

удк 633.63:631.52

МИКСОПЛОИДИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ЭКСПРЕССИЯ ПРИЗНАКА РАЗДЕЛЬНО- СРОСТНОЦВЕТКОВОСТИ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

С.С. Юданова, Е.И.Малецкая

В статье показана различная природа одно - и многоростковости сахарной свеклы. Делается вывод об эпигенетическом характере наследования РЦ-СЦ- признака. Приведены результаты наблюдений РЦ-признака у растений с различным уровнем миксоплоидии. Колхицинирование приводит к инактивации РЦ генов и к повышению доли СЦ фенотипов в потомствах.

Одноростковость плодов сахарной свеклы - один из важных хозяйственно-полезных признаков, существенно снижающий трудоемкость и затратность выращивания сырья для промышленности. Впервые работа по одноростковой свекле была начата в США в начале XX века и диктовалась сугубо прагматическими соображениями: найти доноры признака раздельноцветковости (РЦ признак) с тем, чтобы получать сорта, не требующие затрат ручного труда при формировании густоты насаждения в посевах. Американский селекционер Таунсенд, подводя итоги своих исследований, писал: «Сахарная свекла может образовывать одноростковые плоды вместо многоростковых - экономию труда можно оценить в несколько миллионов долларов» (Townsend, 1915). Им была показана эффективность отбора по РЦ признаку, но получить константный материал (донор РЦ признака) и передать такой материал селекционерам ему не удалось. В 1920-1930-е годы аналогичные результаты получили и европейские исследователи (Barocka, 1959; 1960).

Одно- и многоростковость посевных единиц свеклы может иметь различную природу и связана: а) одно- и многосемяпочковостью завязей цветков; б) раздельно- и сrostноцветковостью (РЦ и СЦ признаки); в) одно- и многозародышевой (полиэмбриония). У СЦ-растений в пазухах прилистников закладываются несколько цветков на одной цветоножке, из которых впоследствии образуются соплодия-клубочки, у РЦ-растений закладываются одиночные цветки. Иногда РЦ растения формируют и многоростковые плоды, что связано с многосемяпочковостью цветков и многозародышевой РЦ-растения с односемяпочковыми цветками в основном формируют одноростковые плоды, но и при этом возможен небольшой процент двухростковости (полиэмбриония).

Постижение природы экспрессии и наследования РЦ-СЦ признаков у свеклы оказалось крайне запутанной на протяжении всего периода их исследований. Впервые РЦ растения были выделены в Советском Союзе в начале 1930-х гг., что позволило в дальнейшем осуществить подлинный технологический прорыв в свекловодстве, создав сорта и гибриды одноростковой свеклы. Первое генетическое изучение РЦ признака провела М.Г. Бордонос и показала рецессивность и моногенность наследования этого признака (Бордонос 1938; 1939; 1941). В дальнейшем, этот результат был

... в экспериментах В.Ф. Савицкого в США на основе материалов, найденных им в американских популяциях (Savitsky, 1962). Однако на практике получалось так, что наследование РЦ признака часто не соответствовало моногенной модели наследования. Из работы немецкого генетика Э. Кнаппа в 1960-е годы следовало, что моногенность присуща лишь американскому донору РЦ признака, тогда как европейские доноры (ФРГ, ГДР, Польша, СССР) имеют полигенную детерминацию этого признака (Кларр 1967). Р. Мельцер в обзоре по наследованию РЦ признака указывает, что доля растений РЦ фенотипа в поколении F_2 напрямую зависит от происхождения РЦ донора. Если в скрещиваниях использовать донор В.Ф. Савицкого, то в F_2 выщепляется около 15% растений РЦ фенотипа, если же донор из ГДР, то доля растений РЦ фенотипа в поколении F_2 составляет менее 5% (Мельцер, 1984).

Многолетняя работа селекционеров и семеноводов с одностростковой свеклой свидетельствует, что экспрессия РЦ признака характеризуется не стабильностью. С начала работы с одностростковой свеклой во всех селекционных учреждениях в период цветения постоянно осуществляется массовая браковка растений СЦ фенотипа («ботаническая прополка»), так как отказ от отбора ведет к исчезновению РЦ признака и превращает одностростковые сорта в многостростковые.

Природа нестабильности морфогенеза РЦ признака в 1960-1980 гг. была неясна. Наблюдения за экспрессией РЦ признака в селекционных материалах показали исключительную сложность этой задачи. Многие исследователи полагали, что инбридинг позволит выделить из сортов гомозиготные линии с константным РЦ признаком. Несмотря на то, что для самоопыления отбирались только растения РЦ фенотипа, их потомства частично или полностью были представлены растениями СЦ фенотипа. Это наблюдение не согласуется с результатами исследований М.Г. Бордонос и В.Ф. Савицкого о рецессивности РЦ признака и моногенной схеме наследования. Частота возникновения растений СЦ фенотипа в отдельных потомствах столь высока, что говорить о мутационном происхождении растений СЦ фенотипа (доминантный признак) было нельзя. Показано также, что нестабильность экспрессии РЦ признака присуща не только сортам популяциям, но и гомозиготным инбредным линиям (Малецкий и др., 1988), а также растениям репродуцируемым клонально (вегетативно). Оказалось, что СЦ фенотипы можно встретить среди удвоенных гаплоидов, которые получали *in vitro* выделением семян из цветков отдельных РЦ растений (Малецкий, Шавруков, 1991).

Нестабильность экспрессии РЦ-СЦ признака свидетельствует, что морфогенезу цветков и соцветий на цветоносах свеклы присуща поливариантность или неоднозначность выбора перспективного вектора морфогенеза (неравновесный процесс). Для неравновесных морфогенетических процессов базовым теоретическим конструктом выступает «диссипативная структура», подчеркивающая тесную взаимосвязь между структурой и порядком. Термин «диссипативные структуры» подчеркивает конструктивную роль процессов диссипации в морфогенезе («порядок из хаоса»). Диссипативные процессы являются основополагающими факторами морфогенеза в живой природе (Можейко, 2003), формируя особый тип изменчивости у растений, обозначаемый как эпигенетическая изменчивость.

На наш взгляд, изменчивость РЦ-СЦ признаков в популяциях - пример эпигенетической изменчивости. Вывод об эпигенетической природе наследования РЦ-СЦ признаков у свеклы можно сделать, осматривая эту проблему с высоты сегодняшнего знания (Малецкий и др., 1988; Maletskii, 1999, Малецкий, 2004). Очевидно, что успеху в получении константных форм по РЦ признаку в первой трети XX века «помешало» отсутствие знаний в области эпигенетики.

В данной работе представлены результаты наблюдений РЦ признака у растений с различным уровнем миксоплоидии. В современном понимании миксоплоидия - явление, когда в клеточной популяции наряду с доминирующей фракцией клеток с основным числом хромосом, встречаются фракция клеток, у которых число хромосом в ядрах меньше или больше их основного числа.

Известно, что клетки, будучи единицами наследственности, оказывают влияние на экспрессию многих признаков, включая репродуктивные. Это обстоятельство позволяет связывать изменения уровня миксоплоидии с экспрессией РЦ-СЦ признака: если экспериментально изменить уровень миксоплоидии клеточных популяций, то можно изменить и экспрессию РЦ признака у сахарной свеклы (Maletskii, 1999). Это позволяет исследовать взаимосвязи наследования миксоплоидии с таким репродуктивным признаком как раздельноцветковость.

Ранее было показано, что инбридинг повышает уровень миксоплоидии, а гибридизация приводит к обратному результату. Применение различных химических веществ показало, что небольшие концентрации колхицина повышают уровень миксоплоидности клеточных популяций, а эпимутаген 5-азацитидин - снижает (Струк, Осипова, 1982; Малецкий, 2000; Юданова и др., 2002; 2004). Увеличение дозы геномов на ядро создает новые условия для экспрессии генов, поэтому колхицин можно рассматривать как один из эпимутагенных факторов (Малецкий, 2004). Это обстоятельство позволяет связывать изменения уровня миксоплоидии при инбридинге с экспрессией РЦ-СЦ признака в инбредных потомствах.

Материал. В качестве материала для исследования из коллекции лаборатории популяционной генетики растений был взят простой межлинейный гибрид H2 (мс 704-8 x 741-1-21), полученный от скрещивания двух инбредных линий. Гибрид характеризуется хорошим уровнем стерильности и раздельноцветковости. Исследовались следующие варианты опыта: A_0 - растения гибрида H2; A_0C_0 - миксоплоидные растения (обработка колхицином) гибрида H2; A_1 - апозиготическое поколение гибрида H2 (однородительское размножение); A_1C_1 - апозиготическое поколение, полученное от растений A_0C_0 ; A_1Az_0 - растения A_1 , обработанные 5-азацитидином; A_2Az_1 - апозиготическое поколение, полученное от растений A_1Az_0 ; $A_1C_1Az_0$ - растения A_1C_1 , обработанные 5-азацитидином; $A_2C_2Az_1$ - апозиготическое поколение, полученное от растений $A_1C_1Az_0$. Уровень миксоплоидии в различных вариантах был исследован на этих же растениях в других работах (Maletskaya et al., 2002; Юданова и др., 2002, 2004).

Методы обработки растений колхицином и 5-азацитидином. Для экспериментального повышения уровня миксоплоидности клеток использовали колхицин, блокирующий веретено деления, что приводит к удвоению числа хромосом (Levan, 1938; 1945). Для этого наклюнувшиеся семена

(опыт) замачивали на сутки перед посевом в 0,1% растворе колхицина, контрольный материал - в дистиллированной воде. После этого семена высевали в грунт. Обработку растений эпимутагеном 5-азациитидином (ингибитор метилтрансферазы ДНК в клетках) проводили схожим образом. Наклюнувшиеся семена (опыт) оставляли на 24 часа при комнатной температуре в 0,5 mM растворе 5-азациитидина, контрольные семена оставляли в дистиллированной воде. Затем оба варианта высевались в грунт.

Апоизоготическое (однородительское) размножение. Апоизоготия - это развитие эмбриона без участия генетического материала пыльцевого родителя из генеративных или соматических клеток семяпочки (Хохлов, 1967). Для получения апоизоготических семян использовали только пыльцестерильные растения (ЦМС), которые выращивали в беспыльцевом режиме на изолированном участке расположенном в садовом питомнике в Искитимском районе Новосибирской области. Чтобы избежать пыльцевого загрязнения проводили строгую ежедневную браковку растений по фенотипу пыльцевых зерен: с поля удаляли все растения с фертильной или полуфертильной пылью (фенотип $ms2$ по классификации Оуэна). На поле оставляли только растения с полностью дефектной пылью ($ms0$ и $ms1$) (Owen F.V., 1945). В беспыльцевом режиме репродукции становится возможным развитие эмбрионов без оплодотворения (партеногенез или апоизоготия). Успех апоизоготического развития выше у яйцеклеток с диплоидным набором хромосом, чем у яйцеклеток с гаплоидным (несбалансированным) набором хромосом (Yudanovа. 2003).

Статистическая обработка данных. Оценку достоверности различий между распределениями эмпирических значений проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона с использованием методики расчета критерия χ^2 для многопольных таблиц.

Результаты. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Основная часть потомков гибрида представлена РЦ фенотипами, только около 15% составляют сростноцветковые СЦ фенотипы (поколение A_0 , опыт 1). Замачивание семян в колхицине и получение из них миксоплоидных растений ведет к достоверному изменению соотношения РЦ-СЦ фенотипов в потомстве (поколение A_0C_0 , опыт 1). Доля растений СЦ фенотипа по сравнению с контролем, возросла более чем в два раза (около 36%). Различия достоверны с вероятностью превышающей 95%.

В опыте 2 сравнивали соотношение растений РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A_0 и A_1 , т.е. оценивалось влияние однородительской репродукции. Доля растений СЦ фенотипа в поколение A_1 возросла вдвое (более 45%). Различия достоверны с вероятностью превышающей 99%. Это свидетельствует о том, что любая форма репродукции без отбора (в том числе и апоизоготическая) ведет к повышению доли растений СЦ фенотипа в потомстве.

Сравнение соотношения РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A_0C_0 и A_1C_1 (опыт 3) показало, что в миксоплоидных потомствах после апоизоготической репродукции семян (поколение A_1C_1) доля растений СЦ фенотипа возросла с 36% почти до 80% ($P > 0,999$). Из наблюдений опытов 2 и 3 следует, что совокупное влияние однородительского размножения (поколение A_1) и повышение уровня миксоплоидии (поколение A_1C_1) превращает РЦ гибрид в сростноцветковую форму свеклы.

Таблица 1 — Сравнительный анализ экспрессии признака РЦ-СЦ у гибрида Н2 под влиянием колхицина, 5-азацитидина и однократного размножения

Опыт	Поклоение	Число растений с фенотипом		Итого	Х ²
		РЦ	СЦ		
1	A ₀	26	5	31	3,97*
	A ₀ C ₀	43	24	67	
	Итого:	69	29	98	
2	A ₀	26	5	31	6,8**
	A ₁	20	17	37	
	Итого:	46	22	68	
3	A ₀ C ₀	43	24	67	19,7***
	A ₁ C ₁	10	36	46	
	Итого:	53	60	113	
4	A ₁	20	17	37	7,2**
	A ₁ Az ₀	33	7	40	
	Итого:	53	24	77	
5	A ₁ C ₁	10	36	46	22,7***
	A ₁ C ₁ Az ₀	31	12	43	
	Итого:	41	48	89	
6	A ₀ C ₀ Az ₀	31	12	43	1,7
	A ₀ C ₀ Az ₁	77	17	94	
	Итого:	108	29	137	
7	A ₁ Az ₀	33	7	40	0,3
	A ₁ Az ₁	31	9	40	
	Итого:	64	16	80	

Примечание: ** различия достоверны при $P > 0,95$, *** различия достоверны при $P > 0,99$, **** различия достоверны при $P > 0,999$.

Обработка растений 5-азацитидином (поклоение A₁Az₀) приводит к резкому изменению соотношения растений двух фенотипов: доля растений с РЦ-фенотипом возрастает с 54% до более чем 80% (опыт 4). РЦ растений становится примерно столько же, сколько и у исходного гибрида Н2 (поклоение A₀). Аналогичная картина наблюдается и в опыте 5, где сравнивали соотношение РЦ-СЦ фенотипов в поколениях A₀C₀ и A₁C₁Az₀. После обработки миксоплоидных растений 5-азацитидином (поклоение A₁C₁Az₀) резко возрастает доля растений с РЦ-фенотипом с 21% до более чем 70%.

Наблюдение за признаком РЦ-СЦ в поколениях A₁C₁Az₀ и A₂C₂Az₁ (опыт 6) свидетельствует что, вариабельность в обоих вариантах опыта по РЦ-СЦ признаку была примерно одинаковой ($0,60 < P > 0,70$). В поколении A₁C₁Az₀ доля растений РЦ фенотипа составила более 70%, а в поколении A₂C₂Az₁ более 80%, что близко к контролю (поклоение A₀). Таким образом, апозиготическое размножение после обработки 5-азацитидином не оказало никакого воздействия на соотношение фенотипов растений в двух поколениях репродукции. Как и в предыдущем опыте апозиготическое размножение после обработки 5-азацитидином (сравнение поколений A₁C₁Az₀ и A₂C₂Az₁) не оказало никакого воздействия на соотношение фенотипов растений (опыт 7). Соотношение РЦ-СЦ растений было близко к контролю (поклоение A₀).

В систематике растений размер генома - число хромосом в соматических ($2n$) и генеративных клетках (n) - рассматривается как видовой знак. Несмотря на это, миксоплоидия клеточных популяций - широко распространенное явление в растительном мире, имеющее общебиологическое и эволюционное значение (Лусс, 1935; Хохлов, 1965; Малюта, 1986). Пластичность структуры генома - наличие в популяциях клеток с различной ploидностью ядра, является основой для изменения способа репродукции, т.к. полиплоидия и апозиготия (партеногенез) взаимосвязаны и взаимообусловлены (Stebbins, 1950; Richards, 1986; 1997).

Рассматривая наши экспериментальные данные, можно сделать вывод, 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-азацитидин, вызывая гипометилирование генома, активирует РЦ гены, что ведет к резкому повышению доли растений РЦ фенотипа в потомствах. Это свойство наследуется и в следующем поколении репродукции. По-видимому, РЦ-растениям в норме присущ более низкий уровень метилирования генома, чем СЦ-растениям.

Как известно, источником изменчивости многих фенотипических признаков является не только изменчивость генов, но и изменчивость биологических структур более высокого порядка (миксоплоидия, морфогенез и др.). К числу таких структур, оказывающих влияние на фенотипическую изменчивость признаков, относится и изменчивость клеточных популяций меристем по уровню ploидности ядер. Изменчивость клеток по числу гаплоидных наборов на ядро (миксоплоидия) оказывает мощное влияние на фенотипы репродуктивных признаков. Как следует из ранее проведенных экспериментов, это, прежде всего, относится к признакам соцветий и к признакам репродукции семян апозиготическим способом. У мелкоклеточных растений (пониженный уровень миксоплоидии, малый размер клеток), размножаемых перекрестным опылением (гибридизация), наблюдается слабая склонность к партеногенетическому (апозиготическому) способу завязывания семян. Повышение миксоплоидности клеточных популяций у таких растений (обработка колхицином) приводит к достоверному повышению завязываемости семян апозиготическим способом. К еще большему результату приводит повторная апозиготическая репродукция пыльцестерильных растений (Yudanovа, 2003).

Список литературы

1. Бордонос М.Г. Характер расщепления и некоторые особенности свекловичных высадок с одноцветковыми семенами. // Селекция и семеноводство, 1938, т. 6. - С.24-27.
2. Бордонос М.Г. К изучению наследственности односемянности у свеклы. // Основные выводы научно-исследовательских работ ВНИСС 1937 год. - М.- Л.: «Пищепромиздат». - 1939. - С.357-359.
3. Бордонос М.Г. Односемянные формы сахарной свеклы. // Докл. ВАСХНИЛ. - 1941. - т.11. - С 3-4.
4. Лусс А.И. Вегетативные мутации. // Теоретические основы селекции

- растений. М.-Л.: «Сельхозгиз». - 1935. - т.1. - С.215-292.
5. Малецкий С.И., Шавруков Ю.Н., Мглинец А.В. Наследование признака раздельноплодности у сахарной свеклы. // Генетика сахарной свеклы. - Новосибирск: «Наука». - 1984. - С.60-65.
6. Малецкий С.И., Шавруков Ю.Н., Мглинец А.В. Наследование признака раздельно-спостноцветковости. // Одноростковость свеклы. - Эмбриология, генетика, селекция. - Новосибирск: «Наука», Сибирское отделение. - 1988. - С.79 - 131.
7. Малецкий С.И., Шавруков Ю.Н. Генетический контроль раздельно-спостноцветковости. // Генетический контроль размножения сахарной свеклы. Новосибирск: «Наука», Сибирское отделение. - 1991. С.50-113.
8. Малецкий С.И. Эпигенетическая изменчивость признака раздельноспостноцветковости у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). // Идентифицированный генофонд растений и селекция. - СПб.: ВИР. - 2005. - С.179-189.
9. Можейко М.А. Синергетика // Новейший философский словарь. - Минск: Книжный дом. - 2003. - - С. 902-913.
10. Струк Т.И., Осипова З.А. Влияние гибридизации и полиплоидии на структурную организацию листа у сахарной свеклы. // Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. Новосибирск: «Наука». - 1982. - С.77-87.
11. Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Эпипластомная изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). // Генетика. - 2004. т.40. - № 7. - С.930-939.
12. Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* Z.) // Генетика. - 2002. т. 38. - №1. - С.72-78.
13. Barocka K.H. Die .Einzelfruchtigen der Gattung *Beta* L. im Hinblick auf ihre mugliche Verwendung zur Einkreuzung in *Beta vulgaris* L. // Der Zuchter, 1959. V. 29. P. 193-203.
14. Barocka K.H. Die Variabilitat des Fruchtmerkmals Mehrblutigkeit von *Beta vulgaris* L. // Z. Pflanzenzuchter, 1960. B. 43 (4) S. 377-389.
15. Knapp E. Die genetischen Grundlagen die Einzelfruchtigkeit (Monokarpie) bei *Beta vulgaris* L. // Tag. Ber. Dt. Acad. Landwirtsch. Wiss. DDR, 1967. B. 89. P. 189-213.
16. Maletskaya E.I., Yudanov S.S., Maletskii S.I. Epigenetic and epipistome variability in apozygotic progenies of sugar beet treated by 5-azacytidine. // Sugar Tech, 2002, V.4 (1&2). P. 52-56.
17. Maletskii S.I. Epigenetical variability of the unianthy and synanthy expression in sugar beet. Sugar Tech, 1999. V. V.1(1&2)). P. 23-29.
18. Savitsky V.F. A genetic study of monogerm characters in beet. // Proc. Amer. Soc. Sugar Beet Technol, 1952. V. 7. P. 331-338.
19. Stebbins G.L., Apomixis in relation to variation and evolution. // Variation and Evolution in Plants. Chapter X. N. Y.: Columbia University Press, 1950. P.380 - 419.
20. Townsend C.O.. Single germ beet seed. // Heredity, 1915. V.6. P. 351-354.
21. Yudanov S.S. Mixoploidy and apozygoty in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar Tech, 2003. V.5 (3). P. 173-178.

Анотація

У статті показана різна природа одно- і багатонасінності цукрових буряків. Робиться висновок про епігенетичний характер наслідування РК-СК ознаки. Наведені результати спостережень РК-ознаки у рослин з різним рівнем міксоплоїдії. Колхіцинування приводить до інактивації РК генів і підвищення частки СК фенотипів у нащадків.

Annotation

The article shows different nature of mono- and multigermy of sugaar beet. A conclusion about epigenetical character of imianthy-synanthy trait is made. The results of observation of unianthy trait in plants with different levels of mixoploidy are given. Colchicine treatment results in inactivation of unianthy genes and increasing portion of synanthy phenotypes in progenies.