

3. *Savidan Y.H.* Transfer of apomixis through wide crosses // *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering.* - Mexico: CIMMYT, IRS, Eur. Comm., 2001. - P. 153-167.
4. *Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г.* Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1978. - 224 с.
5. *Шишкинская Н.А., Юдакова О.И.* Репродуктивная биология дикорастущих злаков // *Известия Саратов. ун-та. Сер. Биол.* - Саратов, 2001. - С. 166 – 176.
6. *Кашин А.С., Юдакова О.И., Кочанова И.С., Полянская М.В., Миндубаева А.Х.* Распространение гаметофитного апомиксиса в семействах Asteraceae и Poaceae (на примере видов флоры Саратовской области) // *Ботан. журн.* - 2009. - Т. 94, № 5. - С. 120-132.
7. *Carman J.G.* Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives // *Apomixis Newsletter.* - 1995. - № 8. - P. 39-53.
8. *Carman J.G.* Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony // *Biol. J. Linn. Soc.* - 1997. - Vol. 61. - P. 51-94.
9. *Куприянов П.Г.* Способ приготовления препаратов зародышевых мешков. А.с. № 919636 // *Бюл. изобр.* - 1982. - № 7. - С. 14.
10. *Herr J.M.* A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms // *Amer. J. Bot.* - 1971. - Vol. 58. - P. 785-790.
11. *Куприянов П.Г.* Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1989. - 160 с.

Резюме

При исследовании 33 сорто- и видообразцов рода *Festuca* L. (*F. rubra*, *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. polesica*, *F. valesiaca*, *F. rupicola*, *F. regeliana* и *F. altissima*) показано, что наибольшую склонность к гаметофитному апомиксису проявляют растения видов *F. pratensis*, *F. valesiaca*, *F. altissima*. Для *F. regeliana*, *F. polesica*, *F. rupicola*, *F. altissima* способность к гаметофитному апомиксису отмечена впервые.

Peculiarities of 33 variety and species accessions of the genus *Festuca* L. (*F. rubra*, *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. polesica*, *F. valesiaca*, *F. rupicola*, *F. regeliana* и *F. altissima*). It has been shown that the largest inclination to gametophytic apomixis manifest the plants of the species *F. pratensis*, *F. valesiaca*, *F. altissima*. For such species as *F. regeliana*, *F. polesica*, *F. rupicola*, *F. altissima* ability for gametophytic apomixis has been revealed for the first time.

При дослідженні 33-х сортових та видових зразків роду *Festuca* L. (*F. rubra*, *F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. polesica*, *F. valesiaca*, *F. rupicola*, *F. regeliana* и *F. altissima*) було встановлено, що найбільшу схильність до гаметофітного апоміксису виявляють рослини видів *F. pratensis*, *F. valesiaca*, *F. altissima*. Для *F. regeliana*, *F. polesica*, *F. rupicola*, *F. altissima* схильність до гаметофітного апоміксису було виявлено вперше.

КРАВЕЦ Е.А., ЗЕЛЕНАЯ Л.Б., ЗАБАРА Е.П., НЕЧИСТИК В.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ,
Украина, 03680, Киев, ГСП-22, ул. акад. Заболотного, 148, e-mail: elkrav@online.ua*

ФОРМИРОВАНИЕ ПЕРЕКРЕСТНОЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К УЛЬТРАФИОЛЕТУ ПУТЕМ ЗАКАЛИВАНИЯ СЕМЯН

Закаливание растений определяется как приобретение неспецифичной стойкости к неблагоприятным факторам среды. Одним из способов повышения устойчивости к

ультрафиолету является предпосевное закаливание семян путем повышения засухо- или жароустойчивости (Генкель, 1967). Для растений, выращенных из закаленных семян, характерны морфо-физиологические признаки ксероморфности, коррелирующие с их большей засухоустойчивостью и стойкостью к ультрафиолету. Полагают, что в процессе адаптации к засухе у растений модифицируется эпигенетическая программа развития. При этом, реорганизация генома, повышение нормы его изменчивости могут составлять главный механизм адаптации растений к стрессу (Кунах, 2005; и др.) Планировалось, что через выбор соответствующего способа закаливания можно внести изменения в эпигенетическую программу, обнаружить эти изменения на морфологическом, физиологическом и молекулярно-генетическом уровнях и определить корреляцию между изменениями и приобретенной стойкостью.

Материал и методы

Объект исследования – ячмень двухрядный (*Hordeum distihum* L., $2n=14$), сорта Ксанату и Джерджей. Испробовано несколько способов закаливания семян с целью индуцирования перекрестной адаптации к УФ: замачивание-подсушивание, прогревание семян, облучение УФ-В и УФ-С проростков. Последующее тестирование проростков на адаптированность проводили облучением УФ-С. После закаливания и тестирования проростки высаживали в открытый грунт, где оценивали их выживаемость, темпы развития, отбирали пробы для анатомических исследований, ПЦР-анализа, определяли уровень стерильности пыльцы. Устойчивость статолитного крахмала корневого чехлика определяли на проростках зерновок следующего поколения.

Ядерную ДНК из листьев и пыльников выделяли согласно методике, предложенной в работе (Doyle and Doyle, 1990). Состав реакционной смеси и условия проведения ПЦР соответствовали приведенным в работе (Tsumura et al., 1996). Всего в работе было использовано 7 праймеров к микросателлитным последовательностям.

Для проведения ПЦР-ПДРФ продукты амплификации подвергали обработке рестрикционными ферментами *HpaII* и *MspI*. Продукты амплификации идентифицировали в 1,7% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ свете. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы “PopGen32” (Yeh and Boyle, 1997).

Результаты исследования и их обсуждение

По комплексу физиологических и морфологических признаков адаптивный ответ у обоих сортов формировался в двух вариантах обработки - при УФ-В облучении (более четкий) и после термообработки семян. Так, показано повышение устойчивости к ультрафиолету по параметрам прироста фитомассы проростков и по выживаемости растений в условиях открытого грунта. Обработка кофеином снимала эффект адаптации, очевидно, за счет блокирования репарации ДНК.

По физиологическим параметрам оба сорта характеризовались как средне-слабоустойчивые к засухе. Комплекс статолитного крахмала в корешках проростков обоих сортов оказывался более устойчивым к УФ-облучению после предоблучения и прогревания, а у с. Джерджей – и после замачивания-просушивания семян.

По совокупности анатомических характеристик листа у обработанных ультрафиолетом растений увеличивались размеры эпидермальных клеток, клетки эпидермы и паренхимы уплотнялись, размеры устьичных камер сокращались (Рис. 1). С увеличением дозы ультрафиолета (вар. УФ-В+УФ-С) возрастало число и уменьшались размеры устьиц, расположение их становилось менее упорядоченным (рис. 2).

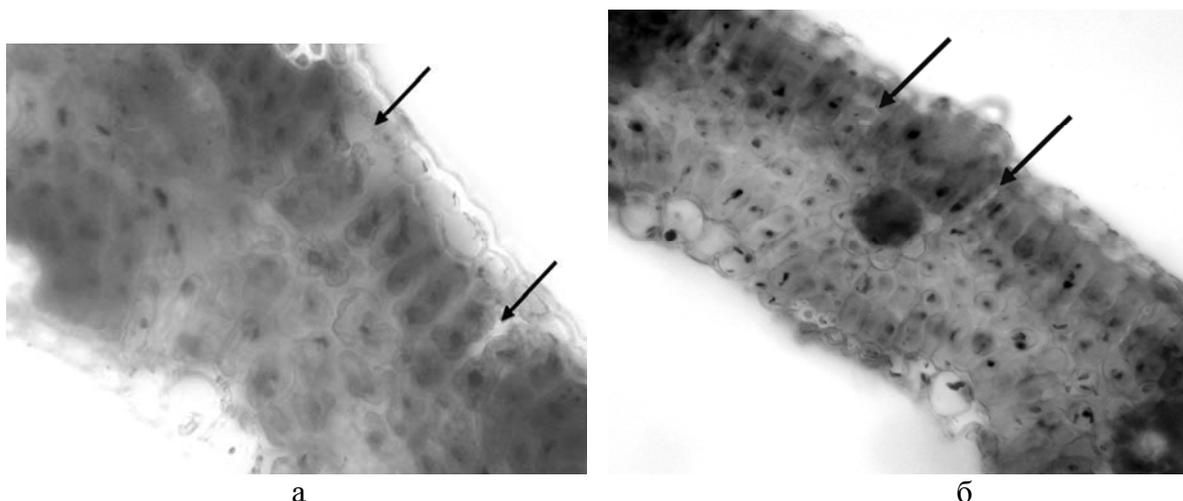


Рис.1. Сорт Ксанату. а. Контроль (Стрелками указаны подустичные камеры); б. Вариант УФ-Б – облучения (Стрелками указано сужение подустичных камер).

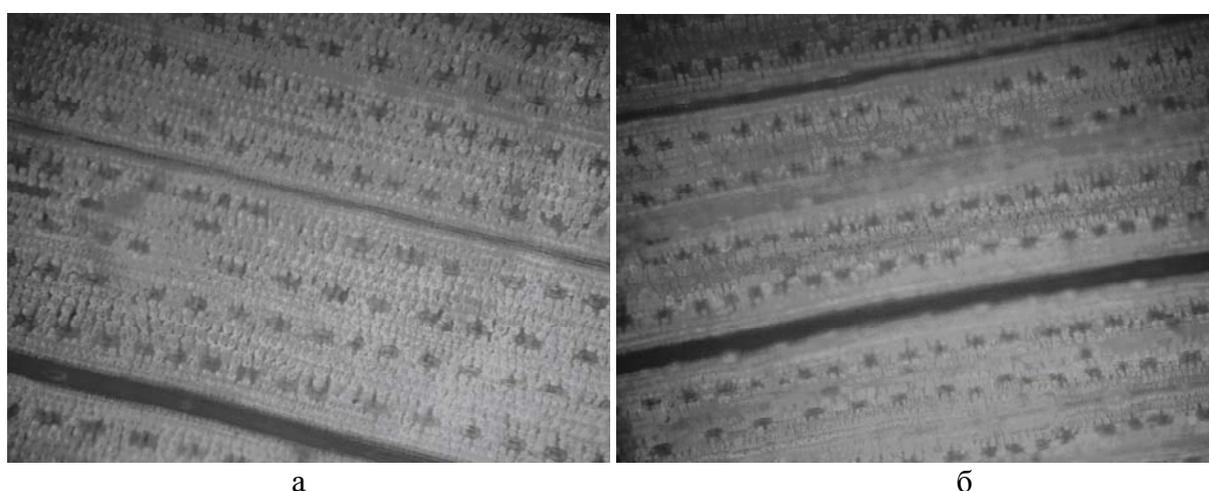


Рис.2 а. Сорт Ксанату. Топография устьиц на эпидермисе с адаксиальной стороны листа. а. Контроль; б. Варьирование размеров и плотности размещения устьиц на эпидермисе листа в варианте УФ-Б+УФ-С.

Стерильность пыльцы у сорта Ксанату в большинстве вариантов обработки семян незначительно превышала контрольные значения. Возрастание стерильности вдвое (от 3,5 до 7%) отмечено лишь в варианте с прогреванием. У сорта Джерджей стерильность пыльцы во всех вариантах возросла более существенно - вдвое, а после прогревания - втрое. УФ-С-облучение, вероятно, обнаруживало скрытые, сформированные при прогревании, повреждения в меристеме зародыша.

Одним из механизмов адаптации растений может быть реорганизация генома. С целью исследования возможных перестроек генома ячменя под влиянием УФ-облучения и термообработки семян в работе был осуществлен анализ изменчивости с помощью ДНК-маркеров к микросателлитным повторам (ISSR-PCR).

Анализ продуктов ПЦР, полученных при амплификации с 7 праймерами к микросателлитным последовательностям, показал, что общий спектр насчитывал 24 фрагмента для образцов ДНК, выделенной из вегетативной массы (листья), и 29 – выделенной из пыльников. Количество ампликонов варьировало от 2 до 9, а их размер от 200 до 1500 п.н. в зависимости от праймера.

Анализ продуктов амплификации с ДНК, выделенной из листьев. Из 7 проанализированных праймеров только с использованием 2 были получены полиморфные фрагменты. Процент полиморфизма составил для первого праймера в общем 86%, внутри каждой группы образцов этот показатель был равен значению

контрольных растений – 43%, в группе растений, подвергшихся УФ-В облучению и УФ-В+УФ-С - 57%, а для растений, семена которых прогревали, полиморфных полос выявлено не было (рис. 3 а). Сравнительный анализ фрагментов ПЦР со вторым праймером показал, что уровень полиморфизма был равен 20%, а продукт, размером 1000 п.н., отсутствовал только в спектре образцов растений, семена которых прогревали.

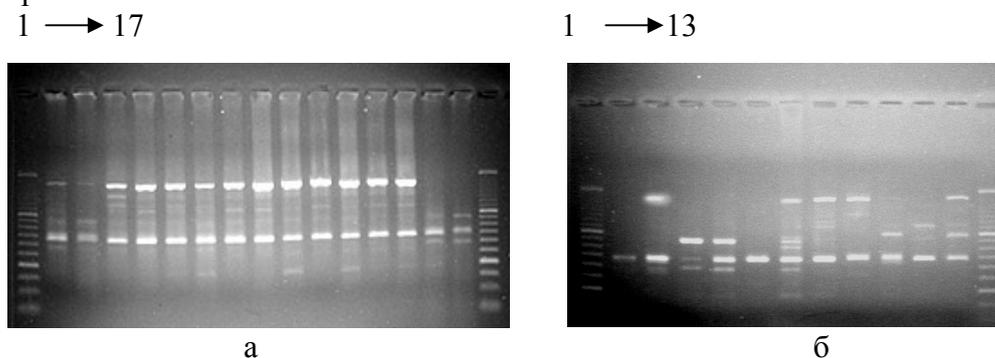


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймером 5'-GGA GAG GAG AGG AGA-3' и ДНК, выделенной из листьев (а) и пыльцы (б). А: 1, 17 – маркер молекулярных мас Gene Ruler 50 bp DNA ladder; 2 – 6 – контроль; 7 – 10 – УФ-В; 11 – 14 – УФ-В+УФ-С; 15, 16 – прогревание семян. Б: 1, 13 – маркер молекулярных мас Gene Ruler 50 bp DNA ladder; 2 – 6 – контроль; 7 – 10 – УФ-В; 11, 12 – УФ-В+УФ-С.

Поскольку 5 из 7 праймеров оказались мономорфными, был проведен ПЦР-ПДРФ анализ. С этой целью продукты амплификации были обработаны рестрикционными ферментами *HpaII* и *MspI*, что позволило обнаружить отличия в наборе фрагментов рестрикции между образцами. Так, в результате обработки продуктов амплификации с праймером 5'-(GA)₈C-3' рестриктазами были получены два спектра фрагментов, один из которых характеризовал ДНК, контрольных и подвергшихся УФ-В облучению растений, а второй - УФ-В+УФ-С и тепловой обработке. Следует отметить, что отличий между спектрами, полученными при расщеплении *HpaII* и *MspI*, не выявлено, что предполагает отсутствие отличий в уровне метилирования между проанализированными образцами.

Анализ продуктов амплификации с ДНК, выделенной из пыльцы. При использовании 2 из 7 праймеров к микросателлитным последовательностям были обнаружены отличия в спектрах продуктов ПЦР между разными образцами. Процент полиморфных фрагментов составил 86% при амплификации с праймером 5'-GGA GAG GAG AGG AGA-3' и 33% - с праймером 5'-(GA)₈TC-3'. В пределах каждой группы величина этого показателя была равной для контрольных образцов – 83% и 50%, для растений подвергнутых УФ-В – 86% и 44%, для растений УФ-В+УФ-С – 75% и 25% при использовании первого и второго праймера, соответственно (рис. 3 б). В результате проведенного ПЦР-ПДРФ анализа отличий между образцами не обнаружено.

Изменение уровня полиморфизма в группах растений, подвергшихся УФ-облучению, указывает на вероятное участие микросателлитной ДНК в механизмах адаптации ячменя к стрессовым факторам. При этом, возрастание уровня полиморфизма отмечено для ДНК, выделенной из вегетативных частей растений, а уменьшение величины этого показателя - для ДНК, выделенной из репродуктивных органов. В варианте с термообработкой семян формирование перекрестной устойчивости к ультрафиолету может быть обусловлено иными механизмами, в частности повышением нестабильности генома, связанным с формированием потенциально летальных повреждений ДНК, которые реализуются при тест-облучении.

На основании полученных результатов ПЦР-анализа были построены дендрограммы, согласно которым проанализированные образцы формируют две

группы: 1) прогревание семян; 2) контроль, УФ-В, УФ-В+УФ-С (рис. 4). Объединение в один кластер контрольных растений и растений, облученных в ультрафиолете (УФ-В+УФ-С) может свидетельствовать о приобретенной устойчивости растений, обусловленной предварительным облучением УФ-В.

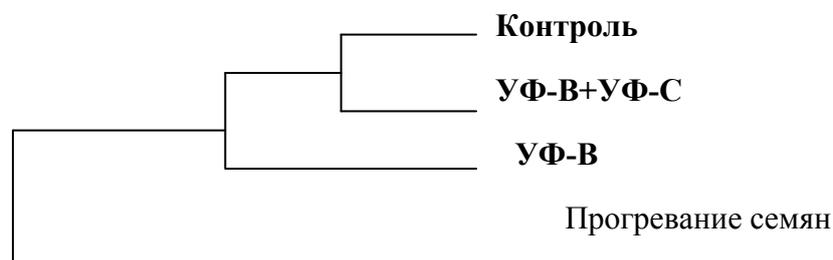


Рис. 4. Кластеризация групп растений ячменя, рассчитанная на основании результатов ПЦР-анализа.

Выводы

1. Опробованы разные способы закалки семян двух сортов ячменя с целью индуцирования перекрестной адаптации к ультрафиолету. По комплексу физиологических и морфологических признаков адаптивный ответ у обоих сортов формировался в двух вариантах обработки - при УФ-В облучения и после прогревания семян.
2. Результаты ПЦР с ISSR-маркерами указывают на изменение уровня полиморфизма ДНК в группах растений, подвергшихся УФ-облучению и вероятное участие микросателлитной ДНК в адаптации ячменя к стрессовым факторам и формировании адаптации. Возрастание уровня полиморфизма отмечено для ДНК, выделенной из листьев, а уменьшение - для ДНК, выделенной из пыльников.
3. Дендрограммы, построенные по результатам ПЦР-анализа, указывают на формирование двух групп: одной - с термообработкой семян и второй, охватывающей контроль и варианты УФ-В, УФ-В+УФ-С. Объединение последних в один кластер может свидетельствовать о приобретенной устойчивости растений, обусловленной предварительным облучением УФ-В.

Литература

1. Генкель П. А. Физиология устойчивости растительных организмов. В кн. Физиология сельскохозяйственных растений. – М.:Наука. -1967. т. 3.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. –Київ: Логос.- 2005.-723с.
3. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // BRL Focus.-1990.-Vol. 12.-P. 13-15.
4. Tsumura Y., Ohba K., Strauss S.H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) // TAG.-1996.-Vol.92.-P.40-45.
5. Yeh F.C., Boyle T.J.B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits // Belg.J.Bot.-1997.-Vol.129.-P.157.

Резюме

По комплексу физиологических и морфологических признаков адаптивный ответ у исследованных сортов ячменя формировался при предоблучении ультрафиолетом и после термообработки семян. Результаты ПЦР с ISSR-маркерами указывают на вероятное участие микросателлитной ДНК в формировании адаптации ячменя к стрессовым факторам.

За комплексом фізіологічних та морфологічних ознак адаптивна відповідь у досліджених сортів ячменя формувалась за умов опромінення ультрафіолетом і після термообробки насіння. Результати ПЦР з ISSR-маркерами вказують на вірогідну участь мікросателітної ДНК у формуванні адаптації ячменя до стресових чинників.

The adaptive response of barley varieties are formed in conditions of effected of UV-B –irradiation and high temperature by the set of physiological and morphological figures. Results PCR with ISSR-markers pointed on participation of microsatellite DNA in adaptation of barley varieties to stresses.

ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН

Россия, 630090, Новосибирск, пр-кт Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

МНОГОМЕРНОСТЬ КОДИРОВАНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНФОРМАЦИИ КАК ФАКТОР ИЗМЕНЧИВОСТИ В ПОЛОВЫХ ПОТОМСТВАХ РАСТЕНИЙ

Обнаружение у сахарной свеклы полиморфизма и специфических соотношений фенотипических классов в агамоспермных потомствах, которые согласно существующим представлениям должны быть мономорфны, позволило выдвинуть гипотезу о многомерности кодирования наследственной информации у растений. В предложенной гипотетической модели кодирование наследственной информации, записанное последовательностью нуклеотидов, рассматривается как кодирование в первом измерении (1D), а кодирование путем дифференциальной эндоредупликации отдельных районов хромосом - как кодирование во втором измерении (2D) [1, 2]. В основу модели положено следующее.

1. Известные факты неравной степени эндоредупликации различных районов одной и той же хромосомы и отсутствие тесного сцепления эндоредуплицированных участков хроматид у растений [3, 4].

2. Предположение о наличии комбинаторного процесса, заключающегося в попарной комбинации гомологичных участков хроматид, принадлежащих гомологичным хромосомам [1, 2].

3. Предположение о контакте с ядерной мембраной или ядерным матриксом сформировавшейся пары участков гомологичных хроматид; благодаря этому контакту данная пара сохраняется при последующих делениях вступающей в эмбриогенез клетки (зиготы или апозиготы) и определяет генотип зародыша по содержащимся в данной паре генам [1, 2].

Утверждение об участии какого-либо механизма в генетическом кодировании требует доказательств того, что этот механизм функционирует при образовании гамет. Существуют прямые доказательства наличия эндоредупликации в женских гаметах у растений. Известно, что в ядре яйцеклетки у *Pinus sibirica* Du Taur содержание ДНК в 16 раз превышает таковое в обычной диплоидной клетке и составляет 32С [5], а у *Ornithogalum caudatum* и *Haemantus albiflos* содержание ДНК в яйцеклетке составляет, соответственно, 4С and 3-4С [6]. Было показано, что эндоредупликационный мейоз наблюдается в женских гаметах с частотой 80 % и значительно реже (3,9 %) в мужских гаметах *Allium tuberosum* [7].

Косвенным доказательством эндоредупликации хромосом в ядре яйцеклетки служит, например, высокое содержание ДНК в зиготах у ячменя, снижающееся постепенно в ходе первых делений зиготы и достигающее диплоидного уровня на более поздних стадиях эмбриогенеза [8]. На возможность эндоредупликации