

## ТИПЫ СООТНОШЕНИЙ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ КЛАССОВ ПРИ АГАМОСПЕРМИИ

Полученные к настоящему времени факты свидетельствуют о том, что полиморфизм в агамоспермных потомствах диплоидных растений обусловлен комбинаторными процессами. К этим комбинаторным процессам, прежде всего, относится мейоз, происходящий в тетраплоидных материнских клетках мегаспор, присутствующих в качестве примеси среди основной массы диплоидных клеток материнского растения [1]. Другой комбинаторный процесс происходит в апозиготической клетке перед её вступлением в эмбриогенез и представляет собой случайный равновероятный выбор из множества эндоредуплицированных в результате политенизации копий исследуемого участка хроматид по одной копии от каждой из пары гомологичных хромосом [2–4].

Начало выбора представляет собой случайное равновероятное прикрепление одной из копий к ядерной мембране или к ядерному матриксу. Неприкрепившиеся копии аллелей в ходе первых делений эмбриогенеза теряются из ядра и клетки [2, 3]. Этот процесс сходен с диминуцией у циклопов [5, 6]. Возможно также совместное проявление этих двух комбинаторных процессов [4]. Диминуция возможна при вступлении в эмбриогенез клетки зародышевого мешка, или клетки нуцеллуса и интегументов [2–4, 7]. Различные типы комбинаторных процессов и их сочетание приводят к разным соотношениям фенотипических классов в агамоспермных потомствах [8].

Удобным инструментом для изучения агамоспермии явились изоферменты. Замечательной особенностью изоферментов является их кодоминантное наследование, благодаря которому изоферментный спектр гибридного растения отличается от изоферментного спектра каждого из родителей. Это позволяет в потомстве гетерозиготного по ферментному локусу растения выявлять все три фенотипические классы: два гомозиготных и один гетерозиготный [9, 10]. Использование изоферментов в качестве генетических маркеров позволяет по соотношениям фенотипов предполагать ход событий, обеспечивших

появление данного потомства, и таким образом классифицировать типы агамоспермного размножения растений [8].

С появлением данных, свидетельствующих о существовании комбинаторных процессов, обусловленных дифференциальной политенизацией хромосом и диминуцией избыточных участков хроматид, появилась возможность понимания и классификации агамоспермной природы гораздо большего числа потомств. В связи с этим, целью данной работы было дать новую интерпретацию ранее полученных и новых экспериментальных данных.

### Материалы и методы

В качестве материала для исследования были взяты агамоспермные потомства, полученные от пыльцестерильных растений сахарной свеклы в беспыльцевом режиме. Для создания беспыльцевого режима в период цветения на поле оставляли только растения фенотипа ms0 и ms1 по классификации Оуэна [11], а также использовали индивидуальные изоляторы.

В полученных семенных потомствах анализировали соотношение фенотипических классов ферментов алкогольдегидрогеназы (ADH1, К.Ф. 1.1.1.1), малик-фермента (ME1, К.Ф. 1.1.1.40), изоцитратдегидрогеназы (IDH3, К.Ф. 1.1.1.42) методом электрофореза в крахмальном геле с последующим гистохимическим выявлением изоферментов на электрофореграммах [12, 13]. Выявленные экспериментальные соотношения сопоставляли с теоретически ожидаемыми (3:8:3 and 1:2:1) с помощью критерия  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

В таблицах 1 и 2 представлены результаты исследований агамоспермных потомств, проведенных в разные годы. Соотношения фенотипических классов сравнивали с соотношением 3:8:3, характерным для гаметиического соотношения у тетраплоида. Это делалось на том основании, что полиморфизм, выявляемый в диплоидном агамоспермном потомстве, полученном от диплоидного растения, обусловлен мейозом в тетраплоидных клетках, присутствующих в качестве примеси

среди основной массы диплоидных клеток [1]. Также проводили сопоставление с классическим менделевским соотношением 1:2:1.

Соотношение фенотипических классов по ADH1 67FF:94FS:68SS в потомстве 1–4 достоверно отличается от 3:8:3 и 1:2:1 (табл. 1). Это соотношение уже приводилось нами в предыдущей статье [4] и объяснялось следующим образом.

После формирования яйцеклеток в соотношении 3:8:3, а также при отсутствии пыльцы и задержке опыления в яйцеклетках может происходить политенизация отдельных участков хромосом. Но перед переходом к эмбриогенезу яйцеклетка освобождается от избыточных копий участков хроматид случайным равновероятным образом.

В результате этого в некоторых изначально гетероаллельных яйцеклетках в ядре остается по два одинаковых аллеля. Это приводит к тому, что доля гетероаллельных яйцеклеток уменьшается, а гомоаллельных – увеличивается. Расчеты этого процесса подробно описаны в ранее опубликованной статье [4], причем в этом приводимом случае уменьшение доли гетероаллельного класса произошло настолько сильно, что его частота стала достоверно ниже 0.5, и нарушилось соотношение 1:2:1 (табл. 1).

В других случаях это уменьшение менее сильное, и в таком потомстве наблюдается соотношение фенотипов, соответствующее соотношению 1:2:1 (табл. 1, 2). Рассмотрение данных в таблицах 1 и 2 показывает, что у значительной части представленных здесь потомств соотношения фенотипов симметричны, либо имеющиеся в них отклонения от симметрии незначительны, и они не приводят к достоверным отличиям от соотношения 1:2:1. Опираясь на наши предыдущие исследования можно сказать, что такие потомства получены путем мейотической агамоспермии. Этот путь включает в себя такие процессы как: мейоз в тетраплоидных материнских клетках мегаспор, политенизацию в яйцеклетках участков хромосом, несущих маркерные ферментные локусы, и случайную равновероятную диминуцию избыточных копий аллельных генов яйцеклеткой перед её вступлением в эмбриогенез. Источником симметрии в соотношении фенотипических классов является равная доза аллелей у гетерозиготных тетраплоидных материнских

клеток мегаспор, возникающих в результате удвоения числа хромосом в некоторых диплоидных клетках диплоидного материнского растения. Например, при полиплоидизации клетки генотипа FS образуется клетка генотипа FFSS с равной дозой аллелей. Это равенство сохраняется и при последующей политенизации участка гомологичных хромосом, несущего данный маркерный ген. Следует отметить, что по нашим оценкам степень политенизации участков хромосом в яйцеклетках невелика и равна 2 [4].

Другой тип соотношений фенотипических классов характеризуется резкими отличиями от соотношения 1:2:1, что можно видеть на примере потомства растения 7-7 (табл. 2). Эти соотношения могут также достоверно отличаться и от соотношения 3:8:3 (потомства растений 17-2 и 17-6, табл. 2).

Потомство растения 7-7 характеризуется высокой долей гетероаллельного класса. Это позволяет предположить, что геномы клеток, вступающих в эмбриогенез, прошли лишь один этап преобразований. Таким этапом мог быть процесс либо процесс диминуции избыточных копий аллелей маркерного локуса *Mel*, либо только мейоз. В таком случае данное потомство можно рассматривать либо как потомство, полученное путем митотической агамоспермии из соматических клеток, или как потомство, возникшее из диплоидных яйцеклеток.

Процесс образования потомств растений 17-2 и 17-6 в силу их ярко выраженной асимметрии соотношений фенотипических классов с большой вероятностью можно отнести к митотической агамоспермии (табл. 2). Такая асимметрия может являться следствием известной независимости степени политенизации аллелей в соматических клетках растений, приводящей к разной дозе аллелей [14].

Развиваемый нами генетический способ классификации типов агамоспермного размножения отличается от цитологических методов возможностью анализа большого числа растений. Это придает, по нашему мнению, объективность полученным результатам. Кроме того, наш подход не подменяет собой цитозембриологические методы, а дополняет их.

Данная статья посвящена развитию метода генетической классификации типов агамоспермного размножения у растений на примере сахарной свеклы.

Таблица 1. Соотношения фенотипических классов по алкогольдегидрогеназе (ADH1) и малик ферменту (ME1) в агамоспермных потомствах сахарной свеклы

№ растения (год репродукции)	ADH1		ME1		Тип агамоспермии
	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	FF:FS:SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	
1-1 (2003)	33:52:9	1) <b>14.4255***</b> 2) <b>13.3.3191**</b>	25:32:17	1) <b>7.856*</b> 2)3.081	Мейотическая
11-1 (2003)	73:0:0		24:47:22	1)1.757 2)0.097	Мейотическая
11-1 (2004)	59:0:0		19:55:26	1)1.331 2)1.980	Мейотическая
2-6 (2003)	14:33:16	1)0.731 2)0.270	25:0:0		Мейотическая
2-6 (2004)	61:134:62	1)2,636 2)0,48	172:0:0		Мейотическая
2-8 (2004)	26:29:15	1) <b>11.092**</b> 2)5.514	20:29:21	1) <b>7.092*</b> 2)2.086	Мейотическая
12-2 (2003)	30:46:22	1)5.690 2)1.673	27:49:22	1)2.637 2)0.510	Мейотическая
12-2 (2004)	23:32:23	1) <b>8.274*</b> 2)2.512	25:31:22	1) <b>9.911**</b> 2)3.513	Мейотическая
7-12 (2003)	35:0:0		34:55:28	1)5.625 2)1.034	Мейотическая
5-7 (2007)	41:83:41	1)3,152 2)0,006	50:75:45	1) <b>12,120**</b> 2)2,447	Мейотическая
1-4 (2007)	67:94:68	1) <b>24,233***</b> 2) <b>7,349*</b>			Мейотическая

Примечание: Вероятность сходства с теоретически ожидаемыми соотношениями: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ .

Таблица 2. Соотношения фенотипических классов по изоцитратдегидрогеназе (IDH3) и малик-ферменту (ME1) в агамоспермных потомствах сахарной свеклы

№ растения (год репродукции)	IDH3		ME1		Тип агамоспермии
	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	FF : FS : SS	1) $\chi^2(3:8:3)$ 2) $\chi^2(1:2:1)$	
11-2 (2004)	31:69:47	1) <b>10,313**</b> 2)4,034	45:60:44	1) <b>17,34***</b> 2)5,658	Мейотическая
12-5 (2003, 2004)	21:26:20	1) <b>9,2338**</b> 2)3,3881	18:40:15	1)0,452 2)0,918	Мейотическая
КА-8 (2003)	31:62:21	1)2.401 2)2.632	22:59:45	1) <b>15.273***</b> 2) <b>8.905*</b>	Митотическая
7-7 (2003, 2004)	37:0:0		23:96:28	1)4.397 2) <b>14.116***</b>	Митотическая- Мейотическая
17-2(2003)	34:30:11	1) <b>25.458***</b> 2) <b>17.107***</b>	40:0:0		Митотическая
17-6 (2003, 2004)	52:51:17	1) <b>34.326***</b> 2) <b>23.117***</b>	36:0:0		Митотическая

Примечание: Вероятность сходства с теоретически ожидаемыми соотношениями: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ .

Возможность классификации обеспечивается использованием в качестве генетических маркеров изоферментов, позволяющих выявлять в анализируемом потомстве индивидуального диплоидного гетерозиготного растения все три генотипических класса. Классификация основана на том, что соотношения фенотипических классов в потомствах, полученных путем мейотической и митотической агамоспермии различаются.

### Литература

1. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 1996. – 32, № 12. – С. 1643–1650.
2. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. – 2005. – N 7. – P. 67–70.
3. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants. 2007. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>.
4. Levites E.V., Kirikovich S.S. Post-meiotic apozygotic combinatory process in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2012. – N 3. – P. 75–79.
5. Ammermann D. Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus* // Chromosoma. – 1971. – 33. – P. 209–238.
6. Гришанин А.К., Акифьев А.П. Межпопуляционная дифференциация внутри *C. kolensis* and *C. strenuus strenuus* (Crustacea: Soropoda): доказательство на основе цитогенетических методов // Гидробиология. – 1999. – 417. – С. 37–42.
7. Левитес Е.В., Кирикович С.С. Автосегрегация ферментных локусов в агамоспермных потомствах триплоидных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2011. – 47, № 7. – С. 945–951.
8. Levites E.V. New classification of the reproduction modes in sugar beet // Sugar Tech. – 2002. – N 4. – P. 45–51.
9. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: gene duplication and repression // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1966. – 56. – P. 1431–1436.
10. Scandalios J.G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: a review // Biochemical Genetics. – 1969. – 3. – P. 37–79.
11. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet // Journal of Agricultural Research. – 1945. – 71. – P. 423–440.
12. Meizel S., Markert C.L. Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail *Ilyanassa obsoleta* // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1967. – 122. – P. 753–765.
13. Vallejos C.E. Enzyme activity staining. In: Isozymes in plant genetics and breeding. – Part A. – Elsevier, Amsterdam, 1983. – P. 469–515.
14. Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M. Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus coccineus* embryo suspensor cells: Morphological, autoradiographic and cytophotometric analyses // Chromosoma. – 1982. – 86. – P. 383–396.

### KIRIKOVICH S.S., LEVITES E.V.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences Russia, Russia, 630090, Novosibirsk, ave. Lavrent'eva, 10, e-mail: svetak@bionet.nsc.ru*

### THE TYPES OF PHENOTYPIC CLASS RATIOS UNDER AGAMOSPERMY

**Aims.** With the appearance of evidence of the existence of combinatorial processes due to differential polyteny of chromosomes and diminution of redundant chromatid segments, it became possible to understand and classify the nature of agamospermy for a much larger number of progenies. In this connection, this work aims to give an interpretation of the previously obtained and new experimental data.

**Methods.** The ratios of enzyme phenotypic classes for alcohol dehydrogenase (ADH1), malic enzyme (ME1), isocitrate dehydrogenase (IDH3) were analyzed using electrophoresis in starch gel with further

### Выводы

1. Проанализировано 15 потомств сахарной свеклы, полученных агамоспермным путем в разные годы выращивания.

2. Показано, что по типу соотношения фенотипических классов в потомстве можно определить, какой тип семенной репродукции лежит в основе образования данного потомства: мейотическая или митотическая агамоспермия.

3. Существенным признаком мейотической агамоспермии является симметричное соотношение фенотипических классов, а митотической агамоспермии – асимметричное.

isozymes histochemical staining in electrophoregrams. **Results.** Phenotypic ratio types of agamosperous progenies obtained from 15 maternal plants were analyzed. It was shown that with the help of phenotypic classes ratios in the progenies it is possible to classify the type of agamospermy. **Conclusions.** This article focuses on the development of the method for the genetic classification of agamosperous reproduction types in plants using sugar beet as an example. The classification feasibility is ensured by the use of isozymes as genetic markers allowing the identification of all three phenotypic classes in the progeny of individual heterozygous diploid plant and is based on different phenotypic class ratios in the progenies obtained by meiotic and mitotic agamospermy.

*Key words:* Agamospermy, isozymes, polyteny, sugar beet.

УДК 631.522:581.163:633.413:577.151.64:575.113.2

ЛЕВИТЕС Е.В.

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru*

### ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ В СЕМЕННОМ ПОТОМСТВЕ ПРИ МИТОТИЧЕСКОЙ АГАМОСПЕРМИИ

В настоящее время получено достаточно большое количество данных, свидетельствующих о полиморфизме в агамоспермных потомствах диплоидных растений. Одно из объяснений этого полиморфизма основано на признании большой роли миксоплоидии у растений. Миксоплоидия проявляется как примесь тетраплоидных клеток среди основной массы диплоидных клеток археспория материнского растения [1, 2].

Вступление такой клетки в мейоз приводит к образованию диплоидных зародышевых мешков и, соответственно, к образованию диплоидных яйцеклеток, способных вступать в эмбриогенез без оплодотворения [1]. Этот механизм характерен для мейотической диплоспории, которую можно обозначить также как мейотическая агамоспермия [3]. Полиморфизм в таком случае является закономерным следствием мейоза и обозначен хорошо известным термином «автосегрегация» [4, 5]. Генетические и цитологические данные подтверждают эту гипотезу [6].

Наряду с этим, был предложен механизм, предполагающий, что большую роль в возникновении полиморфизма играет политенизация участков хромосом, несущих маркерные локусы. Предполагается, что дифференциальная политенизация приводит в дальнейшем к случайной, равновероятной потере избытка хроматина клеткой перед её вступлением в эмбриогенез [7, 8].

Проведенные на основании генетических данных расчеты показывают, что дифферен-

циальная политенизация хромосом и последующая диминуция избытка хроматина возможны как при мейотической агамоспермии [9], так и в том случае, когда потомство образуется из соматических клеток, не претерпевших мейотических преобразований генома (адвентивная эмбриония или митотическая агамоспермия) [7, 8]. Кроме того, получены генетические доказательства того, что политенизация участков хромосом возможна и при половом размножении растений [10]. В настоящее время показана зависимость этого процесса от внешних условий [11].

Накопленные результаты исследований агамоспермных потомств, рассматриваемые с учетом гипотезы о дифференциальной политении хромосом, позволяют по-новому взглянуть на многие генетические процессы и причины многих отклонений в соотношении гено- и фенотипов в образующемся потомстве. Характерной особенностью полиморфизма при агамоспермии является несовпадение выявляемых соотношений с известными менделевскими пропорциями.

Учет влияния политенизации участков хромосом, несущих маркерные гены, на сегрегацию соответствующих маркерных признаков расширяет границы генетики. В настоящее время можно говорить о различных типах сегрегации признаков: как связанной с изменением числа хромосом в клетке (мейоз и встреча гамет), так и не связанной с изменением числа хромосом (сегрегация эндоредуплицированных участков хроматид).

Время, прошедшее с начала проводимых