

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

нами исследований, и обнаруживаемые нами факты постепенно меняли представления о механизмах, лежащих в основе наблюдаемой изменчивости в агамоспермных потомствах. В связи с этим возникает необходимость повторного рассмотрения полученных ранее данных. Это и явилось целью данной статьи.

Повторно будут рассмотрены данные, приведенные в статье, озаглавленной «Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)» [12]. В качестве генетических маркеров в этой работе использовались изоферменты, множественные молекулярные формы ферментов [13, 14], позволяющие выявлять в потомстве гетерозиготного по ферментному локусу растения три гено- и фенотипических класса. В этой работе генетическим методом было показано, что проанализированные агамоспермные потомства сахарной свеклы образовались из соматических клеток. Основанием к такому заключению был мономорфизм одного потомства (KWS1-5A) по гетерозиготному изоферментному спектру алкогольдегидрогеназы (АДГ). Еще одно интересное явление, выявленное в данном исследовании, это диморфизм анализируемых потомств, в том числе и KWS1-5A, по другим маркерным ферментам. Диморфизм представлял собой наличие в потомстве только двух фенотипических классов: одного гомозиготного и одного гетерозиготного. Из опубликованных в этой статье данных приведем только два потомства: KWS1-5A и КНВС2-78А (табл.).

Первоначально предполагалось, что выявляемый диморфизм является результатом инактивации у части потомков одного из аллелей гетерозиготного локуса. Такая инактивация может приводить к тому, что фенотип, сходный с гомозиготным, несет один активный аллель, определяющий электрофоретическую подвижность фермента, и инактивированный аллель. Однако, в даль-

нейшем было установлено, что фенотип, сходный с гомозиготой, действительно является гомозиготой [15].

Это послужило поводом для выдвижения гипотезы о том, что диморфизм был обусловлен гетерозиготностью маркерного ферментного локуса, в котором один из аллелей был представлен одной копией, а второй аллель в результате политенизации был представлен тремя копиями. Политенизация хромосом у растений представляет собой хорошо известный факт [16]. Предполагается, что соматическая клетка генотипа *FFFS* перед вступлением в эмбриогенез освобождалась от избытка копий аллелей случайным равновероятным образом согласно вероятностным законам; и процесс этот описывается формулами гипергеометрического распределения [17]. Проведенный по формулам гипергеометрического распределения расчет показывает, что в данном случае теоретически возможны только два генотипа *FF* и *FS* в соотношении 1:1.

Расчет этот таков:

для *FF* – число сочетаний из трех по два C_3^2 , равно 3;

для *FS* – число сочетаний из трех по одному, умноженное на число сочетаний из одного по одному ($C_3^1 \times C_1^1$), т.е. $3 \times 1 = 3$.

Генотип *SS* не образуется, поскольку для него нужны две копии аллеля, а в геноме присутствует всего лишь одна.

Для равновероятного процесса диминуции необходим свободный обмен хроматидами между хромосомами. Существование такого обмена было обнаружено позднее по соотношению фенотипов в агамоспермном потомстве растения, обработанного колхицином [9].

В связи с выше изложенным, представляет интерес рассмотрение соотношений фенотипов по ферментам изоцитратдегидрогеназа (IDH3) и малатдегидрогеназа (MDH1) в потомстве КНВС2-78А (табл.).

Таблица. Фенотипические классы маркерных ферментов в агамоспермных потомствах, полученных от пыльцестерильных растений сахарной свеклы [12]

Потомство	Фенотипы маркерных ферментов в потомстве		
	ADH1	IDH3	MDH1
	FF : FS : SS	FF : FS : SS	FF : FS : SS
KWS1-5A	0:78:0	23:41:0*	9:0:0
КНВС2-78А	-	9:47:10**	45:57:0*

Примечание: вероятность сходства с теоретически ожидаемым соотношением 3:8:3 – * – $P < 0,001$; ** – $P > 0,05$.

Это потомство представляет собой особый интерес, поскольку в нем проявились сразу два характерных для агамоспермных потомств признака: наличие соотношения фенотипов, соответствующее 3:8:3 по IDH3, и диморфизм по MDH1. Диморфизм по MDH1 указывает на то, что данное потомство возникло из соматических клеток с разной дозой аллелей в локусе *Mdh1*, а соматическая природа этих клеток указывает на то, что в их ядрах не прошли мейотические преобразования генома.

Известно, что соотношение 3:8:3 получается, когда случайным образом из совокупности, содержащей 4 элемента одного типа и 4 элемента другого типа, выбирается 2 элемента. Такая ситуация, происходит, например, когда тетраплоидная гетерозигота генотипа *FFSS* вступает в мейоз. Поскольку каждая хромосома в этот момент представлена двумя хроматидами, в ядре присутствуют 8 аллельных копий, по 4 копии каждого из 2-х аллелей. На примере расчета частот гамет у такого тетраплоида можно рассмотреть и процесс формирования частот фенотипических классов в агамоспермном потомстве при митотической агамоспермии.

Если частота перекреста между маркерным локусом и центромерой 50%, то все копии аллелей при мейозе независимы, и поэтому случайное сочетание двух копий аллелей, попадающих в одну гамету, подчиняется закону вероятности. Частоты образующихся гамет можно рассчитать по формулам гипергеометрического распределения. Для рассматриваемого здесь примера частоты генотипов гамет в долях от единицы будут определяться следующим образом.

Для $FF - C^2_4 C^0_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 2, умноженное на число сочетаний из 4 по 0 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $6 \times 1 / 28$.

Для $FS - C^1_4 C^1_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 1, умноженное на число сочетаний из 4 по 1 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $4 \times 4 / 28$.

Для $SS - C^0_4 C^2_4 / C^2_8$; число сочетаний из 4 по 0, умноженное на число сочетаний из 4 по 2 и деленное на число сочетаний из 8 по 2, т.е. $6 \times 1 / 28$.

Сократив эту пропорцию и выразив её в целых числах, получаем 3:8:3.

Именно в таких же пропорциях могут

формироваться фенотипы и при митотической агамоспермии. На этом основании можно сказать, что наблюдаемое в потомстве КНВС2-78А соотношение 3:8:3 по ферменту IDH3 указывает на два факта: 1) это потомство возникло из клеток, у которых изначально в локусе присутствовало увеличенное число копий каждого аллеля, 2) число копий аллелей уменьшилось к моменту вступления клеток в эмбриогенез.

Но с другой стороны, наличие в этом же самом потомстве двух фенотипических классов по MDH1 указывает на то, что это потомство произошло из клеток, не претерпевших мейотических преобразований генома. Следовательно, уменьшение числа копий аллелей в локусе *ldh3* произошло не мейотическим путем. Отсюда следует, что единственный путь для уменьшения числа аллельных копий – это диминуция. Именно диминуцией можно объяснить соотношения фенотипов в обоих представленных здесь потомствах.

В заключение следует добавить, что согласно предложенной ранее гипотезе равновероятный процесс диминуции избыточных копий аллелей представляет собой следствие равновероятного характера прикрепления копий аллелей к ядерной мембране, т.е. процесс диминуции начинается с прикрепления к ядерной мембране. Предполагается, что к ядерной мембране прикрепляется только по одной копии от каждой хромосомы, а неприкрепившиеся копии теряются [7, 8].

Выводы

Повторное обращение к опубликованным ранее данным с учетом накопленных фактов позволило акцентировать внимание на наличие в одном из исследованных потомств генетических характеристик, которые в совокупности подтверждают модель, объясняющую специфический механизм формирования полиморфизма в агамоспермных потомствах. Наличие в этом потомстве сразу двух взаимодополняющих признаков (вступление в эмбриогенез соматических клеток и увеличенная доза аллелей в клетках перед их вступлением в эмбриогенез) подтверждает и агамоспермное происхождение потомства и наличие процесса диминуции перед вступлением клеток в эмбриогенез.

Литература

1. Maletskii S.I., Maletskaya E.I. Self-fertility and agamospermy in sugar beet *Beta vulgaris* L. // Russian Journal of Genetics. – 1996. – 32. – P. 1643–1650.
2. Maletskaya E.I., Maletskaya S.S. The nuclear DNA mass variability in embryo root cells of sugarbeet // Sugar Tech. – 1999. – 1. – P. 30–36.
3. Levites E.V. New classification of the reproduction modes in sugar beet [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2002. – 4. – P. 45–51. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02956879>
4. Gustafsson A. Apomixis in higher plants // I-III. Lunds Univ. Arsskr. N.F. Avd. – 1946–1947. – 43 (42–43). – P. 1–370.
5. Maletskii S.I., Levites E.V., Maletskaya E.I., Ovechkina O.N. Autosegregation and linked inheritance in agamospermic pedigrees of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Russ. Jour. Genetics. – 1999. – 34, N 4. – P. 520–527.
6. Szkutnik T. Apomixis in the Sugar Beet Reproduction System // Acta Biol. Cracoviensia, Ser. Bot. – 2010. – 52, N 1. – P. 87–96.
7. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2005. – 7. – P. 67–70. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02942532>
8. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants [Электронный ресурс] // Arxiv.org. – Режим доступа: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
9. Levites E.V., Kirikovich S.S. Post-meiotic apozygotic combinatory process in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2012. – 3. – P. 75–79. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.31011>
10. Levites E.V., Kirikovich S.S. Zygotic combinatorial process in plants [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – 4. – P. 798–803. – Режим доступа: [doi:10.4236/abb.2013.47104](http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.47104)
11. Levites E.V., Kirikovich S.S. Influence of external conditions on the combinatorial processes at agamospermy [Электронный ресурс] // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – 4. – P. 89–94. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.410A3010>
12. Levites E.V., Shkutnik T., Ovechkina O.N., Maletskii S.I. Pseudosegregation in the agamospermic progeny of male sterile plants of the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Doklady Biological Sciences. – 1999. – 365. – P. 182–184.
13. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: Gene duplication and repression [Электронный ресурс] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1966. – 56. – P. 1431–1436. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.56.5.1431>
14. Scandalios J.G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: A review [Электронный ресурс] // Biochemical Genetics. – 1969. – 3. – P. 37–79. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00485973>
15. Levites E.V., Kirikovich S.S. Epigenetic variability of unlinked enzyme genes in agamospermous progeny of sugar beet [Электронный ресурс] // Sugar Tech. – 2003. – 5, N 1&2. – P. 57–59. – Режим доступа: [doi:10.1007/BF02943765](http://dx.doi.org/10.1007/BF02943765)
16. Carvalheira G. Plant polytene chromosomes [Электронный ресурс] // Genetics and Molecular Biology. – 2000. – 23. – P. 1043–1050. – Режим доступа: [doi:10.1590/S1415-47572000000400050](http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000400050)
17. Feller W. An introduction to probability theory and its applications. – New York: John Wiley and Sons, INC., 1950.

LEVITES E.V.

*Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentieva ave., 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru*

GENETIC SEGREGATION IN SEED PROGENY UNDER MITOTIC AGAMOSPERMY

Aims. The previously published data are examined on the base of the hypothesis about the existence of chromosomes differential polyteny and excessive chromatin diminution during the first stages of sugar beet plant embryogenesis. **Conclusions.** It has been concluded that available data provide the genetic proof of that chromatin diminution is one of the mechanisms underlying the origin of polymorphism in sugar beet progenies under mitotic agamospermy.

Key words: isozymes, polyteny, diminution, agamospermy, non-Mendelian inheritance, sugar beet.