

3. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологов рекомбинирующими ДНК. *Молекулярная биология*. 2007. Т.41. №3. с.467–477.

4. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N. et al. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*. 2000. V.404. P.37–41.

5. Li W.X., Chen C.B., Markmann-Mulisch U. et al. The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. V.101. P.10596–10601.

Резюме

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* экспрессируются в растениях томата и не оказывают негативного влияния на формирование пыльцы. Гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* стабильно наследуются через яйцеклетки. Гибриды F₁ томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* могут быть использованы в качестве моделей для изучения мейотической рекомбинации.

The data we obtained allow making the conclusion that gene constructions *recA* and *NLS-recA-licBM3* are expressing in tomato plant and there are no negative effects on pollen fertility. Genes *recA* and *NLS-recA-licBM3* are inherited invariably through the egg cells. F₁ tomato plant with *recA* and *NLS-recA-licBM3* gene expression may be used in meiotic recombination researches.

МАЛЕЦКАЯ Е.И., ЮДАНОВА С.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН; пр. Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск, Россия; e_mal@bionet.nsc.ru

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЁКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) ПРИ АПОЗИГОТИЧЕСКОМ СПОСОБЕ РАЗМНОЖЕНИЯ

Для решения различных цитогенетических и селекционных задач на гаплоидию возлагают большие надежды: создание нового генетического материала, новых инбредных линий. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) — перекрестноопыляющееся растение, у которого самооплодотворение присуще лишь немногим растениям в популяциях, так как предотвращается системой генов самонесовместимости. Как показывают наблюдения многих авторов, самонесовместимые формы растений нередко склонны к гамоспермному способу семенной репродукции [1–3]. Учитывая это, можно заключить, что система репродукции семян у сахарной свеклы включает разные варианты репродукции семян: перекрестное оплодотворение, самооплодотворение и гамоспермию.

В процессе формирования семян при перекрестном оплодотворении участвуют оба родителя: материнский и отцовский. Поэтому получение семян путем перекрестного оплодотворения называют “двуродительским” или гамоспермным способом семенной репродукции. В отличие от гамосперм-

ного, агамоспермный способ репродукции семян называют “однородительским”. Возможны различные варианты агамоспермного семянез: а) соматическая апозигота возникает из клеток нуцеллуса или интегументов (митотическая агамоспермия); б) гаметическая апозигота возникает из клеток зародышевого мешка.

Нами показано, что большая часть семян при апозиготической репродукции свеклы имеет диплоидное число хромосом и в семенном потомстве наблюдается расщепление по маркерным признакам [4–5]. Из этого следует, что дигаплоидные семена возникают из клеток зародышевого мешка, которые формируются из мегаспор, прошедших мейотические деления. Гаметы с диплоидным (нередуцированным) числом хромосом возникают спонтанно у многих видов растений, и это явление обозначается как эпигеномная изменчивость клеток [6–8]. Понятию “эпигеномная изменчивость” предшествовала понятие “миксоплоидность клеточных популяций”, под которой понимают наличие в клеточных популяциях доминирующей фракции клеток с диплоидным числом хромосом и фракций, у которых число хромосом в ядрах меньше или больше их основного числа [9]. По нашим наблюдениям у растений, склонных к однородительскому способу размножения, повышен уровень миксоплоидности клеток (эпигеномная изменчивость), что делает возможным попадание полиплоидных клеток в зародышевые пути клеток и формирование дигаплоидных зародышей.

Цель настоящей работы — проанализировать семенную продуктивность у гаплоидных растений сахарной свеклы, репродуцирующих семена апозиготическим способом.

Материал и методы

В качестве материала для исследования использовали пыльцестерильные растения однострочковых линий сахарной свеклы селекции лаборатории популяционной генетики растений Института цитологии и генетики СО РАН (мс704х741; мсСОАН-5; мсР17), которые репродуцировали апозиготическим способом. От каждого потомства были взяты выборки не менее 400 плодов. Плоды промывали в проточной воде и помещали в термостат при 28 °С. После прорастания проводили отбор гаплоидных проростков по двум морфобиологическим признакам: длине и диаметру проростков [10, 11]. Гаплоидные проростки на 3-и сутки были в четыре раза короче и имели вдвое меньший диаметр, чем дигаплоидные проростки. В последующем проводили изучение клеточных популяций гаплоидных растений по числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

Хромосомный анализ показал, что в точках роста молодых листочков у гаплоидных растений наряду с гаплоидными клетками есть немало клеток с диплоидным набором хромосом. Анализ микроспорогенеза также свидетельствует о том, что гаплоидным растениям также присуща миксоплоидность клеток — полиморфизм микроспор. На препаратах, приготовленных из пыльников гаплоидных растений, присутствуют монады, диады, триады и тетрады микроспор. Однако, большая часть микроспор в пыльниках гаплоидных растений представлена монадами [12].

Результаты эксперимента

После прохождения стадии яровизации гаплоидные корни были высажены на изолированном участке для оценки их способности к семенной репродукции в беспыльцевом режиме (таблица). Полученные от гаплоидных растений семена оценивали на всхожесть, и обнаружили, что уровень всхожести варьировал от 75% до 92,6%. Это достаточно высокий уровень всхожести, если принять во внимание, что гаплоидные семена получены апозиготическим путем. Значения показателя всхожести семян от гаплоидных растений ничем не отличается от уровня всхожести дигаплоидных семян.

При беспыльцевом способе семенной репродукции у гаплоидных растений наблюдается большой разброс по массе плодов: минимальная масса плодов на одно растение составила 2,8 г, максимальная — 262,5 г. Отметим, что плоды обычно мелкие и масса 1000 штук у некоторых растений составила 7 г, а максимальная 18 г. Средняя масса плодов на одно растение у гаплоидов первого поколения репродукции несколько ниже, чем этот же показатель в последующем поколении (90,5–93,4 г; 50,0–144,2 г). У дигаплоидных растений средняя масса плодов на растение всегда выше, чем у гаплоидов.

В таблице буква “Г” обозначает первое апозиготическое поколение, а “ГГ” — второе апозиготическое поколение. Из первого гаплоидного апозиготического поколения были повторно отобраны гаплоидные проростки по морфобиологическим признакам, из них выращены корни, и по прохождении стадии яровизации высажены в грунт. От этих растений получено второе гаплоидное апозиготическое потомство (“ГГ”). У линии мсР17 второго поколения не получали, но два корня этой линии были оставлены для репродукции семян на третий год жизни. Масса полученных плодов от растений третьего года жизни превысила в три раза массу плодов, полученных от растений второго года жизни (38,6 и 111,9). У линии мс СОАН — 5 и гибрида мс 704х741 часть семян второго апозиготического поколения “ГГ” была

Таблица

Средняя масса плодов у гаплоидных и дигаплоидных растений первого и второго поколений репродукции, полученных апозиготическим способом

Линия, гибрид	Поколение	Гаплоиды		Дигаплоиды	
		число раст.	масса плодов на растение, г	число раст.	масса плодов на растение, г
мс704 х 741	"Г"	14	90,5	26	101,8
мс704 х 741	"ГГ"	16	93,4	–	–
мс704 х 741	"ГГ"	40	118,5	–	–
мсСОАН-5	"Г"	13	50,0	30	78,9
мсСОАН-5	"ГГ"	34	144,2	–	–
мсР17	"Г"	2	38,6	19	59,8
мсР17	"Г" 3-ий год	2	111,9	–	–

получена без отбора по морфобиологическим признакам, поэтому в эту партию могли попасть и дигаплоидные плоды, полученные апозиготическим путем из первого поколения (“Г”).

Результаты и обсуждение

При миксоплоидии в меристеме клеточных популяций наряду с доминирующей фракцией клеток с основным числом хромосом встречаются клетки, у которых число хромосом в ядрах больше или меньше их основного. При таком сосуществовании разноплоидных клеток в меристемах позволяет растениям формировать апозиготическим путем как гаплоидное, так и дигаплоидное потомство. В ходе развития растений часто наблюдается эмбриональная гибель отдельных цветков и плодов на растении. Это говорит о том, что при эмбриогенезе происходит гибель гаплоидных эмбрионов из-за конкуренции с дигаплоидными, гибель может также обусловлена гемизиготностью по летальным генам.

Кроме обычного митотического деления клеток в семязпочках на 3–5-й день после начала цветения, возможен и другой более быстрый способ их размножения — почкование ядрышек, описанный Н.Э. Зайковской. “Деление начинается почкованием ядрышек, ... которые затем полностью отделяются и отходят к периферии ядра. Вокруг новообразовавшихся ядрышек обособляются участки ядра, что ведет к возникновению новых маленьких ядер внутри старого... Второе небольшое, молодое ядро, отделившееся раньше, лежит в центре клетки, и в цитоплазме около него закладывается клеточная перегородка. Процесс немитотического деления носит массовый характер и различные его фазы видны почти во всех ядрах ткани нуцеллуса” [13]. Если эти наблюдения верны, то это свидетельствуют о том, что гаплоидные семена можно получать не только с помощью нетрадиционных способов репродукции: опыление цветков свеклы пылью дикорастущих видов; нанесение на рыльце цветков инактивированной пылицы после ее обработки радиацией; обработка растений эпимутагенами и т.д.

При беспыльцевом режиме большая часть формирующихся семян дигаплоиды, а меньшая часть — гаплоиды. Очевидно, что партеногенетическое развитие свойственно как гаплоидным, так и диплоидным (полиплоидным) клеткам зародышевых мешков. При относительно значительном уровне миксоплоидности клеточных популяций возрастает вероятность попадания полиплоидных клеток в зародышевый путь. И если тетраплоидная клетка попала в зародышевый путь (материнская клетка мегаспор), то после редукционного деления сформированная яйцеклетка будет иметь диплоидное число хромосом.

Известно, что свойство завязывать семена при апозиготической репродукции сохраняется в ряду поколений [14]. Эту же тенденцию мы наблюдаем и при беспыльцевом размножении у гаплоидов первого и второго поколения. Сравнивая завязываемость семян у гаплоидных растений в разных вариантах, можно сказать, что в последующем поколении апозиготической репродукции это свойство сохраняется, а масса плодов в среднем на растение возрастает.

Благодарности. Настоящая работа выполнена при поддержке Интеграционного гранта СО РАН №99 и гранта РФФИ 10-04-00697.

Литература

1. *Фаворский Н.В.* Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Тр. Научного института селекции, выпуск 2.— Киев.— 1928.— С. 1–14.
2. *Сеилова Л.Б., Абдурахманов А.А., Хайленко Н.А.* Эмбриология индуцированного апомиксиса у сахарной свеклы // Цитология и генетика.— 1984.— Т.18.— С. 90–92.
3. *Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Кулик А.Г., Червякова В.В.* Апомиксис у самоопыленных линий сахарной свеклы и использование его в селекции // Цитология и генетика.— 1989.— Т.11.— С. 32–48.
4. *Малецкий С.И., Малецкая Е.И.* Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика.— 1996.— Т.32, №12.— С. 1643–1650.
5. *Левитес Е.В., Овечкина О.Н., Малецкий С.И.* Авто- и эписегрегация по признакам окраски в агамоспермных потомствах сахарной свеклы // Генетика.— 1999.— Т.35, №7.
6. *Малецкий С.И., Колодяжная Я.С.* Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и ее влияние на репродуктивные признаки у покрытосеменных растений // Успехи соврем. Генетики.— 1999.— Vol.119, №2.— С. 128–143.
7. *Frenkel R.* Uber das Auftreten von unreduzieren Gameten bei Angiospermen // Arch. Zucht. Forsch.— 1975.— Vol.5.— P. 201–208.
8. *Harlan J.R., de Wet J.M.J.* The origins of polyploidy // Bot. Rev.— 1975.— Vol.41.— P. 361–390.
9. *Юданова С.С.* Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками. Диссерт. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Санкт-Петербург, Всероссийский НИИ растениеводства.— 2004.— 126 с.
10. *Карпеченко Г.Д.* Экспериментальная полиплоидия и гаплоидия // Теоретические основы селекции растений. М., Л.: “Сельхозгиз”.— 1935.— Т.1.— С. 397–432.
11. *Тырнов В.С.* Гаплоидия у растений. Научное и прикладное значение. М.: Наука.— 1998.— 54 с.
12. *Малецкая Е.И.* Получение гаплоидных растений у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сборник научных трудов X генетико-селекционной школы, посвященной 120-летию Н.И. Вавилова: Реализация идей Н.И. Вавилова на современном этапе развития генетики, селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур.— 2007.— Новосибирск, ВАСХНИИЛ.— С. 205–211.
13. *Зайковская Н.Э.* Немитотическое деление // Биология и селекция сахарной свеклы.— 1968.— С. 141–142.
14. *Юданова С.С., Малецкая Е.И.* Связь эпигеномной изменчивости с семенной продуктивностью при апозиготическом способе размножения сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сборник научных трудов: “Десятлення і проблеми генетики, селекції та біотехнології”.— Кивп: “Логос”.— 2007.— Т.2.— С. 121–125.

Резюме

В статье приведены результаты наблюдений за завязываемостью семян у гаплоидных растений при апозиготическом способе репродукции. Показано что семенная продуктивность гаплоидов ниже, чем у дигаплоидов. В следующем поколении репродукции масса семян у гаплоидов повышается.

This paper presents the results of seed setting study in haploid plants by uniparental mode of reproduction. It was shown that seed setting of haploid plant was lower then of dihaploids. The level of seed setting increases in the next generation.

МАНДРОВСЬКА Н.М., КРУГОВА О.Д., КОЦЬ С.Я.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна: 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: azot@ifrg.Kiev.ua

ГЕНЕТИЧНІ ОЗНАКИ І СИМБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ Tn5-МУТАНТА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICEAE M₁

Отримання високоефективних штамів бульбочкових бактерій із використанням сучасних генно-інженерних методів є важливим резервом підвищення інтенсивності біологічної азотфіксації. Сьогодні, завдяки розвитку у світі методів молекулярної генетики, з'явилася реальна можливість направлено конструювання високоефективних і конкурентоспроможних штамів ризобій [2, 6, 7, 10, 12]. Одним із таких методів є транспозоновий мутагенез [1, 5]. Метод зіграв значну роль в експериментальних дослідженнях механізмів симбіозу та вивчення генів бульбочкових бактерій, що відповідають за ці процеси. За його допомогою були виявлені основні гени, які визначають азотфіксувальну активність, вірулентність ризобій, та гени, пов'язані з формуванням симбіозу бульбочкових бактерій з рослинами [8]. Нині частіше всього використовують транспозон Tn5, що обумовлено високою частотою його інтеграції у геноми реципієнтних штамів мікроорганізмів, відсутністю специфічності до нуклеотидної послідовності ДНК при транспозиції Tn5 та низькою частотою утворення його ревертантів. Для введення транспозону Tn5 у реципієнтні штами застосовують широке коло транспозономісних плазмід-самовбивць, які можуть кон'югативно переноситись від спеціальних штамів *E. coli* до широкого кола грам-негативних бактерій. Ці плазміди не здатні до реплікації у реципієнтних штамів, а тому можуть зберігатися при поділі клітин хазяїна. Транспозон же за рахунок ферменту транспозази, яка транскрибується та транслюється хазяїнськими ферментними системами, може інтегрувати в його геном і стабільно підтримуватися в наступних поколіннях [13, 14].

Метою наших досліджень було вивчення генетичних ознак та симбіотичних властивостей у отриманого нами Tn5-мутанта *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* M₁.

Матеріали і методи

Мутант *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* M₁ отримано у відділі симбіотичної азотфіксації Інституту фізіології рослин і генетики НАН України методом транспозонового мутагенезу із активного штаму бульбочкових бактерій гороху 263б [9] із використанням вектора від *E. coli* S 17 pSUP2021: Tn5 [4]. Для визначення наявності транспозона Tn5 у мутантного штаму ризобій гороху був застосований метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [5, 13]. Симбіотичні властивості Tn5-мутанта M₁ вивчали у вегетаційних і польових дослідах.

Вегетаційні досліди проводили на річковому піску, використовуючи посудини об'ємом 5 кг. Контролем був варіант із обробкою насіння гороху сорту Дамір 2 штамом-реципієнтом 263б, а також абсолютний контроль —