

На правах рукописи

УДК 575.1:577.151:631.523:633.413

Кирикович Светлана Сергеевна

**Эпигенетическая изменчивость ферментных  
локусов у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при  
многофакторных воздействиях**

Генетика - 03.00.15

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**ТОМСК-2005**

Работа выполнена в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения  
РАН, г. Новосибирск.

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук Левитес Евгений Владимирович

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор Хавкин Эмиль Ефимович

доктор биологических наук Степанов Вадим Анатольевич

**Ведущая организация:** Новосибирский государственный аграрный  
университет, (г. Новосибирск)

Защита диссертации состоится “16” февраля 2005 г. в 10 ч. на заседании  
диссертационного совета Д 212.267.10 в конференц-зале НИИ биологии и  
биофизики Томского государственного университета (634050, г.Томск,  
пр.Ленина, 36.).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Томского  
государственного университета

Автореферат разослан “13” января 2005 года

Ученый секретарь диссертационного совета

Головацкая И.Ф.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы** В настоящее время все большее число исследований, проводимых как на животных, так и на растениях, посвящено изучению эпигенетической изменчивости. Изменения, возникающие в ходе развития организма под влиянием внешних условий, не связанные с изменением последовательности нуклеотидов и способные передаваться в ряду клеточных и половых поколений, называются эпигенетическими (Оленов, 1970; Чураев, 1975, 1997; Холлидей, 1989; Jablonka, Lamb, 1989, 1995; Landman, 1991; Голубовский, 1997, 2000; Гвоздев, 1999; Лавров, Мавродиев, 2003). Первые эксперименты, в которых обнаруживалась эпигенетическая изменчивость, первоначально рассматривались как досадное исключение, не соответствующее законам Менделя. Однако со временем число таких исключений становилось все больше, и в настоящее время стало ясно, что эпигенетические изменения затрагивают широкий круг биологических процессов. Понимание той огромной роли, которую эпигенетические изменения играют в развитии индивидуальных живых организмов, а также в эволюции конкретного вида и живого мира в целом, привело к бурному развитию эпигенетики.

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что эпигенетическая изменчивость у животных и растений при общей схожести процессов может происходить по-разному. В исследовании эпигенетической изменчивости растения играют особую роль. Специфической особенностью растений, отличающей их от животных, является их сильная зависимость от окружающей среды, способность растений изменять свой метаболизм в ответ на изменения среды. Поскольку у растений в отличие от животных нет обособленного зародышевого пути, и практически любая клетка может дать начало новому организму, то можно полагать, что вызванные внешними условиями изменения в жизнедеятельности клеток могут передаваться в следующее поколение, т.е. наследоваться. Однако работ, в которых на простых маркерных признаках демонстрируется наследование эпигенетических изменений, довольно мало. В настоящее время не представляется возможным привести развернутое описание молекулярных механизмов, обеспечивающих передачу эпигенетической информации при мейозе, поскольку эти механизмы просто не известны (Лавров, Мавродиев, 2003). Кроме того, сама возможность наследования приобретенных признаков до сих пор не признается многими исследователями. Все это делает работу в этой области исследований актуальной.

**Цель и задачи исследования** Целью данного исследования было изучение характера эпигенетической изменчивости у растений сахарной свеклы при многофакторных воздействиях (агамоспермия, обработка колхицином, размножение *in vitro*).

В связи с данной целью были поставлены следующие задачи.

1. Изучить полиморфизм в агамоспермных потомствах сахарной свеклы.
2. Провести генетический анализ изменений, выявляемых в агамоспермных потомствах.
3. Проанализировать семенное потомство, полученное агамоспермным путем от растений сахарной свеклы, обработанных и необработанных колхицином.
4. Изучить полиморфизм в линиях растений-регенерантов сахарной свеклы гиногенетического происхождения, культивируемых *in vitro* и *in vivo*.

**Научная новизна работы** В настоящей работе впервые проведен генетический анализ изменчивости в агамоспермных потомствах сахарной свеклы, выявляемой с помощью маркерных ферментов, и показано, что основная часть этой изменчивости может быть классифицирована как эпигенетическая, осуществляемая путем редетерминации. Впервые проведена оценка полиморфизма по маркерным ферментам в агамоспермном семенном потомстве, полученном от обработанных колхицином и контрольных растений сахарной свеклы, и сделан вывод о том, что основная часть исследованных потомств получена путем митотической агамоспермии. Впервые исследован полиморфизм ферментов в семенных потомствах линий удвоенных гаплоидов, прошедших размножение в культуре ткани, и в линиях растений-регенерантов сахарной свеклы, и показано, что переход растений с гаплоидного на более высокий уровень ploидности сопровождается эпигенетическими изменениями маркерных генов.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Полиморфизм по ферментным локусам, выявляемый в агамоспермных потомствах сахарной свеклы, обусловлен либо замолканием одного из аллелей, либо его редетерминацией. В основе этого полиморфизма лежат изменения в геноме, которые могут передаваться через гаметы в следующее поколение.
2. В растениях-регенерантах линий удвоенных гаплоидов сахарной свеклы, культивируемых *in vitro*, и в семенных потомствах таких линий, культивируемых *in vivo*, выявляется полиморфизм ферментных локусов, обусловленный переходом растений с гаплоидного уровня ploидности на диплоидный.

**Практическая значимость** В работе показано, что изоферменты являются удобными маркерными признаками для изучения эпигенетической изменчивости. Соотношения фенотипов по маркерным ферментам позволяют различать гамо- и агамоспермные потомства, а также идентифицировать потомства, полученные путем мейотической и митотической агамоспермии. Исследование семенных потомств удвоенных гаплоидов, размножаемых *in vivo*, и растений-регенерантов сахарной свеклы, размножаемых в культуре ткани *in vitro*, показало, что выявляемая соматическая изменчивость может быть обусловлена эпигенетическими изменениями, возникающими при переходе растения с гаплоидного на более высокий уровень пloidности. Эти данные необходимо учитывать в практической работе при получении растений-регенерантов и линий удвоенных гаплоидов.

**Апробация работы и публикации** Материалы диссертации были представлены на XXXIX Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2001), на 2-ой Международной конференции по апомиксису (г. Комо, Италия, 2001), на 17-м Международном конгрессе по половой репродукции растений (г. Люблин, Польша, 2002), на 9-ой генетико-селекционной школе-семинаре (г. Новосибирск, 2004), на 3-ем съезде ВОГиС (г. Москва, 2004), на 3-ей Международной конференции «Проблема вида и видообразования» (г. Томск, 2004). По результатам работы опубликовано 7 печатных работ и 3 находятся в печати.

**Объем и структура диссертации** Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы (179 ссылок); изложена на 113 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 14 рисунков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Агамоспермные потомства получали** от пыльцестерильных растений, выращиваемых в беспыльцевом режиме под изоляторами или на изолированных участках по методу, предложенному С.И. Малецким и Е.И. Малецкой (1996).

**Генетический анализ агамоспермного потомства** проводили путем опыления анализируемых растений пыльцой тестера-опылителя, взятого из популяции Межотненская 070 и имеющего генотип по маркерному ферментному локусу *Idh3-F/Idh3-S*.

**Анализ влияния колхицина на агамоспермные потомства сахарной свеклы** исследовали на семенах, полученных в беспыльцевом режиме от пыльцестерильных гибридных растений (ms704-8 x 741-1-21), обработанных на стадии прорастания семян 0,1% раствором колхицина согласно методике Савицкого (Savitsky, 1966).

**Анализ изменчивости линий растений-регенерантов сахарной свеклы гиногенетического происхождения** проводили как на стадии семенных потомств, полученных при размножении этих линий *in vivo*, так и на более ранней стадии – в период культивирования *in vitro*. Получение и поддержание линий растений-регенерантов *in vivo* и *in vitro* проводилось А.М.Свирщевской (Институт генетики и цитологии АН Республики Беларусь). Эти линии, каждая из которых происходила из одной неоплодотворенной семяпочки донорного растения, исходно были гаплоидными. Увеличение уровня пloidности у растений-регенерантов происходило как спонтанно, при длительном культивировании *in vitro*, так и при воздействии колхицином.

Семенное потомство линий удвоенных гаплоидов получали переопылением *in vivo*. Удвоенные гаплоиды, полученные от каждого индивидуального растения-регенеранта, выращивали под бязевыми изоляторами (по 3-5 штук) при первой репродукции и на отдельных изолированных участках (по 25-30 штук) при второй репродукции. Семена собирали со всех растений, находящихся на одном участке или под одним изолятором.

**Электрофоретическое разделение** изоферментных спектров проводили методом горизонтального электрофореза в крахмальном геле с последующим гистохимическим окрашиванием электрофореграмм (Левитес, 1986). В качестве маркерных признаков были выбраны изоферментные спектры алкогольдегидрогеназы (ADH1, E.C.1.1.1.1.), малатдегидрогеназы (MDH1; E.C.1.1.1.37.), малик-фермента (ME1, E.C.1.1.1.40.), изоцитратдегидрогеназы (IDH3, E.C.1.1.1.42.) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (PGD1; E.C.1.1.1.44.), контролируемые соответственно локусами *Adh1*, *Mdh1*, *Me1*, *Idh3* и *Pgd1* (Левитес, 1979; Малецкий, Коновалов, 1985; Levites, Garifullina, 1988; Филатов, Левитес, 1990).

**Статистическую обработку данных** проводили, сопоставляя выявляемые соотношения и теоретически ожидаемые с помощью критерия  $\chi^2$  (Лакин, 1973).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Генетический анализ изменчивости в агамоспермных потомствах сахарной свеклы

В агамоспермных потомствах сахарной свеклы выявлен полиморфизм по маркерным ферментам, который позволяет идентифицировать мейотическую и митотическую агамоспермию (Levites, 2002). Два типа агамоспермии различаются по соотношению фенотипических классов. При мейотической агамоспермии полиморфизм представляет собой следствие мейоза, происходящего в тетраплоидных материнских клетках мегаспор, присутствующих в генеративной ткани в качестве примеси среди основной массы диплоидных клеток диплоидного растения (Малецкий, Малецкая, 1996). Соотношение фенотипов в данном случае чаще всего представляет собой соотношение 3:8:3, характерное для гамет тетраплоида при хроматидном типе расщепления. При митотической агамоспермии зародыш образуется из клеток, не прошедших мейоз.

Такое размножение по своей сути представляет собой ничто иное как семенное клонирование. В данном случае возможно как единообразие всего потомства по гетерозиготному фенотипу, так и полиморфизм, возникающий вследствие эпигенетической изменчивости. Полиморфизм при митотической агамоспермии наиболее наглядно представлен в виде двух фенотипических классов (Левитес и др., 1998).

Ранее было показано, что в семенных агамоспермных потомствах КНВС2-3А и КНВС2-7А выявляются два фенотипических класса по изоцитратдегидрогеназе IDH3 (FF и FS) (Левитес и др., 1998). Для объяснения выявленного диморфизма было предположено, что исходные растения КНВС2-3 и КНВС2-7 были гетерозиготны и имели генотип *Idh3-F/Idh3-S*, а фенотип FF выявлялся как следствие замолкания аллеля *Idh3-S*.

Для выяснения генотипов агамоспермных потомств КНВС2-3А и КНВС2-7А были проведены анализирующие скрещивания. Для этой цели растения, выращенные из этой популяции агамоспермных семян, опылили пыльцой взятого из популяции Межотненская 070 тестерного растения Т-1, который был гетерозиготен по гену, контролирующему изоцитратдегидрогеназу (генотип *Idh3-F/Idh3-S*).

Выявленные в потомствах от анализирующего скрещивания соотношения фенотипов сравнивали с теоретически ожидаемыми соотношениями. При этом проверяли соответствие выявляемых соотношений нескольким теоретическим. Эти соотношения следующие: а) 1:2:1 (характерное для потомства от переопыления гетерозигот); б) 1:1 (характерное для опыления гомозиготы с гетерозиготой); в) 2:1:1 (характерное для потомств, полученных от опыления гетерозиготы, несущей нулевой аллель, гетерозиготой).

Соотношение фенотипов по изоцитратдегидрогеназе (IDH3) в потомствах, полученных от анализирующих скрещиваний, свидетельствует о том, что полученные агамоспермным путем популяции КНВС2-3А и КНВС2-7А представлены растениями, имеющими генотип *Idh3-F/Idh3-F* и *Idh3-F/Idh3-S* (Табл. 1 и 2). Это хорошо согласуется с результатами анализа этих популяций на стадии семян, где было выявлено следующие соотношения фенотипов по IDH3: 29FF : 40FS (КНВС2-3А) и 9FF:8FS (КНВС2-7А) (Левитес и др., 1998).

Три растения из популяции КНВС2-7А (растения №20, №15 и №7) можно рассматривать как гетерозиготы по локусу *Idh3*, поскольку в их потомствах от анализирующих скрещиваний было выявлено по три фенотипических класса (Табл. 2).

Таблица 1. Фенотипы семян, полученных опылением растений КНВС2-3А пыльцой тестера Т-1 генотипа *Idh3-F/Idh3-S*

Анализируемое растение КНВС2-3А	Фенотипы по IDH3 и их соотношение в потомстве КНВС2-3А х Т-1	Генотип по локусу <i>Idh3</i>	Р
№ 8	5FF:25FS:10SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 9	4FF:10FS:3SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 24	5FF:11FS:3SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 37	16FF:10FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 2	23FF:17FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 11	23FF:21FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 13	20FF:23FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 17	6FF:16FS:8SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 18	10FF:9FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 22	10FF:16FS:7SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 33	1FF:15FS:8SS	<i>FS</i>	$>0.05$

Таблица 2. Фенотипы семян, полученных опылением растений КНВС2-7А пыльцой тестера Т-1 генотипа *Idh3-F/Idh3-S*

Анализируемое растение КНВС2-7А	Фенотипы по IDH3 и их соотношение в потомстве КНВС2-7А х Т-1	Генотип по локусу <i>Idh3</i>	Р
№ 7	8FF:25FS:25SS	<i>FS*</i>	$<0.01$
№ 10	24FF:23FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 12	25FF:24FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 14	12FF:7FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 15	8FF:6FS:7SS	<i>FS</i> или <i>F0<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 16	12FF:9FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 18	30FF:29FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 20	13FF:19FS: 8SS	<i>FS</i>	$>0.05$
№ 22	20FF:18FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$
№ 25	16FF:11FS	<i>FF<sub>S</sub></i>	$>0.05$



Одно из них (№20) проявляет себя как вполне стандартная гетерозигота (13FF:19FS:8SS,  $P>0.05$ ). В потомстве растения №15 выявлено соотношение фенотипов 8FF:6FS:7SS, которое не позволяет точно определить его генотип. Это соотношение может быть обусловлено как генотипом *Idh3-F/Idh3-S*, так и переходом аллеля *Idh3-S* в эпиаλληль *Idh3-0<sub>s</sub>*. И, наконец, соотношение фенотипов в потомстве от анализирующего опыления растения №7 (8FF:25FS:25SS) свидетельствует о том, что процесс завязывания семян в данном случае сложен и испытывает на себе влияние каких-то дополнительных факторов. Вследствие этого, выявленное соотношение фенотипов в потомстве растения № 7 не соответствует ни одной модели: ни 1:2:1, ни 1:1:2, ни 2:1:1. В потомстве остальных семи растений популяции КНВС2-7А выявлено по два фенотипических класса (FF и FS), что с достоверностью ( $P>0.05$ ) позволило классифицировать их как гомозиготы по аллелю *Idh3-F*.

Можно видеть, что число и соотношение фенотипов в агамоспермном потомстве, определенное ранее по семенам, соответствует числу и соотношению генотипов, определенному по следующему поколению (в анализирующих скрещиваниях). Эти данные свидетельствуют о том, что возникшие изменения передаются через гаметы в следующее поколение. Частота возникающих изменений на несколько порядков выше частоты мутаций. Поэтому эти наследуемые изменения можно классифицировать как эпигенетические. Появление фенотипов, сходных с гомозиготными, обусловлено не замолканием одного из аллелей гетерозиготного локуса, а редетерминацией. Редетерминация – это переход активного аллеля ферментного локуса в новое состояние, при котором его экспрессия совпадает с экспрессией другого аллеля, характерного для данного локуса у данного вида (Levites, 2002). Таким образом, аллель *Idh3-S* перешел в новое состояние (*Idh3-F<sub>s</sub>*), сходное по своей экспрессии с аллелем *Idh3-F*. Такие изменения можно классифицировать как эпигенетические и представляющие собой качественное изменение в экспрессии гена.

Полученные данные генетического анализа агамоспермных потомств говорят о том, что изменения ферментного локуса (замолкание и редетерминация), приобретенные в ходе агамоспермного развития организма, обусловлены изменениями, происходящими в геноме. Проявление этих изменений в следующем поколении, полученном от анализирующих скрещиваний, говорит о том, что эти приобретенные изменения наследуются.

## **2. Анализ влияния колхицина на соотношение фенотипических классов в агамоспермных потомствах сахарной свеклы**

Известно, что одним из важнейших факторов, способствующих агамоспермии, является полиплоидия, а именно уровень плоидности клеток, вступающих на путь эмбриогенеза (Gustafsson, 1946-1947; Stebbins, 1950; Петров, 1988). В связи с этим проведена оценка воздействия колхицина на растения, завязывающие семена в беспыльцевом режиме. Анализированные в данном эксперименте обработанные колхицином растения обладали повышенной семенной продуктивностью; у обработанных колхицином растений увеличилась сростноцветковость (Малецкая и др., личное сообщение).

В агамоспермных потомствах сахарной свеклы, полученных как от контрольных, так и от обработанных колхицином растений, выявлен полиморфизм по алкогольдегидрогеназе, который представлен тремя типами изоферментных спектров аналогичных тем, которые выявляются в семенах, получаемых гамоспермным путем, т.е. при слиянии обоих типов гамет.

Среди проанализированных агамоспермных семян, полученных как от контрольных (неколхицинированных), так и от опытных (колхицинированных) растений, выявлены как мономорфные потомства, так и полиморфные, различающиеся по соотношению и числу фенотипических классов с активным и неактивным ферментом (Табл. 3 и 4). Это позволяет провести сравнение контрольных и опытных потомств по всем этим показателям.

Для упрощения рассмотрения полученных результатов все агамоспермные потомства разделены на группы: А, В, С и D (Табл. 3 и 4). В группу А входят потомства, в которых отсутствуют фенотипы FS и SS, что позволяет предположить, что исходные материнские растения были гомозиготами по аллелю *Adh1-F*. Соотношения В и С, в которых присутствуют два фенотипических класса (рис. 1), довольно хорошо напоминают собой соотношения, которые ранее были выявлены в потомствах, полученных от гетерозиготных растений путем митотической агамоспермии (Левитес и др., 1998). Предполагается, что полиморфизм возникает в данном случае за счет эпигенетической изменчивости. Сходство этих соотношений у контрольных и опытных потомств свидетельствует о том, что колхицинирование не приводит к смене механизма эпигенетической изменчивости у агамоспермно размножающихся растений.

Таблица 3. Соотношение фенотипов семян по алкогольдегидрогеназе (ADH1) в агамоспермных потомствах контрольных пыльцестерильных растений сахарной свеклы E122

Номера растений	Фенотипические классы				$\chi^2$ (3:8:3)	Тип потомства (тип соотношения)
	FF(F0)	FS	SS(S0)	00		
E122-21	9	-	-	1	32.97	A
E122-35	105	107	-	13	123.99	B
E122-11	-	21	2	7	11.37	C
E122-13	-	132	14	25	69.11	C
E122-30	26	44	13	2	5.33	D
E122-34	22	44	13	1	2.46	D
E122-33	15	20	3	2	9.16	D

Таблица 4. Соотношение фенотипов семян по алкогольдегидрогеназе (ADH1) в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы E122к, обработанных колхицином

Номера растений	Фенотипические классы				$\chi^2$ (3:8:3)	Тип потомства (тип соотношения)
	FF(F0)	FS	SS(S0)	00		
E122к-90	10	-	-	1	36.72	A
E122к-88	25	26	-	4	29.44	B
E122к-11	-	147	29	36	61.16	C
E122к-1	74	124	26	19	24.29	D
E122к-7	12	2	1	5	30.63	D
E122к-9	37	65	11	17	13.97	D
E122к-44	50	47	3	5	55.74	D
E122к-63	27	22	4	2	28.57	D
E122к-77	-	10	-	-	7.50	E

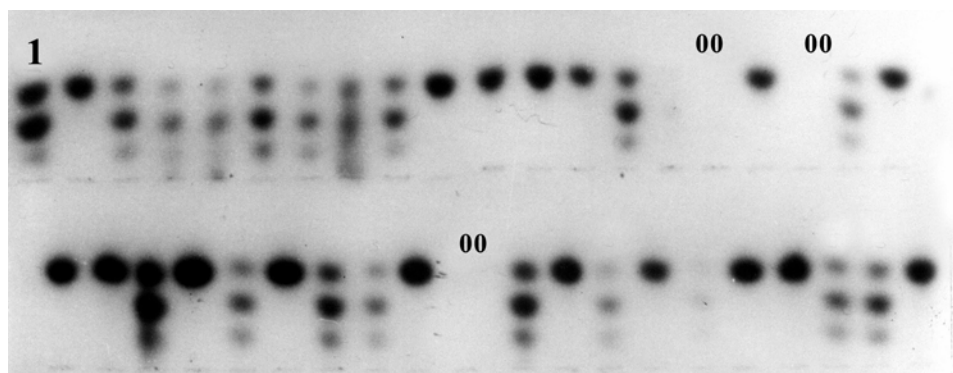


Рис. 1. Изоферментные спектры ADH1 в агамоспермном потомстве E122-35. 1 – семена, у которых аллель *Adh1-F* экспрессирован значительно сильнее, чем аллель *Adh1-S*; 00 – семена, у которых полностью отсутствует активность обоих аллелей.

Наличие фенотипических классов FF, FS и SS в контрольной группе потомств D типа в соотношении 3:8:3 является одним из аргументов в пользу предположения о том, что данные потомства образовались путем мейотической агамоспермии.

В группе потомств, полученных от опытных растений, сходный набор фенотипов с активным ферментом (FF, FS и SS) выявлен в потомствах E122к-1, E122к-7, E122к-9, E122к-44, E122к-63. Однако соотношение фенотипов FF, FS и SS в этой группе не соответствует гаметическому отношению 3:8:3 ( $P < 0.05$ ). Это указывает на то, что полиморфизм в агамоспермных потомствах опытной группы растений обусловлен не рекомбинационными процессами, сопровождающими мейоз, а другими причинами. Одной из таких причин может быть инактивация аллелей ферментного локуса. На возможность инактивации указывает наличие в группе опытных и контрольных потомств фенотипов с нулевой активностью фермента (рис. 1). Если бы эпигенетическая изменчивость при митотической агамоспермии отсутствовала, то потомство гетерозиготы *FS* было бы представлено только гетерозиготами *FS*. Наиболее простое объяснение появления фенотипов SS(S0) – предположение о том, что происходит инактивация *F*-аллеля, а появление фенотипов FF(F0) возможно лишь при инактивации *S*-аллеля. Точное объяснение этого явления возможно лишь после проведения генетического анализа.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что используемая в данном эксперименте концентрация колхицина (недостаточная для изменения уровня ploidy растения) меняет соотношение фенотипических классов в агамоспермном потомстве гетерозиготных растений.

### 3. Изучение полиморфизма ферментных локусов в линиях растений-регенерантов сахарной свеклы, культивируемых *in vitro* и *in vivo*

Высокий уровень изменчивости в агамоспермных потомствах говорит о том, что способ размножения является важным фактором, определяющим характер и уровень изменчивости. Однако наряду с такими естественными способами размножения как гамо- и агамоспермия существует и широко применяется в исследованиях размножение растений в культуре *in vitro*. При использовании этого метода, в частности при культивировании неоплодотворенных семязпочек, образующиеся из клеток зародышевого мешка растения-регенеранты представляют собой гаплоиды, которые в дальнейшем полиплоидизируются и превращаются в диплоиды. Таким образом, растения, полученные путем размножения *in vitro*, могут представлять собой удобную модель для изучения эпигенетической изменчивости, связанной с изменением уровня ploидности. Это является логическим дополнением к экспериментам по изучению влияния колхицина на агамоспермное потомство.

В исследование были взяты семена второй репродукции линий удвоенных гаплоидов сахарной свеклы, полученные путем переопыления растений этих линий на изолированных участках. Линия удвоенного гаплоида Бц 40 СУГ(35)РК, полученная из сорта Бц 40, а также линия Янаш КУГ, полученная из сорта Янаш, мономорфны по алкогольдегидрогеназе-1 (Табл. 5). Отсутствие полиморфизма по ADH1 в семенном потомстве линий удвоенных гаплоидов говорит о стабильности локуса *Adh1* у этих линий.

Семенные потомства исследованных линий удвоенных гаплоидов полиморфны по двум исследованным маркерным ферментам: по малик-ферменту и по изоцитратдегидрогеназе-3.

В семенном потомстве линии удвоенных гаплоидов Янаш КУГ выявляются продукты трех аллелей (Табл. 5). На это указывают фенотипические классы FC и CS, присутствующие наряду с фенотипами FF, FS и SS. Этот факт не вписывается в представления, основанные только на законах классической менделевской генетики, но может быть объяснен на основе представлений об эпигенетической изменчивости. Можно предположить, что аллель локуса *Me1* эпигенетически изменился, перешел в новые состояния, при которых его экспрессия совпадает с экспрессией других аллелей, характерных для данного локуса, но отсутствовавших у данного растения.

Таблица 5. Частоты фенотипов семян сахарной свеклы по маркерным ферментам

Название линии	ADH1	ME1	IDH1	IDH3
	FF-FS-SS	CC-FC-FF-FS-SS-CS	FF-FS-SS	FF-FS-SS
Янаш КУГ	20- 0 -0	0 -2 -9 -16 -29 -3	39 – 1 – 0	25- 13 – 1
БЦ 40	33- 0 -0	0 -0 -0 -2 -31 -0	18 –19 - 0	34- 0 – 0
БЦ 40 СУГ(35)ПК	20- 0 -0	0 -5 -12 -15 -7 -1	30 – 0 -0	7 - 18 - 3

Обозначения: Янаш КУГ – линия удвоенного гаплоида, полученная из диплоидного сорта ЯнашА3, у которой для удвоения числа хромосом использовали колхицин; БЦ 40 – диплоидный сорт Белоцерковская односемянная 40; БЦ 40 СУГ(35)ПК – линия удвоенного гаплоида, полученная из диплоидного сорта Белоцерковская односемянная 40, у которой полиплоидизация клеток происходила спонтанно при культивировании их в условиях *in vitro* более одного года.

Высокий уровень полиморфизма по малик-ферменту, аналогичный тому, что выявлен в линии Янаш КУГ, обнаружен также в линии БЦ 40 СУГ(35)ПК, прошедшей двукратную репродукцию в культуре *in vitro*. Продолжительный период культивирования *in vitro* ведет к накоплению клеток с удвоенным набором хромосом в исходно гаплоидных гиногенетических линиях сахарной свеклы (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001). Количественное и качественное сходство изменчивости малик-фермента у линий, прошедших либо обработку колхицином (Янаш КУГ), либо повторное культивирование в условиях *in vitro* (БЦ 40 СУГ(35)ПК), свидетельствует о сходстве механизмов, лежащих в основе этой изменчивости. Сходство заключается в первую очередь в том, что как в том, так и в другом случае происходит удвоение числа хромосом в клетках растений-регенерантов. Таким образом, параллелизм изменения пloidности и появления эпигенетических изменений указывает на важную роль геномных преобразований в изменчивости.

Сходство набора фенотипических классов по малик-ферменту, выявленных ранее в агамоспермном потомстве (наличие продуктов трех аллелей одного локуса в потомстве одного диплоидного растения) (Levites et al., 2001) и в потомстве удвоенных гаплоидов (Табл. 5), позволяет предположить, что в обоих случаях мы имеем дело со сходным механизмом, лежащим в основе такой изменчивости. Отличительной особенностью данной работы является то, что здесь качественные изменения в экспрессии ферментных генов сопутствуют изменению пloidности всего генома.

Это явилось основанием для проведения еще одной серии экспериментов, в которых проводился анализ изменчивости непосредственно в растениях-регенерантах сахарной свеклы, культивируемых *in vitro*. Перед исследованием регенерантов были проанализированы исходные сорта сахарной свеклы.

В диплоидном сорте Белорусская односемянная 69 (Бел 69 (2x)) (Урожай 2003 г.) все 40 проанализированных семян имели по алкогольдегидрогеназе фенотип FF, такой же фенотип имели все 74 семени исходного сорта Ганусовская односемянная 55 (Ган55(2x)) и 70 семян сорта Белоцерковская односемянная 40 (Бц40), использованного для получения линии 35/РК<sup>2</sup>. Лocus *Idh1*, контролирующей изоцитратдегидрогеназу (IDH1), в исследованных ранее популяциях проявлял достаточно выраженный полиморфизм, однако в сортах взятых для получения растений-регенерантов полиморфным был лишь сорт БЦ40. Во всех исследованных линиях растений-регенерантов алкогольдегидрогеназа была мономорфной (Табл. 6). Это указывает на стабильность локуса *Adh1* в растениях, культивируемых *in vitro*.

При анализе изоферментных спектров изоцитратдегидрогеназы-1 выявлены как мономорфные, так и полиморфные геногенетические линии (Табл. 6), (Рис. 2). Представляет интерес тот факт, что полиморфизм выявлен в линиях, полученных путем микроклонального размножения одного гаплоидного растения-регенеранта. Гаплоидность растений-регенерантов подтверждалась цитологически. Так, при микроскопировании регенерантов линии Бел69-3(5)-10(1) из 10 проанализированных клеток было 10 гаплоидных. Полиморфизм по IDH1 выявлен, например, также в линии Ян2-2, в которой из 4573 клеток 1660 были гаплоидными, а остальные имели более высокий уровень пloidности (2x, 4x и 8x). Аналогичным образом полиморфизм выявлен в линии 58(4), в которой при цитометрии из более чем 4049 клеток 1971 оказались гаплоидными, а остальные имели более высокий уровень пloidности (Табл. 6). Этот факт указывает на то, что переход с гаплоидного на более высокий уровень пloidности может приводить к изменениям в экспрессии генов. Следует заметить также, что среди линий, полученных из сорта Бел69, есть линии с гомозиготным фенотипом SS, хотя в исходном сорте не обнаружен аллель *Idh1-S*, определяющий этот фенотип. Наиболее вероятно, что появление SS-фенотипов есть результат изменчивости исходного аллеля *Idh1-F*. Высокая частота наблюдаемых изменений не позволяет относить их в разряд мутаций.

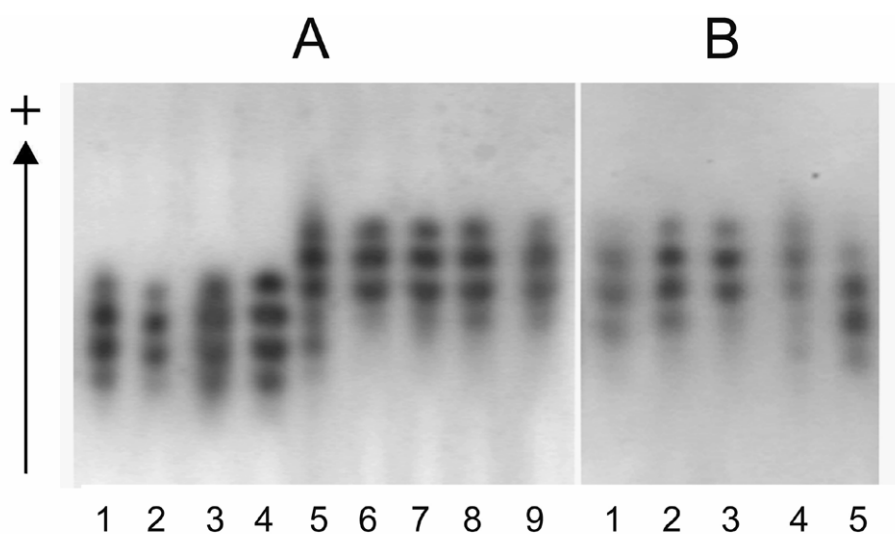


Рис. 2. Изоферментные фенотипы по изоцитратдегидрогеназе-1 (IDH1) в линиях растений-регенерантов сахарной свеклы гиногенетического происхождения, культивируемые *in vitro*. А – изоферментные спектры IDH1 в мономорфных образцах: 1-4 – регенеранты Ган55-7(2) фенотипа SS; 5 – стандарт (семена сахарной свеклы фенотипа FF); 6-9 – регенеранты Бел69-3(14) фенотипа FF; В – изоферментные спектры IDH1 в регенерантах полиморфной линии 58(4): 1 – фенотип FS; 2 и 3 – фенотип FF; 4 – стандарт (семена фенотипа FF); 5 – фенотип SS.

Обнаружена интересная особенность. У линий, проявлявших полиморфизм по IDH1, наблюдался также мозаицизм в пределах одного растения. На это указывает тот факт, что в одном листе у растения выявлялся гетерозиготный фенотип, а в другом листе – гомозиготный, либо активность могла отсутствовать. Этот факт хорошо согласуется с данными микроскопии, свидетельствующими о том, что уровень ploидности изменяется в растении-регенеранте не сразу, а постепенно, через миксоploидию (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001). Растение при этом цитологически представляет собой мозаик, в котором одновременно присутствуют клетки разного уровня ploидности. В таком случае можно легко представить, что характер экспрессии ферментного локуса будет определяться дозовыми соотношениями исходного аллеля и его нового измененного состояния. Если один из аллелей замолкает, инактивируется, то гетерозиготный фенотип переходит в гомозиготный. Полученные результаты хорошо согласуются с известными литературными данными, свидетельствующими о наличии соматклональной и мутационной изменчивости в культуре ткани, а также в растениях, размножаемых *in vitro*.



Таблица 6. Ферментные фенотипы у растений-регенерантов гиногенетических линий

Название линии	Цитоанализ* (общее число клеток / число гаплоидных клеток)	ADH1			IDH1		
		FF	FS	SS	FF	FS	SS
Бел69-3(5)-10(1)	10/10	14	0	0	0	4Stable+6Mosaic	4
Бел69-3(5)-10(4)	10/10	-	-	-	0	0	8
Бел69-3(7)	30/30	3	0	0	14	0	0
		5	0	0	9	0	0
Бел69-3(14)	4621/2060	9	0	0	7	1	0
		8	0	0	8	0	0
Бел69-3(15)	3123/1050	7	0	0	0	0	7
		8	0	0	0	0	8
		6	0	0	0	0	8
Бел69-3(16)	4895/2544	13	0	0	14	0	0
		8	0	0	8	0	0
Ган55-5(2)	3209/854	9	0	0	0	0	10
		-	-	-	0	0	9
		-	-	-	0	0	8
Ган55-7(2)	4805/1513	13	0	0	0	0	13
		-	-	-	0	0	13
Ган55-7(5)	10/10	16	0	0	2	6Stable+8Mosaic	1
		-	-	-	0	2Stable+9Mosaic	1
Ян2-2	4573/ 1660	9	0	0	10	0	0
		15	0	0	13	3Mosaic	0
58(4)	4049/1971	11	0	0	4	2Stable+3Mosaic	0
		-	0	0	13	0	0
35/3РК <sup>2</sup>	Удвоенный Гапл.	6	0	0	11	0	0
		-	-	-	5	5	3

Пояснения к таблице: \* - результаты цитофотометрического анализа (средние из 5 повторностей для каждого генотипа): уровень ploидности определен по относительному содержанию ДНК в ядрах клеток листовой ткани регенерантов: общее число ядер равно сумме 1С, 2С, 4С и 8С ядер, гаплоидных – 1С. Количество строчек для каждого номера соответствует количеству проанализированных чашек Петри.

Отличие данной работы состоит в том, что она проводилась на исходных гаплоидах, и в данной модели отсутствует, например, возможность парамутационного влияния одного аллеля на другой в условиях *in vitro*.

### ВЫВОДЫ

1. Растения сахарной свеклы, проявляющие признак стерильности, способны в беспыльцевом режиме образовывать агамоспермное потомство.
2. В агамоспермных потомствах сахарной свеклы выявлен полиморфизм по ферментным локусам. Генетический анализ показал, что полиморфизм в агамоспермных потомствах, представленный двумя фенотипическими классами обусловлен либо замолканием одного из аллелей гетерозиготного локуса, либо редетерминацией, при которой оба аллеля начинают экспрессироваться одинаково.
3. Соответствие выявляемых в агамоспермных потомствах фенотипических классов, числу и соотношению генотипических классов, выявляемых при генетическом анализе, свидетельствует о том, что изменения (замолкание и редетерминация), возникшие в ходе индивидуального развития агамоспермного потомства, обусловлены изменениями в геноме, способными передаваться в следующее поколение, т.е. наследоваться.
4. Воздействие колхицином на растения сахарной свеклы, способные к агамоспермному размножению, приводит к изменению соотношения фенотипических классов маркерного фермента (ADH1) в агамоспермном потомстве. Это указывает на то, что колхицин изменяет частоту эпигенетической изменчивости в агамоспермном потомстве аллелей маркерного локуса.
5. В семенных потомствах линий удвоенных гаплоидов сахарной свеклы гиногенетического происхождения Янаш КУГ и БЦ 40 СУГ(35)ПК выявлен полиморфизм по ферментным локусам *Me1* и *Idh3*. Полиморфизм выявлен также у растений-регенерантов, культивируемых *in vitro* по ферментам изоцитратдегидрогеназа (IDH1) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (PGD1). Сделан вывод о том, что существенную роль в возникновении полиморфизма в линиях растений-регенерантов и удвоенных гаплоидов играет переход растений с гаплоидного на более высокий уровень пloidности.
6. Полученные данные свидетельствуют о том, что на эпигенетическую изменчивость у растений сахарной свеклы существенное влияние оказывает способ размножения (агамоспермия, размножение *in vitro*), воздействие эпимутагеном (колхицином). Комплексное воздействие агамоспермии и колхицина также приводит к

эпигенетической изменчивости аллелей маркерного локуса *Adh1*. Воздействие колхицина в условиях размножения растений *in vitro* приводит к четко выраженной эпигенетической изменчивости, наблюдаемой в семенном потомстве, получаемом при дальнейшей репродукции линии удвоенного гаплоида.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Levites E.V., Denisova F.Sh., **Kirikovich S.S.** and Judanova S.S. (Maletskaya S.S.) Ratios of phenotypes at the *Adh1* locus in the apozygotic offspring in sugarbeet (C<sub>1</sub> generation) // Sugar Tech. 2000. V.2. N4. P.26-30.
2. **Kirikovich S.S.**, Levites E.V. Expression of the *Adh1* gene in the agamosperous offspring of sugar beet. 2<sup>nd</sup> International apomixis conference APO 2001. Como. Italy. 2001. April 24-28. P.82.
3. **Kirikovich S.S.**, Levites E.V. Effect of colchicine on epigenetic variability in agamosperous progeny of sugar beet. In: Sexual plant reproduction in nature and the laboratory. Program and Abstracts. (XVIIth International Congress on Sexual Plant Reproduction). Lublin. 2002. P.74.
4. Levites E.V., **Kirikovich S.S.** Epigenetic Variability of Unlinked Enzyme Genes in Agamosperous Progeny of Sugar Beet // Sugar Tech. 2003. V.5. N1&2. P. 57-59.
5. **Kirikovich S.S.**, Svirshchevskaya A.M., Levites E.V. Variation at isozyme loci in seed offspring of sugar beet gynogenetic lines // Sugar Tech. 2003. V. 5 N4. P. 289-292.
6. Левитес Е.В., **Кирикович С.С.** Генетическая и эпигенетическая изменчивость в агамоспермных потомствах сахарной свеклы // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. III съезд ВОГиС. Москва. 2004. 6-12 июня. Т. 1. С. 218.
7. **Кирикович С.С.**, Левитес Е.В. Факторы, влияющие на эпигенетическую изменчивость // Эпигенетика растений. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2005. С. 146-163.
8. **Кирикович С.С.**, Свирщевская А.М., Левитес Е.В. Полиморфизм ферментов в семенных потомствах удвоенных гаплоидов сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. // Материалы девятой генетико-селекционной школы семинар «Актуальные задачи селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений на современном этапе». Новосибирск, 5-9 апреля, 2004. (в печати).
9. **Кирикович С.С.**, Левитес Е.В. Генетический анализ изменчивости в агамоспермном потомстве сахарной свеклы // Материалы III международной конференции «Проблема вида и видообразования». Томск, 20-22 октября, 2004 (в печати).
10. Levites E.V., Svirshchevskaya A.M., **Kirikovich S.S.** and Mil'ko L.V. Variation at isozyme loci in cultured *in vitro* sugar beet regenerants of gynogenetic origin // Sugar Tech. 2005. V. 7. (in press).