

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ РЕПРОДУКЦИИ

Многоуровневая организация живого представляет собой иерархическую лестницу от биоты к субклеточным структурам, формируя вокруг себя различные биологические дисциплины. «В контексте каждой из них именно данный уровень считается ... основным в организации живого и в понимании его сущности». Геноцентрическая парадигма находится на одном краю этой иерархии, сводя биологическое разнообразие к различиям между генами, а классическая организмоцентрическая – относится к более высокому уровню, где организм является ключевым элементом [1]. В рамках геноцентрической парадигмы признаки делят на дискретные и континуальные. Дискретные признаки, в свою очередь, подразделяют на альтернативные, связанные с мутационными изменениями, и счетные (число цветков, семян ...), изменчивость которых напрямую не связана с активностью генов, и определяется сигналами, получаемыми растением в ходе вегетации (условия произрастания и пр.). Обе группы признаков в рамках выборочных измерений образуют ряды цифр, являясь элементами «морфопространства». Альтернативной моделью можно считать эпигенетическую парадигму наследования<sup>1</sup>, которая не связывает индивидуальную изменчивость исключительно с изменениями в нуклеотидных последовательностях ДНК. Согласно иерархии живого этот уровень ближе к органоцентрической парадигме. В ее рамках можно выделить фрактальные (геометрические) признаки, присущие объекту как целому: структура сосудистых систем, структура корневой системы [1], а также эмбриональные и тканевые признаки. Дискретные, континуальные и фрактальные признаки четко различимы друг от друга геометрической размерностью (D). Если размерность дискретных и континуальных признаков выражается целыми числами – одно-,

двух-, трехмерные признаки [1, 2], то фрактальным присуща дробная размерность [2]. В частности морфо- и гистологические структуры у растений в ряде случаев соответствуют древовидным фракталам [3].

Вариабельность структуры эпидермы листа определяется как вариацией числа хромосом, хроматид, содержания ДНК (эпигеномная изменчивость), так и вариацией числа органелл в цитоплазме (эпипластомная изменчивость). У растений непостоянство содержания ДНК может проявляться различным образом. Одной из форм проявления является миксоплоидия (полисоматия), когда в одной ткани присутствуют клетки не только с основным числом хромосом (доминирующая фракция), но и клетки иного уровня пloidности; другой – изменение содержания ДНК в определенных тканях или в процессе онтогенеза. Непостоянство содержания ДНК, не связанное с изменением числа хромосом, наблюдается у ряда видов из-за политерии – наличия дупло- и квадруплохромосом [1, 2]. Известно, что у растений наибольшая полиплоидизация имеет место в эндосперме, что, вероятно, связано с запасующей функцией. Различные вариации эндополиплоидии (полиплоидия, политерии) встречаются и в клетках генеративной сферы у различных растений. Примечательно, что содержание ДНК у растений может повышаться в процессе созревания яйцеклетки или в зиготе сразу после оплодотворения, в процессе формирования зародыша, или же во время прорастания семян [1].

Миксоплоидия – распространенное явление у растений, поэтому уже через 20 лет после первого обнаружения [2] наличие миксоплоидии было показано еще в 20 ботанических родах [1]. Сахарная свекла не являлась исключением [10, 2]. Именно в семействе маревых (*Chenopodiaceae*) была отмечена высокая частота встречаемости миксоплоидии [1]. Показано также, что у растений она может проявляться как за счет эуплоидии, так и анеуплоидии [1, 2]. Причины могут быть различными: это может являться свидетельством пластичности генома или нести регуляторную

<sup>1</sup> Эпигенетика (греч. *επί* – над, выше, внешний) – изучает закономерности наследования различных изменений, не затрагивающих последовательности ДНК.

функцию [6]. При проведении цитометрических исследований у сахарной свеклы непостоянство содержания ДНК отмечено в ядрах клеток как вегетативных, так и генеративных органов [5, 6].

Существует прямая зависимость между содержанием ДНК, уровнем пloidности, объемом цитоплазмы и линейными размерами клеток, что в свою очередь влияет на число органелл в цитоплазме. Связь числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц с уровнем пloidности и размерами клеток давно известна [1, 2]. Однако в различных по происхождению материалах сахарной свёклы этот показатель может изменяться по-разному. Так в свободно размножаемых диплоидных популяциях среднее число хлоропластов варьирует в пределах 12–16 шт. на клетку [18], а при углублении инбридинга этот показатель повышается до 16–19 шт. [1]. Хлоропласты – внутриклеточные органеллы с собственным генетическим материалом. Если бы в ряду клеточных делений органеллы всегда распределялись бы поровну, то в каждой клетке растения содержалось бы столько же органелл, сколько их имела инициальная клетка. При неслучайном характере распределения органелл в момент цитокинеза возникает изменчивость их числа в популяциях соматических клеток (эпипластомная изменчивость). Но она обязана как случайной изменчивости, так и варьированию содержания ДНК в ядре (эпигеномная изменчивость).

Ткань растения представлена множеством клеток с различным числом органелл, начало которым положила одна инициальная клетка с определённым числом пластид. При делении пластиды могут распределиться между двумя дочерними клетками равномерно или неравномерно. Дочерние клетки в свою очередь делятся также либо равномерно, либо неравномерно и т.д. Таким образом, формируется своего рода «генеалогическое древо», геометрическая структура, которую можно определить термином «пластидный фрактал» [1]. Используя фрактальный подход к изучению клеточных популяций, мы получаем характеристику более высокого уровня согласно иерархии живого [1].

Целью данной работы было сравнение показателей изменчивости клеточных популяций в различных по происхождению и способу размножения материалах: у инбредной линии, коммерческого гибрида, поколения однопородительского размножения и их гибрида с линейным материалом.

## Материалы и методы

В исследовании использовали однопородительскую инбредную линию СОАН 22, коммерческий гибрид «Ленора» (поколение  $A_0$ ), ее потомство после однопородительского размножения (поколение  $A_1$ ) и гибрид (ручная гибридизация) ♀Ленора  $A_1$  × ♂СОАН 22.

Для осуществления однопородительского размножения на изолированном участке<sup>2</sup> до распускания первого цветка удаляют все фертильные и полуфертильные растения<sup>3</sup> (ms 2), оставляя только мс-растения (ms 0 и ms 1). Идентификация по фенотипу пыльцы проводится ежедневно в течение всего срока цветения, так как некоторые растения могут проявлять мозаичный фенотип. Таким способом получают поколение  $A_1$ . В беспыльцевом режиме репродукции становится возможным развитие эмбрионов без оплодотворения (апозиготия). Успех апозиготического развития выше у яйцеклеток с диплоидным набором хромосом, чем у гаплоидных яйцеклеток. Семенные потомства, получаемые при беспыльцевом режиме семенной репродукции, преимущественно являются дигаплоидами. Они формируются из диплоидных мегаспор, возникших, в свою очередь, из тетраплоидных мейоцитов. Ранее было показано, что у стерильных форм сахарной свеклы способность к формированию яйцеклеток с соматическим числом хромосом выше, чем у фертильных форм. Попадание полиплоидной клетки в зародышевый путь способствует проявлению дисомической сегрегации по многим маркерным локусам [2, 3].

Проводили ручную гибридизацию отдельных мс-растений, полученных после однопородительского размножения коммерческого гибрида «Ленора» (поколение  $A_1$ ) фертильной пыльцой линии СОАН 22. Для этого пергаментными изоляторами изолировали отдельные веточки стерильных растений (за 3–5 дней до начала раскрытия цветков); остальные побеги удаляли; с фертильных растений собирали пыльцу (перевозится на изолированный участок) и точно наносили ее на изолированные цветки.

Для исследования клеточной популяции *эпидермальной ткани* проводили подсчет числа

<sup>2</sup> Изолированный участок располагается в зоне, где отсутствуют как семеноводческие посадки свеклы.

<sup>3</sup> фенотипы стерильных растений определяли по классификации Оуэна [25]

хлоропластов на листьях первого года жизни. С нижней стороны листа снимали эпидермис, на который наносили раствор азотнокислого серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) для окрашивания хлоропластов. Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц проводили в 50 клетках каждого, включенного в эксперимент растения. Подсчитывали среднее число хлоропластов ( $M$ ), ошибку среднего значения ( $m$ ), дисперсию распределения ( $\sigma^2$ ). Сравнение между образцами проводили с помощью критерия  $t$  Стьюдента.

Совокупное число пластид в отдельной клетке обозначается термином «пластотип» ( $Pt$ ). В ткани встречается несколько пластотипов, отличающихся друг от друга по числу хлоропластов в цитоплазме клеток. Величина  $Pt$  соответствует числу пластотипов в исследуемой ткани<sup>4</sup>. Замыкающие клетки устьиц связаны между собой генеалогически, и описываются двумя параметрами: числом пластотипов в ткани листа ( $Pt$ ) и средним числом органелл на клетку ( $M$ ). Эти два параметра листовой ткани образуют пропорцию ( $M : Pt$ ), которая динамически меняется в ходе онтогенеза, характеризуя цитогенетический фрактал данной ткани. В клеточной популяции они связаны между собой формулой:  $M = Pt^D$ . Логарифмирование обеих сторон равенства позволяет найти интегральный параметр  $D$ , фрактальную размерность:  $D = \ln M / \ln Pt$  [3].

Данный показатель свидетельствует о стабильности или наоборот нестабильности клеточной популяции исследуемого растения. Значения этих соотношений у разных растений соответствуют обобщенному принципу формирования гармонических пропорций, «на основе и посредством которых в процессе самоорганизации естественные системы обретают гармоничное строение ... структурно-функциональную ... устойчивость» [26].

С биологической точки зрения, фрактальная размерность ( $D$ ) эпидермальной ткани соответствует эпигеномной и эпипластомной пластичности (нестабильности) клеток в ткани листа. Геометрическая пропорция двух величин ( $M:Pt$ ) позволяет связать признаки двух уровней: тканевого (среднее значение числа хлоропластов на

клетку) и индивидуального (среднее число пластотипов на ткань). Таким образом, эта пропорция представляет собой новый признак, присущий эпидермальной ткани листа (растения) как целому.

### Результаты и обсуждение

В таблице приведены результаты исследований клеточных популяций: среднее значение числа хлоропластов ( $M$ ) изменялось от 12,71 до 14,73, диапазон изменчивости ( $Pt$ ) клеточной популяции – от 6,8 до 9,3. Сравнение средних значений ( $M$ ) у родительских растений полученного от ручной гибридизации «♀ мсЛеноры, поколение  $A_1$ » и «линии ♂ СОАН 22» свидетельствуют о статистически достоверных различиях ( $t = 2,3, P > 0,95$ ). Также достоверны различия и по диапазону изменчивости клеточной популяции  $Pt$  ( $t = 5,14, P > 0,999$ ). Сравнение гибрида (♀ Ленора  $A_1$  x ♂ СОАН 22) по средним значениям с родительскими компонентами свидетельствует об отсутствии различий по числу хлоропластов как при сравнении с материнскими ( $t = 1,23$ ), так и с отцовскими ( $t = 0,97$ ) растениями. Однако сравнение по числу пластотипов ( $Pt$ ) у полученного гибрида различается только с отцовскими растениями ( $t = 3,51, P > 0,999$ ). Таким образом «паттерн изменчивости» гибрида и материнского растения ( $t = 0,13$ ) полностью идентичны. При однопородительском размножении гибрида «Ленора» так же отсутствуют достоверные различия ( $t = 0,18$ ) по диапазону изменчивости ( $Pt$ ) между исходными материнскими растениями (поколение  $A_0$ ) и их потомством после однократного однопородительского размножения (поколение  $A_1$ ), тогда как средние значения числа хлоропластов ( $M$ ) у них различаются ( $t = 3,61, P > 0,999$ ). Результаты свидетельствуют, что в потомствах, полученных как путем гибридизации, так и при однопородительском размножении, сохраняются изменчивость, соответствующая материнским растениям.

В настоящем исследовании изучение клеточной популяции проводилось на основе двух показателей – число хлоропластов в замыкающих устьиц и числом пластотипов в исследуемой ткани. Число хлоропластов – это признак, характеризующий отдельную клетку, тогда как число пластотипов – интегральный признак, присущий отдельному листу (или отдельному растению).

<sup>4</sup> Например, если в исследуемом материале в десяти клетках содержится 11 хлоропластов, еще в десяти – 12 хл., в других десяти – 13 хлоропластов, то значение  $Pt$  для популяции клеток будет равно трём.

Таблица. Изменчивость и статистические параметры клеток эпидермальной ткани листа

Материал	число растений*	M	Pt	D
Ленора A <sub>1</sub> x СОАН 22	15	14,04 ± 0,39	6,8 ± 0,67	1,4
СОАН 22	43	13,55 ± 0,32	9,3 ± 0,24	1,18
Ленора, A <sub>0</sub>	15	12,71 ± 0,39	6,8 ± 0,36	1,29
Ленора A <sub>1</sub> ,	15	14,73 ± 0,40	6,9 ± 0,40	1,50

Примечание: \* от каждого растения (с каждого препарата) в исследование брали по 50 клеток.

Соотношение этих параметров ( $D = \ln M : \ln Pt$ ) характеризуют цитогенетический фрактал данной ткани и свидетельствует о стабильности или относительной нестабильности клеточной популяции у изученных растений. В исследуемом материале значение D варьировало от 1,1 до 1,5. С самым низким показателем оказалась инбредная линия СОАН 22, что свидетельствует о нестабильности у нее клеточных популяций. В гибридных материалах (поколения A<sub>0</sub> и A<sub>1</sub>) показатель существенно выше (табл.), что свидетельствует о стабильности этих популяций. Геометрическая пропорция двух величин (D) связывает признаки двух уровней: тканевого (число хлоропластов) и индивидуального (диапазон варьирования), представляя собой новый признак, присущий эпидермальной ткани листа (растения) как целому.

### Выводы

1. Эпигеномная и эпипластомная вариабельность, оцениваемая через геометрические пропорции (D), характеризует общее физиологическое состояние клеточных популяций растений в ходе онтогенеза: диплоидные гетерозисные мс-гибриды имеют высокие значения эпигеномной стабильности D; инбредные линии депрессированы, что приводит к низким значениям этого показателя.  
2. Число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у потомства может зависеть от способа размножения и особенностей родительских форм, но «паттерно» изменчивости как при гибридизации, так и при однородительском размножении соответствует только материнским формам.

*Работа проведена при поддержке интеграционного гранта президиумов СО РАН и НАН Беларуси № 3.*

### Литература

1. Павлинов И.Я. Морфологическое разнообразие: общие представления и основные характеристики // Сборник трудов Зоологического музея МГУ, – 2008. – 49. – С. 343–388.
2. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. – М: Институт компьютерных исследований, 2010. – 656 с.
3. Малецкий С.И. Классификация признаков растений // Эпигенетика растений: сб. науч. тр. – Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2005. – С. 35–38.
4. Филипченко Ю.А. Индивидуальная изменчивость // Изменчивость и методы ее изучения. Основы биологической вариационной статистики. – Ленинград, 1926. – С. 5–32.
5. Уфимцев Р. Хвост ящерицы. Метафизика метафоры // Калининград: «Оттокар», 2010. – 293 с.
6. D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerantes // CRC Crit. Rev. Plant Sci. – 1985. – 3, N 1. – P. 73–112.
7. Sesek P., Kump B., Bohanes B. Interphase structure of endoreduplicated nuclei in diploid and tetraploid *Brassica oleraceae* L. // Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica. – 2005. – 47/1. – P. 93–99.
8. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка, – 1994. – 10, № 6. – С. 5–35.
9. Nemes B. Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. – Berlin: Gebrüder Bornträger, 1910. – P. 532.
10. Лусс А.И. Вегетативные мутации. В кн: Теоретические основы селекции растений. – М,Л: «Сельхозгиз», 1935. – 1. – С. 215–292
11. Харченко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы. В кн.: Свекловодство. – Киев: «Госсельхозиздат», 1940. – 2. – С. 453–550.
12. Wulff H.D. Die polysomatie der Chenopodiaceen // Planta. – 1936. – 26, N 2. – P. 275–290.
13. Кунах В.А., Адонин В.И., Ожередов, Блюм Я.Б. Миксоплоидия у диких и культивируемых видов крестоцветных, способных к гибридизации с рапсом *Brassica Napus*. // Цитология и генетика. – 2008. – 42. – С. 81–86.

14. Малецкая Е.И., Юданова С.С. Цитологический анализ миксоплоидии клеточных популяций в апозиготических потомствах гаплоидных растений сахарной свеклы. // Сб. науч. тр.: Факторы экспериментальной эволюции организмов. – Киев: Логос, 2013. – 13. – С. 210–214.
15. Sheid O.M., Jakovleva L., Afsar K., Maluszynska J. Paszkowski J. A change of ploidy can modify epigenetic silencing // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1996. – 93 – P. 7114–7119.
16. Maletskaya E.I., Maletskaya S.S. The nuclear DNA mass variability in embryo root cells of sugarbeet // Sugar Tech. – 1999. – 1, N 1/2. – P. 30–36.
17. Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic // Sex Plant Reprod. – 2007. – 20. – P. 99–107.
18. Savitsky N.I. Effectiveness of selection for tetraploids plants in C<sub>0</sub> generation on the basis of the number of chloroplasts in stomata // Amer. Soc. of Sugar Beet Technologists. – 1966. – 13, N 8. – P. 655–661.
19. Раджабли Е.П., Рудь В.Д. Получение и использование полиплоидных форм растений. – Новосибирск: «Наука», 1972. – 132 с.
20. Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. – 2002. – 38, № 1. – С. 72–78.
21. Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – 17, №1. – С. 72–80.
22. Малецкий С.И., Левитес Е.В., Малецкая Е.И., Шаворская О.А. Автосегрегация в партеногенетических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) Докл. РАН. – 1997. – 354, № 5. – С. 705–706.
23. Левитес Е.В., Шкутник Т., Овечкина О.Н., Малецкий С.И. Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Докл. РАН. – 1998. – 362, № 3. – P. 430–443.
24. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets // J. Agric. Res. – 1945. – 71, N 10. – P. 423–440.
25. Сороко Э.М. Структурная гармония систем. – Минск: Наука и техника, 1984. – 284 с.

#### **YUDANOVA S.S.**

*Institute of Cytology of Genetics Siberian Branch of Russian academy of Science,  
Russia, 630090, Novosibirsk, Lavretea, 10, e-mail: sonia\_y@ngs.ru*

#### **A VARIABILITY OF CELL POPULATION IN SUGAR BEET BY DIFFERENT MODE OF SEED REPRODUCTION**

A **goal** of the presented paper was to analyze the variability of cell populations in different by origin and breeding methods materials. **Methods.** The following parameters of stomata guard cell populations were evaluated: average mean of chloroplasts number and plastotype, variance of the distribution, the integral index D (lnM / lnPt), characterizing cytogenetic tissue fractal and stability of the cell population. Evaluation of significance was carried out Student's T-test. **Results.** It was shown that regardless of the method of the reproduction (hybridization or uniparental reproduction) maintains 'pattern' variability corresponding mother plants. **Conclusions.** Geometric proportion (D), linking the characters of tissue and individual levels indicates instability of cell populations in inbred plants. Besides, both hybridization and uniparental reproduction cell populations were quite stable.

**Key words:** variability, fractal characters, sugar beet, mode of seed reproduction.