

Е.И. МАЛЕЦКАЯ,
С.С. ЮДАНОВА, С.И. МАЛЕЦКИЙ

Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. акад. Лаврентьева 10,
Новосибирск, 630090
e-mail: e_malk@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ 5-АЗАЦИТИДИНА НА ВЕТВЛЕНИЕ ЦВЕТОНОСНЫХ ПОБЕГОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.)



Исследовали влияние эпимутагена 5-азациитидина на морфогенез цветоносных побегов сахарной свеклы. Показали, что на цветоносных побегах под влиянием эпимутагена закладывается множество дополнительных ветвей первого и третьего порядков, что полностью меняет архитектуру цветоносных побегов (поколение $A_0A_{z_0}$ и $A_1A_{z_1}$). Число побегов второго порядка у опытных и контрольных растений оказалось примерно равным. Новый фенотип с обильным ветвлением цветоносных побегов (поколение $A_0A_{z_0}$), возникший под влиянием эпимутагена, сохраняется (наследуется) в дочернем поколении $A_1A_{z_1}$. Изменение архитектуры цветоносов связано с тем, что у контрольных растений на ветвях второго порядка в пазухах прицветников закладываются цветочные почки, а у эпимутантов развиваются ветви третьего порядка. Формирование множества дополнительных побегов третьего порядка меняет тип метамеризации побегов. Практически все метамеры, формирующиеся на ветвях третьего порядка, имеют одиночные цветки.

© Е.И. МАЛЕЦКАЯ, С.С. ЮДАНОВА,
С.И. МАЛЕЦКИЙ, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 6

Введение. Сахарная свекла — двухлетнее растение: в первый год жизни формируются утолщенный корень (корнеплод) и розетка листьев, а на второй год жизни после прохождения стадии яровизации — цветоносный побег. На побеге различают верхушечную, или терминальную, почку, из которой развивается цветоносный побег (главный стебель), и боковые, или пазушные, почки, из которых формируются дополнительные (боковые) цветоносные побеги. Главный и боковые стебли ветвятся по моноподиальному типу, при котором главная ось (моноподий) имеет как бы неограниченный верхушечный рост. От моноподия первого порядка отходят оси второго порядка, дающие оси третьего и иногда четвертого порядков (рис. 1). «Многолетняя жизнеспособность свекловичного растения обусловлена природой головки корнеплода. Головку следует рассматривать как укороченную стеблевую часть с короткими междоузлиями, что и определяет размещение листьев в виде прикорневой розетки. На головке различают верхушечную и пазушные почки ... Верхушечную почку можно считать центральной почкой, из которой развивается наиболее развитый стебель с листьями. Из пазушных почек развиваются боковые побеги ... В свою очередь, центральный и боковые побеги также ветвятся по моноподиальному типу, образуя таким путем семенные кусты с разным количеством цветоносных стеблей» [1].

Оценивая наследственные факторы реализации признака «структура цветоносного побега» или «тип ветвления побега», следует учитывать как генетическую, так и эпигенетическую компоненты его детерминации. Этот признак тесно связан с метамерной структурой организации побега сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Метамерией в ботанике называют повторение однотипных участков (фитомер) по всей длине побега. Цветки развиваются из меристематических бугорков, возникающих в пазухах прицветников. Каждый фитомер состоит из междоузлия и листа или прилистника с пазушной почкой. У свеклы различают простые (один цветок в пазухе листа) и сложные (несколько цветков в пазухе листа) фитомеры на цветоносных побегах (рис. 2). У многоростковых форм свеклы фитомеры сложные, образующие впоследствии «соцветие-клубочек». Цветки в клубочке возникают в виде меристематических

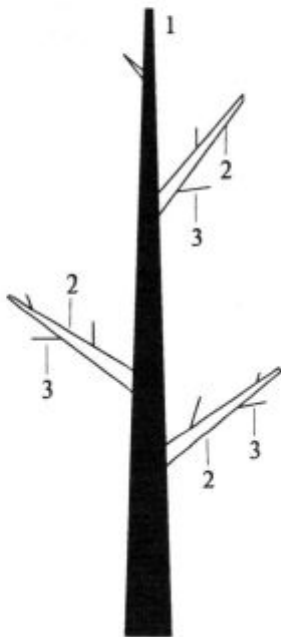


Рис. 1. Схематическое изображение моноподиального ветвления: 1 — ось первого порядка; 2 и 3 — оси второго и третьего порядков соответственно

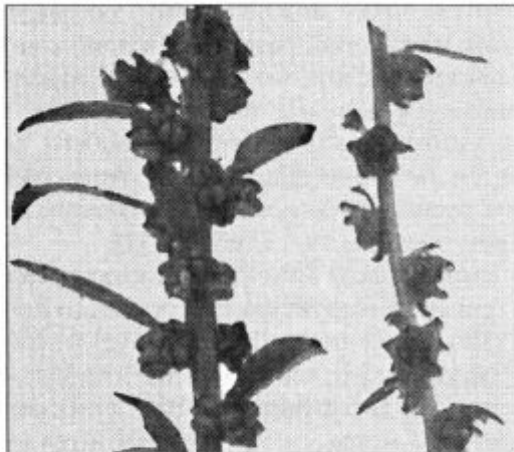


Рис. 2. Слева показан побег со сложными метамерами (несколько цветков в пазухе листа), справа — с простыми метамерами (один цветок в пазухе листа)

бугорков в пазухе прицветников. Сначала закладывается центральный бугорок, из которого формируется первый цветок, а затем в его основании — второй, потом — третий и т.д. [2]. Число цветков в соцветиях-клубочках подвержено значительной изменчивости в пределах отдельного растения. При описании метамерной организации цветonoсов нами будут использованы следующие термины: растения со сложными фитомерами обозначим как срост-

ноцветковые (СЦ фенотип), а растения с простыми фитомерами — раздельноцветковые (РЦ фенотип) [3].

Моноподиальная структура цветоноса определяет и порядок распускания цветков. Первыми раскрываются цветки на верхушке центрального цветоноса, а в последующие дни — цветки, расположенные на нижележащих ветвях. Таким образом, порядок распускания цветков на побегах в ходе вегетации осуществляется в базепетальном направлении.

Эпигенетическая парадигма наследования признаков позволяет использовать различные эпимутагенные факторы, вызывающие наследственную модификацию признаков растений. Известно, что эпигенетической изменчивости морфогенетических признаков на уровне хроматина соответствуют изменения в отдельных сегментах хроматиновой нити интерфазных ядер (дискретные состояния эпигенов типа «да — нет»). В этом случае изменениями затронута структура хроматина, но не затронуты нуклеотидные последовательности молекул ДНК. В логическом соответствии с понятием «эпигенетическая наследственность» можно оперировать теми же терминами, которые используются в классической генетике, добавляя к ее терминам приставку «эпи» (эпигены, эпимутации и т. д.). Один из наиболее популярных эпимутагенов — 5-азацитидин (ингибитор ферментов ДНК-метилтрансфераз), позволяющий снижать содержание 5-метилдезоксцитидина (m^5C) в молекулах ДНК. Обработка растений этим эпимутагеном вызывает гипометилирование генома [4—6]. В геномах растений доля 5-метилдезоксцитидина в молекулах ДНК достигает 30 % и более [5]. Эпимутаген позволяет изменять различные биологические признаки и свойства свеклы, включая длительность вегетационного периода, дополнительное ветвление побегов, снижает число цветков в метамерах цветоносных побегов и др. [7, 8].

Целью настоящей работы было исследовать влияние эпимутагена 5-азацитидина на архитектуру цветоносных побегов и тип куста у сахарной свеклы, а также изучить наследование признака ветвистости в смежных поколениях семенной репродукции $A_0A_{z_0}$ (контроль) и в дочернем поколении $A_1A_{z_1}$ (опыт).

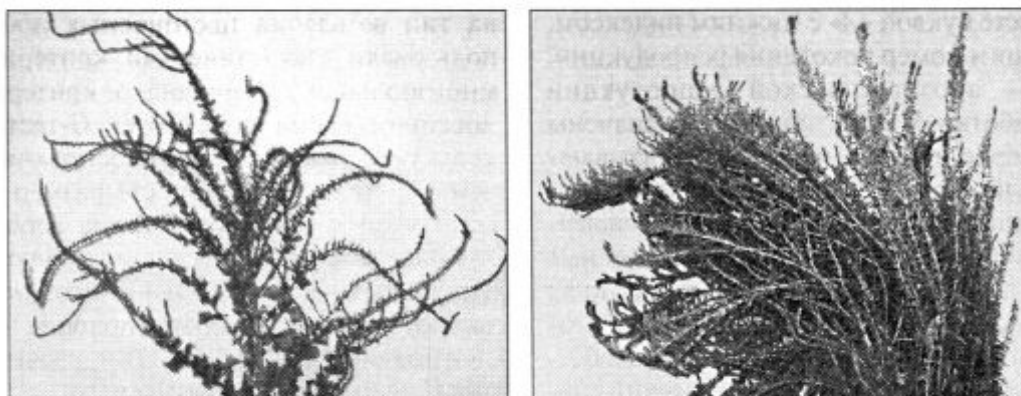


Рис. 3. Цветоносные побеги свеклы: слева — контрольные растения, справа — эпимутантное растение (после обработки 5-азациитидином — опыт)

Материал и методы. В качестве материала использовали простой РЦ гибрид сахарной свеклы с цитоплазматической мужской стерильностью (мс704-8 × 741-1-21)-35А. Обозначение гибрида сделано по системе, принятой в лаборатории популяционной генетики растений Института цитологии и генетики СО РАН [9]. Растения со стерильной пылью размножали апозиготическим способом — репродукция семян без участия пыльцевого родителя [10].

Растения сахарной свеклы склонны к партеногенетическому (апозиготическому) способу репродукции семян — беспыльцевой способ семенной репродукции [10, 11]. В 2001 г. апозиготические семенные потомства получали от пыльцестерильных растений гибрида (мс704-8 × 741 — 1-21)-35А, выращенных на изолированном участке. Семена собирали с растений фенотипов мс0 и мс1, т.е. с растений, имеющих дефектные пыльцевые зерна (летальный фенотип по пыльце). В период бутонизации и начала цветения у всех растений на делянке определяли фенотипы по пыльце. С этой целью просматривали пыльники и пыльцу до начала раскрытия цветков у всех растений на делянке. При беспыльцевом режиме семенной репродукции идентификацию растений по фенотипам пыльцевых зерен проводили ежедневно в течение всего срока цветения. Это связано с тем, что некоторые растения характеризуются мозаичным фенотипом: первыми раскрываются цветки, расположенные на центральном побеге и имеющие один фенотип, а позже раскрываются цветки боковых побегов, которые могут иметь иной фенотип

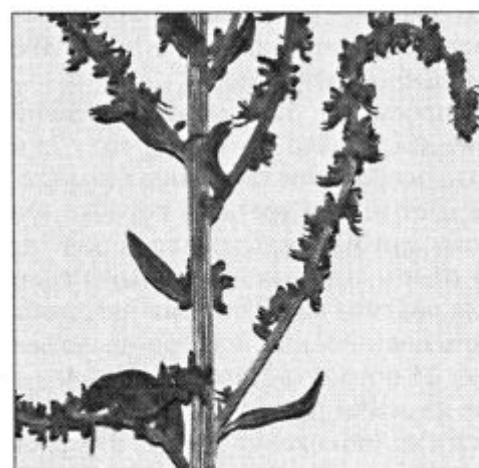


Рис. 4. Появление на ветви второго порядка из пазухи прицветника дополнительного побега

по пыльце. Растения с мозаичными фенотипами удаляли из размножения.

Перед посевом семена промывали в течение 2 сут в проточной воде, затем проращивали в термостате при температуре 25 °С. Наклюнувшиеся семена перед посевом в теплицу помещали на 24 ч при температуре 25 °С в 0,5 мМ раствор 5-азациитидина (опыт), контрольные семена оставляли в дистиллированной воде. Полученные штеклинги оставляли на яровизацию до весны, а затем высаживали в грунт. Наблюдения за морфогенезом цветоносных побегов у опытных и контрольных растений проводили на протяжении нескольких лет (2001—2004 гг.).

В настоящем эксперименте поколения апозиготической репродукции растений обозна-

чены в тексте буквой «А» с нижним индексом, указывающим номер поколения репродукции. Поколения апозиготической репродукции после обработки 5-азациитидином обозначены буквами «Az» с нижним индексом, указывающим также номер поколения репродукции: A_0 — исходные растения, семена которых не подвергались никакой обработке; A_0Az_0 — исходные растения, семена которых были обработаны эпимутагеном 5-азациитидином; A_1 — апозиготическое поколение исходных растений, обозначение указывает на партеногенетический способ размножения; A_1Az_1 — апозиготическое поколение растений A_0Az_0 , обозначение указывает на партеногенетический способ размножения. В работе сравнивается архитектура контрольных и опытных растений — A_1 (контроль) и A_1Az_1 (опыт) (рис. 3).

При просмотре 52 опытных растений (поколение A_0Az_0) было выявлено, что у 25 из них наблюдали обильное ветвление главным образом за счет ветвей третьего порядка (рис. 4). По этому признаку наблюдали резкие отличия между опытными и контрольными растениями. Для анализа наследования признака «ветвистость цветоносных побегов» было выбрано одно из 25 потомств (поколение A_1Az_1), полученное из семян растения с высоким уровнем ветвистости (поколение A_0Az_0). Эти растения, обработанные эпимутагеном и проявляющие повышенное ветвление, рассматривали как эпимутантные. В качестве контроля случайным образом взято также одно потомство от не обработанных эпимутагеном растений (поколение A_1).

По результатам наблюдений сравнивали распределения фенотипов по числу побегов первого, второго и третьего порядков у растений в экспериментальных и контрольных популяциях. Для оценки влияния эпимутагена

на тип ветвления цветоносных побегов использовали статистический критерий G для многопольных таблиц (аналог критерия χ^2). «В новейшее время пользуются G -тестом, поскольку его теоретические обоснования лучше, чем у χ^2 -теста. В этом тесте размер выборки используется как соотношение вероятностей для определения соответствия наблюдаемых и ожидаемых частот признака. Этот подход называют «тестом на правдоподобие числовых соотношений» [12, с.194]. Для расчета критерия G использовали формулу

$$G = 2 \left(\sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^k z_{ij} \ln z_{ij} - \sum_{i=1}^s \left(\sum_{j=1}^k z_{ij} \right) \ln \left(\sum_{j=1}^k z_{ij} \right) - \sum_{j=1}^k \left(\sum_{i=1}^s z_{ij} \right) \ln \left(\sum_{i=1}^s z_{ij} \right) + \sum_{j=1}^k \left(\sum_{i=1}^s z_{ij} \right) \ln \left(\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^s z_{ij} \right) \right)$$

где k — число столбцов в многопольной таблице, s — число строк в этой же таблице, z_{ij} — дискретное число в многопольной таблице, \ln — натуральный логарифм, n — общее число растений в опыте.

Результаты исследований. В табл. 1 представлены данные о числе побегов первого порядка, образуемых контрольными (поколение A_1) и опытными (поколение A_1Az_1) растениями. Для сравнения случайным образом было выбрано по 20 растений в каждом варианте. Среднее число побегов первого порядка в контроле составило 3,1, тогда как в опыте 5,1, т.е. в среднем у опытных растений формировалось на два побега больше, чем в контроле. Статистическая оценка распределения числа ветвей первого порядка показывает, что различие между контрольными и опытными растениями статистически высоко достоверно ($G = 19,62$, $df = 6$, $P > 0,99$).

Таблица 1

Распределение растений по числу побегов первого порядка

Варианты	Число побегов первого порядка							Итого растений
	1	3	4	5	6	8	9	
Поколение A_1	8	3	3	5	0	1	0	20
Поколение A_1Az_1	3	4	0	2	6	4	1	20
Итого	11	7	3	7	6	5	1	40

Таблица 2

Распределение растений по числу побегов второго порядка

Варианты	Число побегов второго порядка								Итого растений
	6—15	16—25	26—35	36—45	46—55	56—65	66—75	76—85	
Поколение A_1	1	5	8	3	0	2	0	1	20
Поколение A_1Az_1	0	5	5	8	1	1	0	0	20
Итого	1	10	13	11	1	3	0	1	40

Таблица 3

Распределение растений по числу побегов третьего порядка

Варианты	Число побегов третьего порядка								Итого растений
	< 54	< 104	< 154	< 204	< 254	< 304	< 354	< 836	
Поколение A_1	11	8	1	0	0	0	0	0	20
Поколение A_1Az_1	0	4	3	2	4	2	1	4	20
Итого	11	12	4	2	4	2	1	4	40

В табл. 2 показано распределение числа побегов второго порядка у опытных и контрольных растений. Среднее число побегов второго порядка в контроле составило 29 штук на растение, в опыте — 34,5. Различие между контрольными и опытными растениями статистически недостоверно ($G = 7,56$, $df = 7$, $P < 0,70$; критическое значение G равно 14,1).

Особенно существенными оказались различия между опытными и контрольными растениями по числу побегов третьего порядка (табл. 3). У контрольных растений число побегов третьего порядка варьировало от 5 до 128 на растение (в среднем 52), тогда как у опытных растений от 89 до 836 на растение (в среднем 295). Для удобства представления данных наблюдения в табл. 3 взят классовый промежуток размером 50 ветвей, а в последней вертикальной строке объединены четыре растения, имеющие более 355 ветвей третьего порядка на растение. Среднее число побегов третьего порядка у эпимутантных растений (поколение A_1Az_1) возросло по сравнению с контрольными растениями (поколение A_1) более чем в 5,5 раза. Различие между вариантами статистически высокодостоверно ($G = 35,68$, $df = 7$, $P > 0,999$).

Обсуждение полученных данных. Как следует из представленных материалов (табл. 1 и 3), различия между опытными и контрольными растениями касаются в основном различий в

числе цветоносных побегов первого и третьего порядков. Число побегов второго порядка у опытных и контрольных растений оказалось примерно одинаковым. Другим наблюдением, вытекающим из эксперимента, является то, что опытные растения (поколение A_1Az_1) воспроизводят эпимутантный фенотип родительского растения, возникшего в год обработки эпимутагеном (поколение A_0Az_0). На цветоносных побегах эпимутантов закладывается множество дополнительных ветвей третьего порядка, что полностью меняет архитектуру растений сахарной свеклы (поколение A_1Az_1) (рис. 3 и 4). Как отмечено во введении, побеги первого порядка закладываются в пазухах листьев прикорневой розетки, а ветви второго порядка закладываются в пазухах листьев главного стебля. В отличие от ветвей первого и второго порядка побеги третьего порядка закладываются в пазухах прицветников, радикально меняя метамеризацию цветоносного побега (рис. 4). В норме в пазухах прицветников должны закладываться отдельные цветки или цветочные кластеры — соцветия-клубочки [2]. Увеличение числа побегов третьего порядка происходит путем замены цветочных почек ветвями третьего порядка. Этот метаморфоз меняет процесс метамеризации. Практически все метамеры, формирующиеся на ветвях третьего порядка, имеют одиночные цветки. Более того, меняется и сам тип метамеров на этих ветвях: новые цветки за-

ладываются без закладки прицветников. Изменения метамеризации цветоносных побегов позволяют регулировать и фенотипы растений сахарной свеклы в сторону увеличения доли растения РЦ фенотипа, а также снижение доли растений СЦ фенотипа [13].

«Как правило, существует обратная зависимость между степенью метилирования генов или соответствующих регуляторных областей генома и экспрессией генов. Иными словами, для экспрессии многих генов необходимо, чтобы они были полностью или частично деметилированы. В норме эти процессы у растений, как и сама клеточная дифференцировка, эффективно контролируются фитогормонами» [5]. Таким образом, 5-азациитидин, изменяя паттерн метилирования генома у свеклы, меняет активность многих генных локусов, участвующих в процессе морфогенеза растений [8]. В частности, в настоящем эксперименте показаны изменения архитектоники у эпимутантных растений сахарной свеклы за счет замены цветковых почек на ветвях второго порядка боковыми почками, из которых формируются ветви третьего порядка. Возникающие под влиянием эпимутагена изменения наследуются в дочернем поколении при апоzigотической репродукции растений.

Работа частично финансировалась грантом РФФИ 04-04-48176а.

SUMMARY. An influence of epimutagen 5-azacytidine on a flower stalk morphogenesis in sugar beet was studied. After the epimutagen treatment the great number of the first- and the third-order branch formation was observed. A higher level of branching completely modified the flower stalk architectonics (generations A_0Az_0 and A_1Az_1). A number of the second-order branches in the control and the experimental plants were not distinguished. A new epiphenotype with higher level of branching (generation A_0Az_0) inherited in daughter generation A_1Az_1 . A flower stalk architectonics was modified because the third-order branches developed in the bract axil instead of flower primordium. A great number of lateral shoot modified a metamer organization of the flower stalk. The metamers on the third-order branches were single-flowered.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Табеницкий А.А., Табеницкий А.А. Анатомия и морфология сахарной свеклы // Биология и селекция сахарной свеклы. — М.: Колос, 1968. — С. 69—136.
2. Табеницкий А.А. Анатомия сахарной свеклы // Свекловодство. — Киев: Госсельхозиздат, 1940. — С. 89.
3. Малецкий С.И. О терминологии и классификации растений по признаку одно-многоветковости // Одноветковость свеклы. Эмбриология, генетика, эмбриология. — Новосибирск, 1988. — С. 5—12.
4. Ванюшин Б.Ф. Энзиматическое метилирование ДНК — эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия — 2005. — 70, № 5. — С. 598—611.
5. Ванюшин Б.Ф., Севастьянов С.С., Киринос М.Д., Саудова Н.С. Увеличение белковости зерновок пшеницы под влиянием 5-азациитидина — ингибитора метилирования ДНК // Изв. АН СССР. Сер. биол. — 1990. — 1. — С. 75—83.
6. Сингер М., Берг П. Метилирование ДНК // Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 2. — С. 140—148.
7. Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками: Дис. ... канд. биол. наук. — СПб, 2004.
8. Maletskaya E.I., Yudanov S.S., Maletskii S.I. Epigenetic and epiplastome variability in apozygotic progenies of sugar beet with 5-azacytidine // Sugar Tech. — 2002. — 4, №1/2. — P. 52—56.
9. Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Эпипластомная изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы // Генетика. — 2004. — 40, № 7. — С. 930—939.
10. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. — 1996. — 32, № 12. — С. 1643—1650.
11. Малецкий С.И. Биномиальные распределения в генетических исследованиях на растениях. — Новосибирск, 2000. — 126 с.
12. Weber E. Test zum Prüfen der Unabhängigkeit diskreter Zufallsgrößen // Grundriss der Biologischen Statistik. — Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1986. — P. 200—219.
13. Малецкий С.И. Эпигенетическое наследование признака раздельно-, сростноцветковости у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Эпигенетика растений. — Новосибирск, 2005. — С. 195—207.

Поступила 07.09.05