздо большей степени, чем в контроле. В итоге у растений с обильным ветвлением резко возрастает число цветков на растениях.

Влияние способа репродукции растений, обработки колхицином и 5-азацитидином на признак раздельно-сростноцветковости у сахарной свеклы. В качестве материала для экспериментального изучения эпигенетической изменчивости признака раздельно-сростноцветковости (РЦ-СЦ) был взят гибрид Н2. Результаты семи опытов приведены в таблице 10: верхняя строка - контроль, нижняя — опыт.

Основная часть потомков гибрида Н2 представлена РЦ-фенотипами, другая ($\approx 15\%$) - СЦ-фенотипами (A_0 , опыт 1). Замачивание семян в колхицине и получение из них миксоплоидных растений ведет к достоверному изменению соотношения РЦ-СЦ фенотипов (A_0C_0 , опыт 1). Доля растений СЦ-фенотипа по сравнению с контролем возрастает более чем на 20% ($P>0,95$). Сравнение соотношений РЦ-СЦ фе-

нотипов в поколениях A_0 и A_1 (опыт 2) показывает, что доля растений СЦ фенотипа в поколении A_1 возросла более чем на 45% ($P > 0.99$). Это говорит о том, что любая форма репродукции без отбора (в том числе и апозиготическая) ведет к повышению доли СЦ-фенотипов в потомстве.

Таблица 10.

Сравнительный анализ экспрессии признака РЦ-СЦ у гибрида Н2 под влиянием колхицина и 5-азацитидина.

Опыт	Поколение	Год репродукции	Число растений с фенотипом		Итого	χ^2
			РЦ	СЦ		
1	A_0	1998	26	5	31	3,97**
	A_0C_0	1998	43	24	67	
	Итого		69	29	98	
2	A_0	1998	26	5	31	6,8***
	A_1	1999	20	17	37	
	Итого		46	22	68	
3	A_0C_0	1998	43	24	67	19,7*** *
	A_1C_1	1999	10	36	46	
	Итого		53	60	113	
4	A_1	1999	20	17	37	7,2***
	A_1Az_0	2001	33	7	40	
	Итого		53	24	77	
5	A_1C_1	1999	10	36	46	22,7*** *
	$A_1C_1Az_0$	2001	31	12	43	
	Итого		41	48	89	
6	$A_1C_1Az_0$	2001	31	12	43	1,7*
	$A_2C_2Az_1$	2003	77	17	94	
	Итого		108	29	137	
7	A_1Az_0	2001	33	7	40	0,3*
	A_2Az_1	2003	31	9	40	
	Итого		64	16	80	

* различия недостоверны; ** достоверны, $P > 0,95$; *** $P > 0,99$; **** $P > 0,999$.

Сравнение соотношений РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A_0C_0 и A_1C_1 (опыт 3) показывает, что в миксоплоидных потомствах после апозиготической репродукции (A_1C_1) доля СЦ-фенотипов возрастает с 36% почти до 80% ($P > 0.999$). Из опытов 2 и 3 следует, что совокупное влияние однородительского размножения (A_1) и повышение уровня миксоплоидии (A_1C_1) превращает РЦ гибрид в сростноцветковую форму свеклы. В опыте 4 сравнивали соотношение растений РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A_1 и A_1Az_0 . Обработка растений 5-аза (A_1Az_0) приводит к резкому изменению соотношения растений двух фенотипов: доля РЦ-фенотипов возрастает с 54% до более чем 80%. РЦ-растений становится примерно столько же, сколько и у исходного гибрида Н2 (A_0). Аналогичная картина наблюдается и в опыте 5, где сравнивали поколения A_1C_1 и $A_1C_1Az_0$. После обработки миксоплоидных растений 5-аза ($A_1C_1Az_0$) резко возрастает доля РЦ-растений с 21% до более чем 70% ($P > 0.999$). Сравнение соотношений РЦ-СЦ фенотипов в поколениях $A_1C_1Az_0$ и $A_2C_2Az_1$ в опыте 6 показывает, что вариабельность в обоих вариантах опыта по РЦ-

СЦ признаку была примерно одинаковой ($0.60 < P < 0.70$). В поколении $A_1C_1Az_0$ доля растений РЦ фенотипа составила более 70%, а в поколении $A_2C_2Az_1$ более 80%, что близко к контролю (A_0). Таким образом, апозиготическое размножение после обработки 5-azaC не оказало никакого воздействия на соотношение фенотипов растений в двух поколениях репродукции. Сравнение соотношений РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A_1Az_0 и A_2Az_1 (опыт 7) показывает, что, как и в предыдущем случае, апозиготическое размножение после обработки 5-azaC не оказывает никакого воздействия. Соотношение РЦ-СЦ растений было близко к контролю (A_0).

Рассматривая экспериментальные данные можно сделать заключение, что колхицин, полиплоидизируя клеточные ядра, приводит к частичной инактивации РЦ генов и к повышению доли СЦ фенотипов в потомствах. Вероятно, инактивация РЦ-генов осуществляется путем метилирования участков хромосом, где расположены эти гены, поскольку 5-azaC, вызывая гипометилирование генома, активирует РЦ гены, что ведет к резкому повышению доли растений с РЦ-фенотипом. Это свойство наследуется и в следующем поколении репродукции (поколения $A_2C_2Az_1$ и A_2Az_1). Из наблюдений следует, что, по-видимому, раздельноцветковым растениям в норме присущ более низкий уровень метилирования генома, чем сростноцветковым растениям.

Влияние способа репродукции растений, обработки колхицином на способность растений сахарной свеклы завязывать семена апозиготическим способом.

Результаты исследования по завязываемости апозиготических семян представлены в таблице 11. В опыт исследовались две линии, контрастные по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и соответственно по размеру клеток: а) гибрид Н2 с малым числом хлоропластов; б) линия СОАН-31 с повышенным числом хлоропластов, а также ее гибрид СОАН-31 × РЕК-45 характеризующийся также сниженным по сравнению с исходными линиями числом хлоропластов. Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента (t-критерий).

Таблица 11

Влияние способов репродукции (гибридизация, инбридинг) на завязываемость апозиготических семян.

п.п	Поколение	Завязываемость семян, г.	N	критерий t
Гибрид Н2				
1	A_0 (гибрид)	$4,04 \pm 0,74$	30	$A_0 \rightarrow A_0C_0$ 2.80*** $A_0 \rightarrow A_1$ 4.97****
2	A_0C_0 ¹⁾	$7,73 \pm 1,09$	36	
3	A_1 ²⁾	$24,4 \pm 4,03$	64	
Линия СОАН-31				
4	A_0 (линия)	$29,39 \pm 3,63$	67	$A_0 \rightarrow A_0C_0$ 0.54* $A_0 \rightarrow$ гибрид 5,60****
5	A_0C_0 ¹⁾	$31,96 \pm 3,05$	59	
6	Гибрид ³⁾	$7,02 \pm 1,66$	30	

* различия недостоверны; *** достоверны ($P > 0,99$); **** достоверны ($P > 0,999$)

У диплоидных растений сахарной свёклы наблюдается изменчивость по способности завязывать семена без участия пыльцевого родителя (партеногенез или апозиготия). Как следует из наблюдений, рост миксоплоидности клеточных популяций ведет к увеличению завязываемости семян апозиготическим способом у мел-

клеточных растений (табл.11, п.п. 1 и 2). Средняя завязываемость апозиготических семян у гибрида Н2 составила 4,04 г. При обработке растений колхицином (поколение A_0C_0) этот показатель вырос до 7,73 г. Различия контрольных растений (A_0) и опытных (A_0C_0) достоверно ($P>0,99$). При повторной апозиготической репродукции (АО завязываемость семян без участия пыльцевого родителя резко возрасла до 24,4 г. (табл.11 п.п 1 и 3). Различия достоверны ($P>0,999$).

Другую картину мы наблюдаем у крупноклеточных растений (табл.11 п.п 4 и 5). В поколении A_0 средняя завязываемость семян апозиготическим способом составила 29,39 г. После обработки колхицином (поколение A_0C_0) она практически не изменилась (31.96 г.). Различия между контролем и опытом (A_0 и A_1) недостоверны. При гибридизации же способность завязывать семена резко снизилась (табл.11 п.п 4 и 6). Средняя завязываемость у гибрида *СОАН-31xREK-45* составила только 7.02 г. Различия между контролем (поколении A_0) и опытом (гибрид) достоверно с вероятностью более 99,9 %.

Итак, при инбридинге (поколение A_0 линии СОАН-31) и однородительском размножении (поколение A_1 гибрида Н2) наблюдается повышенная способность завязывать семена апозиготическим способом (партеногенез). При гибридизации же эта способность резко падает (поколение A_0 гибрида Н2; гибрид *СОАН-31xREK-45*). Повышение уровня миксоплоидности клеточных популяций (обработка колхицином) у мелкоклеточных растений повышает завязываемость семян без участия пыльцевого родителя (поколение A_0C_0 гибрида Н2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Миксоплоидность клеточных популяций меристем изначально присуща любым растениям свёклы. Изменчивость содержания ДНК в ядрах клеток у сахарной свёклы является нормой, а содержание ДНК на ядро - это нуклеотипическая характеристика как отдельной линии, так и отдельного растения, при этом диапазон изменчивости зависит от исходного материала, взятого в опыт. Изучение возможных причин миксоплоидности клеточных популяций показало, что инбридинг достоверно повышает долю полиплоидных клеток в клеточных популяциях и, как следствие этого, повышается среднее число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Аналогичные результаты были получены ранее при сравнении размеров клеток мезофилла и числа хлоропластов в них у инбредных линий сахарной свёклы и гибридов, полученных на основе этих линий (Струк Т.И., Осипова З.А., 1982.). Природа повышения уровня миксоплоидии при инбридинге очевидна - у инбредных растений весьма обычны нарушения механизма кариокинеза и цитокинеза.

Интересным оказался тот факт, что на изменчивость числа хлоропластов оказывает влияние длительность жизненного цикла (первая и вторая вегетация у двулетних растений). Растения второго года жизни отличаются от растений первого года тем, что размах изменчивости изучаемого признака у них выше. Эти изменения связаны, с одной стороны, с небольшим ростом среднего числа хлоропластов на клетку, а с другой, с увеличением дисперсии распределения. Рост дисперсии указывает, что в клеточной популяции наблюдаются как процесс эндополиплоидизации (кратное увеличение числа хромосом) в ядрах, так и процесс деполоплоидизации (редукция числа хромосом в ядрах клеток). Наблюдения за этим признаком в миксоплоидном поколении (C_0) показало, что в отличие от контрольных растений, на второй

год вегетации в поколении S_0 уровень миксоплоидии клеточных популяций снижается, происходит сужение размаха изменчивости.

На миксоплоидность клеточных популяций оказывают влияние также и воздействия химических веществ: обработка колхицином и 5-азаС. Колхицин, блокируя митотическое веретено деления, приводит к полиплоидизации клеток и, как следствие этого, к повышению среднего числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Снижение числа хлоропластов при обработке растений эпимутагеном 5-азаС не связано ни с изменением уровня плоидности клеток, ни с изменениями последовательности нуклеотидов в молекулах ДНК. 5-азаС деметилирует остатки 5'-метилцитозина в молекулах ДНК, вызывая дерепрессию многих генов. Изменения активности генов у элимутантных растений оказывают влияние на изменчивость числа органелл в клетках через изменения их митотической активности. Отмечено, что эпимутантные растения (5-азаС) после некоторой паузы в росте начинают быстро расти, раньше вступают в фазу цветения и имеют в конце вегетации более крупные размеры, чем контрольные растения (Maletskaya E.I. et al., 2002). Известно, что размер клеток определяется двумя факторами: скоростью делений и продолжительностью роста. Чем чаще клетки делятся, и чем непродолжительнее их рост, тем они мельче (Синнот Э., 1963).

5-азациитидин вызывает также эпигенетические изменения репродуктивных признаков: ускоряются сроки начала цветения, снижается доля растений с нарушениями репродуктивного цикла (доля «холостяков», «упрямцев» в популяции), увеличивается ветвление побегов второго порядка. Высокая частота встречаемости описанных изменений репродуктивной сферы (более 50%) позволяет говорить об эпигенетической, а не о мутационной изменчивости признаков. Другое эпигенетическое изменение в репродуктивной сфере, наблюдаемое после обработки растений 5-азаС - резкое увеличение РЦ-растений в выборке. Рассматривая каши экспериментальные данные можно сделать вывод: колхицин, полиплоидизируя клеточные ядра, приводит к частичной инактивации РЦ генов и к повышению доли СЦ-фенотипов в потомствах. Вероятно, инактивация РЦ-генов осуществляется путем метилирования участков хромосом, где расположены эти гены. По-видимому, РЦ-растениям в норме присущ более низкий уровень метилирования генома, чем СЦ-растениям.

Изменчивость клеток по числу гаплоидных наборов на ядро оказывает мощное влияние на фенотипы репродуктивных признаков. Как следует из проведенных экспериментов у мелкоклеточных растений (пониженный уровень миксоплоидии), размножаемых перекрестным опылением (гибридизация), наблюдается слабая склонность к партеногенетическому (апозиготическому) способу завязывания семян. Повышение миксоплоидности клеточных популяций у таких растений приводит к достоверному повышению завязываемости семян апозиготическим способом. К более существенному результату приводит повторная апозиготическая репродукция пыльцестерильных растений. У крупноклеточных инбредных растений с высоким уровнем миксоплоидии изначально наблюдалась повышенная способность к завязыванию апозиготических семян. Обработка колхицином таких растений никак не повлияла на этот процесс, тогда как гибридизация резко снизила способность растений завязывать апозиготические семена. Таким образом, мы наблюдаем связь уровня миксоплоидии в клеточных популяциях растений с завязываемостью апозиготических семян.

ВЫВОДЫ

Из представленных данных можно сделать следующие выводы:

1. Показано, что у диплоидных форм сахарной свеклы наблюдается широкая вариабельность по массе ДНК на ядро. Изменчивость прослеживается на разных стадиях клеточного цикла, а диапазон изменчивости зависит от исходного материала. В ходе митотического деления распределение ДНК между дочерними ядрами происходит не всегда правильно и равномерно.
2. Показано, что в клеточных популяциях сахарной свеклы имеет место многоядерность клеток. Доля одноядерных клеток варьировала от 60,7% и до 94,8%; двухядерных - от 4,9% до 34,9%; многоядерных - от 0 до 3,2% (3-6 ядер на клетку). Показано, что исследуемым материалам присущ также разный уровень миксоплоидии. Доля диплоидной фракции клеток варьировала от 54% до 78%, гаплоидной - от 6% до 30%, триплоидной - от 1% до 30% тетраплоидной - от 2% до 12%.
3. Показано, что миксоплоидию клеточных популяций можно оценивать как путем прямого подсчета числа хромосом в клетках, так и числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. С увеличением уровня гомозиготизации растений в клеточных популяциях возрастает: а) доля полиплоидных клеток и среднее число хлоропластов на клетку; б) размах изменчивости, а также доля растений, у которых распределение числа хлоропластов описывается перерасеянным распределением
4. Обработка семян колхицином приводит к росту миксоплоидии клеточных популяций, что ведет к достоверному увеличению среднего числа хлоропластов в клетках и повышению доли растений, вариация числа хлоропластов которых описывается перерасеянным типом биномиального распределения.
5. У контрольных растений второго года жизни при сохранении среднего числа хлоропластов на клетку достоверно возрастает дисперсия. У миксоплоидных растений второго года жизни (поколение С) снижается как среднее число хлоропластов на клетку, так и дисперсия.
6. Показано, что эпимутаген 5-азациитидин приводит к достоверному снижению среднего числа хлоропластов на клетку, расширению границ варьирования этого признака и, соответственно, увеличению дисперсий распределений.
7. Апоzigотическая репродукция у контрольных растений (сравнение A_0 и A_1) приводит к статистически достоверному увеличению среднего числа хлоропластов, а также к сужению диапазона изменчивости и снижению уровня дисперсии. В миксоплоидном же поколении при апоzigотической репродукции (сравнение A_0C_0 и A_1C_1) среднее число хлоропластов достоверно снижается, но наблюдается сужение диапазона изменчивости и снижение уровня дисперсии.
8. Повышение уровня миксоплоидии клеточных популяций при колхицинировании и апоzigотической репродукции приводит к достоверному повышению доли сростноцветковых растений в популяции. 5-азациитидин достоверно изменяет это соотношение в пользу раздельноцветковых фенотипов.
9. Повышение уровня миксоплоидии у гибридных (мелкоклеточных) растений приводит к достоверному повышению уровня завязывания апоzigотических семян. Повторная апоzigотическая репродукция приводит к дальнейшему росту уровня семенной продуктивности растений (эффект отбора).
10. У инбредных растений с высокой семенной продуктивностью повышение уровня миксоплоидии не привело к увеличению завязываемости семян апоzigотическим способом, тогда как гибридизация резко снизила эту способность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Малецкая (Юданова) С.С.** Цитофотометрический анализ миксоплоидии у сахарной свеклы. // Пути повышения эффективности свеклосахарного производства России в условиях рыночной экономики. Тезисы докладов научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения А.Л. Мазлумова, Рамонь, 1996. Часть 1, с.44-45.
2. **Малецкая (Юданова) С.С.** Полисоматия и число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы. // Материалы XXXVI Международной научной студенческой конференции. Новосибирск, 1998. с. 15.
3. **Maletskaya E.I., Maletskaya (Yudanova) S.S.** The nuclear DNA mass variability in embryo root cells of sugar beet. // Sugar Tech (An Intern. Jour, of Sugar Crops & Related Industries), 1999 V.1(1&2), p.30-36.
4. **Maletskaya (Yudanova) S.S.** Content of DNA in telophase nuclei in gamo- and agamosperous inbred lines of *Beta vulgaris L.* // Apomixis Newsletter, 1999. № 11, P. 10.
5. **Малецкая (Юданова) С.С.** Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у инбредных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*). // Материалы 2-го съезда ВОГиС, Санкт-Петербург, 2000. с. 218.
6. **Maletskaya (Yudanova) S.S.** Correlation between polysomaty level and agamospermy in sugar beet. // Vortrage fur Pflanzenzuchtung, 2000. Heft 47, P.95.
7. **Maletskaya (Yudanova) S.S., Kolodiazhnaya J.S.** Influence of the mode of plant reproduction on the polysomaty level of cell population on the example of sugar beet. // In: Biodiversity and Dynamics of Ecosystem in North Eurasia. Novosibirsk, Russia, 2000. Part 1.P.60-62.
8. **Levites E.V., Denisova F.Sh., Kirikovich S.S., Maletskaya (Yudanova) S.S.** Ration of phenotypes at the Adh1 locus in the apozygotic offspring in sugarbeet (C₁ generation) // Sugar Tech (An Intern. Jour, of Sugar Crops & Related Industries), 2000. V.2(4), P. 26-30.
9. **Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И.** Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*). // Генетика, 2002. т. 38(1), с. 72-78.
10. **Малецкий С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С.** Экспрессия признака ЦМС в зиготических и апоzigотических потомствах сахарной свеклы // (*Beta vulgaris L.*) // Генетика, 2002. т. 38(5), с. 647-654.
11. **Maletskaya E.I., Yudanova S.S., Maletskii S.I.** Epigenetic and epiplastome variability in apozygotic progenies of sugar beet treated by 5-azacytidine. // Sugar Tech (An Intern. Jour, of Sugar Crops & Related Industries), 2002. V.1&2(4), P. 52-56.
12. **Yudanova S.S.** Mixoploidy level of cell populations and apozygoty in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) // XVIIth International Congress on Sexual plant reproduction, Abstracts. 2002 P. 184.
13. **Yudanova S.S.** Mixoploidy and apozygoty in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) // Sugar Tech (An Intern. Jour, of Sugar Crops & Related Industries), 2003. V.5(1). P. 33-36.

№ - 8 1 8 7

Отпечатано 29 марта 2004 г. в ООО «Принт-Экспресс»
г.Новосибирск, ул.Пирогова 8, тел. (3832)39-71-94
Тираж 100 экз.