

Эпигенетика растений

УДК 633.63:575.155:[575.11+575.13

doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.579rus

ЭПИГЕНОМНАЯ И ЭПИПЛАСТОМНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*Beta vulgaris* L.)*

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

Понятие репродукции (воспроизведение новых клеток, особей, популяций) — одно из центральных в биологии. Этому процессу присущи такие свойства, как наследственность и изменчивость. Наследственность указывает на идентичность родителей и потомков, изменчивость — на неполноту этой идентичности. Между плоидностью генома, объемом цитоплазмы и линейными размерами клеток существует прямая пропорциональная зависимость (ядерно-плазменные отношения). Вариация числа хромосом или хроматид в ядрах клеток определяет эпигеномную изменчивость, а вариация чисел внутриклеточных органелл в клетке (например, хлоропластов) — эпипластомную изменчивость у растений. Связь числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц с плоидностью ядер у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) хорошо известна, что позволяет сравнивать эпипластомную изменчивость у растений с разной плоидностью геномов. Вариация числа хлоропластов в клетках отчасти связана с асимметричным типом распределения органелл при цитокинезе. Однако эпипластомная изменчивость обязана не только случайному распределению органелл при цитокинезе, но и варьированию числа геномов на ядро клетки (эпигеномная изменчивость). Эндोगаплоидия, появление клеток с одинарным набором хромосом в ядрах, — одно из проявлений эпигенетической изменчивости. У сахарной свеклы семена с гаплоидным набором хромосом могут возникать спонтанно как при двуродительском, так и при однородительском способах воспроизводства. В качестве материала в настоящей работе мы использовали семена диплоидных мужско-стерильных гибридов сахарной свеклы Роксана, Ленора, Ирис (контроль, поколение A_0), а также их дигаплоидные и гаплоидные апозиготические семенные потомства (поколение A_1). Работа проводилась в 2009–2012 годах на экспериментальном поле в г. Новосибирске. Дигаплоиды и гаплоиды получали при партеногенетическом воспроизводстве семян (беспыльцевой режим). Корни высаживали на изолированном участке и в период цветения у каждого растения определяли фенотипы пыльников и пыльцевых зерен. В статье рассматривается изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и интегральные показатели ткани, которые сравниваются с гармоническими пропорциями (числа Фибоначчи, золотые пропорции). Оценивали число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и число пластотипов в эпидермальной ткани. Определяли среднее значение числа хлоропластов (M) и пластотипов (Pt) в замыкающих клетках устьиц у гаплоидных, дигаплоидных и диплоидных (контроль) растений. На основании полученных данных определяли коэффициенты эпигеномной стабильности (показатель D). D — логарифмическое отношение числа хлоропластов к числу пластотипов, характеризующее физиологическую и эпипластомную стабильность клеточных популяций. У дигаплоидов этот показатель всегда был выше, чем у гаплоидов. Впервые показано, что интегральные показатели ткани (D) соответствуют гармоническим пропорциям (биологическим инвариантам) — числам, обозначаемым в математике как ρ -числа, или числа Фибоначчи, которым соответствуют золотые ρ -пропорции. У диплоидов и дигаплоидов этот показатель соответствовал первым членам гармонической последовательности (с 1-го до 5-го), у гаплоидов — членам гармонической последовательности от 8-го и более.

Ключевые слова: апозиготия, гаплоидия, дигаплоидия, изменчивость, гармонические пропорции, фракталы, эндополиплоидия, эпигенетика.

Одно из центральных понятий биологии — репродукция, то есть воспроизведение во времени новых клеток, особей, популяций. Этому процессу, в свою очередь, присущи такие свойства, как наследственность и изменчивость. Наследственность — биогенетическая идентичность родителей и потомков, сходство клеток и индивидов в ряду поколений воспроизводства (1). Изменчивость указывает на неполноту этой идентичности. Различают два типа изменчивости — наследственную, связанную с мутациями и эпимутациями в геномах, и ненаследственную (модификационную, или паратипическую), вызываемую воздействиями на биогеenez внешней или внут-

* Работа выполнена за счет бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН.

ренной среды. Наследственность на клеточном уровне представляет собой свойство внутриклеточных элементов обеспечить структурное и функциональное сходство (симметрию) в смежных поколениях, что определяется репродукционными процессами: в ядрах и цитоплазме клеток самоудваиваются молекулы ДНК, хроматиды и хромосомы, субклеточные органеллы (хлоропласты и митохондрии). По завершении самоудвоения происходит деление ядра и хромосом с помощью внутриклеточного веретена (кариокinesis, митоз), а также образование перегородки внутри клетки и последующее обособление дочерних клеток (цитокinesis). Дочерние ядра, возникшие в процессе кариокinesis, обычно оказываются копиями материнских, тогда как точного распределения органелл между дочерними клетками не существует.

При митотических делениях межклеточная изменчивость не возникает, а потому при изложении менделевской парадигмы наследования дочерние клетки считают клонами родительских (2). Основными источниками межклеточной изменчивости в тканях принято считать случайные замены нуклеотидов в молекулах ДНК (мутации генов) и реципрокные или нереципрокные обмены (рекомбинации) гомологичных хромосом в мейозе. Эти базовые представления положены в основу геноцентрической парадигмы (ГЦП) наследования и связывают изменчивость признаков и структуру хромосом, но распространяются не на все группы признаков (3).

Различают дискретные (качественные) и континуальные (количественные) признаки. К дискретным относят альтернативные признаки, изменчивость которых, как правило, обусловлена мутациями в генах ядра или цитоплазмы, и счетные (число цветков, семян и плодов на растениях и др.), изменчивость которых напрямую не связана с активностью генов. Их изменчивость определяется сигналами, получаемыми растениями из внешней среды (условия произрастания, плотность размещения растений в фитоценозе и т.д.). Четкое описание наследования континуальных признаков в рамках ГЦП весьма затруднительно, поэтому декларируется их полигенная детерминация.

Эпигенетическая парадигма (ЭПП) наследования не связывает клеточную и индивидуальную изменчивость исключительно с изменениями в нуклеотидных последовательностях молекул ДНК, структурой хромосом и рекомбинацией хромосом в мейозе (3, 4). Изменчивость в клеточных популяциях может возникать благодаря непостоянству числа хромосом (миксоплоидия) или непостоянству массы ДНК в ядрах. Миксоплоидия у растений была открыта в 1910 году, а в 1935 году это явление обнаружено у представителей семейства маревых (*Chenopodiaceae*), к которому относится свекла.

Другой механизм внутриклеточной изменчивости — вариация числа хроматид в хромосомах, когда наряду с монохроматидными хромосомами в соматических клетках встречаются дупло- и квадруплохромосомы. Вариация массы ДНК, числа хромосом или хроматид — весьма распространенный механизм эпигеномной и эпигенетической изменчивости у растений (5-7). Между плоидностью генома, объемом цитоплазмы и линейными размерами клеток существует прямая пропорциональная зависимость (ядерно-плазменные отношения). Непостоянство массы ДНК в соматических клетках находит подтверждение при проведении цитометрических измерений (8-14).

Вариабельность клеток по числу внутриклеточных органелл в эпидерме отчасти связана с эндополиплоидией — «спонтанными» изменениями числа хромосом или хроматид в ядрах диплоидных клеток пропорционально числу прошедших эндомитозов (6, 15). Эндополиплоидия не затрагивает последовательности нуклеотидов в ДНК и структуру хромосом, она возникает при репликации ДНК в ядрах клеток, когда увеличение массы ДНК не сопровождается делением ядер. Эти процессы ведут к непостоянст-

ву массы ДНК в клеточных популяциях — основному источнику клеточной и тканевой изменчивости у растений (6-13). Кроме того, следует отметить, что и первые исследователи, и современные ученые подтверждают широкую распространенность этого явления в семействе *Chenopodiaceae* (10-14).

Один из вариантов эпигеномной изменчивости соматических клеток — эндогаплоидия (возникновение клеток с одинарным набором хромосом в ядрах). Гаплоидия — эффективный экспериментальный метод гомозиготизации геномов. У сахарной свеклы семена с гаплоидным набором хромосом могут возникать спонтанно как при двуродительском, так и при однородительском воспроизводстве. Частота гаплоидных проростков в первом случае составляет 10^{-4} - 10^{-6} , во втором — $0,5 \times 10^1$ (16, 17).

В рамках ЭГП можно выделить особую группу признаков — фрактальные (или геометрические), присущие объекту (клетке или растению) как целому. К ним, в частности, относятся структура сосудистых систем (ксилема и флоэма), структура корневой системы (18), а также эмбриональные и тканевые признаки. С математической точки зрения дискретные, континуальные и фрактальные признаки четко различимы между собой геометрической размерностью (D). Если размерность дискретных и континуальных признаков выражается целыми числами (одно-, двух- или трехмерные признаки), то фрактальным признакам присуща дробная размерность (18).

Вариации числа хроматид и хромосом оказывают прямое влияние на их распределение в мейозе и, как следствие, на характер расщепления признаков в потомствах (3, 17). Кроме того, увеличение массы ДНК в клеточных ядрах у растений влияет на размеры клеток и число органелл (хлоропластов) в цитоплазме (19). Хлоропласты — внутриклеточные органеллы с собственным геномом, число которых на клетку в разных тканях растения может варьировать от нескольких штук до сотен. До начала деления клетки хлоропласты самоудваиваются и предполагается, что дочерние клетки должны получить столько же органелл, сколько их имела материнская клетка. Если бы в дочерних клетках в ряду клеточных поколений органеллы всегда распределялись строго поровну, то в каждой клетке растения содержалось бы ровно столько органелл, сколько их имела инициальная (зиготическая) клетка, чего никогда не наблюдается. Распределение органелл при цитокинезе носит асимметричный характер. Эпипластомная изменчивость обязана не только случайному распределению органелл при цитокинезе, но и варьированию массы ДНК и числу геномов на ядро клетки (эпигеномная изменчивость): размеры ядра, объем цитоплазмы и число органелл находятся в прямо пропорциональной зависимости.

Связь числа хлоропластов с плоидностью ядер и размерами клеток хорошо известна у сахарной свеклы. Так, в исследованиях по получению полиплоидных форм свеклы был обнаружен удобный непрямой метод классификации растений по плоидности клеточных ядер: у три- и тетраплоидов в замыкающих клетках устьиц содержится достоверно большее число хлоропластов (соответственно от 17 до 22 и от 22 до 28), чем у диплоидов (от 12 до 16). Это методическое наблюдение позволило сопоставить эпипластомную изменчивость у растений с разной плоидностью геномов (гаплоиды, дигаплоиды, триплоиды, тетраплоиды и т.д.).

В настоящей работе при сравнении интегральных показателей ткани (соотношение степени ее изменчивости и среднего числа органелл) впервые показано их соответствие гармоническим пропорциям (биологическим инвариантам) — числам, обозначаемым как ρ -числа, или числа Фибоначчи, которым, в свою очередь, соответствуют золотые ρ -пропорции.

Нашей целью был экспериментальный анализ изменчивости числа

хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидных, дигаплоидных и диплоидных растений сахарной свеклы.

Методика. В качестве материала использовали семена диплоидных мужско-стерильных (мс) гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) Роксана, Ленора, Ирис (поколение F₁, или A₀), а также их дигаплоидные и гаплоидные апозиготические семенные потомства (поколение A₁). Работа проводилась в течение 4 лет (2009-2012 годы) на экспериментальном поле (г. Новосибирск). Для получения апозиготических семенных потомств (апозиготией называется партеногенетическое развитие эмбриона из апозиготы — неоплодотворенных клеток зародышевого мешка) корни высаживали на изолированном участке и в период цветения у каждого растения определяли фенотипы пыльников и пыльцевых зерен. Растения с фенотипом мсП (полудфертильные) удаляли с поля (19), и для апозиготического воспроизводства семян оставляли только растения, цветки которых имели фенотипы мс0 (полная пыльцевая стерильность) и мсI (пыльцевая полустерильность).

От каждого из трех семенных потомств (поколение A₁) мс-гибридов были взяты выборки плодов, которые промывали в течение 2 сут в проточной воде, помещали в термостат при 25 °С, и через 2 сут после начала роста все проростки просматривали и делили на две группы — гаплоидные и дигаплоидные. Деление осуществляли по морфобиологическим признакам (метод выделения гаплоидов *in vivo*) (16, 20). Проростки высаживали в индивидуальные сосуды в климатической камере Биотрон-4 (Россия) с регулируемой влажностью, температурой и освещением, где они оставались в течение первых 100 сут жизни. В дальнейшем гаплоиды и дигаплоиды помещали в холодную камеру (t = 4 °С) для прохождения яровизации и высаживали в поле.

Подсчет числа хлоропластов в эпидермальных клетках проводили на листьях свеклы 1-го года жизни. Выбирали листья среднего размера, эпидерму снимали с нижней стороны листа. Для окрашивания хлоропластов на снятую эпидерму наносили каплю раствора азотнокислого серебра (AgNO₃). Определяли число хлоропластов в каждой из 50 клеток эпидермы, подсчитывали число пластотипов (Pt) в ткани и среднее число хлоропластов (M) в клетках. Эпидермальную ткань листа описывали двумя параметрами — M и Pt, используя пропорцию M:Pt. Среднее число органелл в клетках и число пластотипов в клеточной популяции связаны формулой $M = Pt^D$. На этом основании интегральный параметр эпидермальной ткани D (фрактальная размерность) (18) рассчитывали по формуле $D = \ln M / \ln Pt$.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики (21). По каждому растению находили дисперсию распределения (σ^2), среднее арифметическое число органелл на клетку (выборка 50 клеток от каждого листа) и ошибку среднего арифметического ($M \pm m$), а также подсчитывали среднее взвешенное $M_{взв.}$ по выборке и рассчитывали коэффициент вариации (Cv) по формуле:

$$Cv = \frac{100\sigma}{M} \times 100 \%$$

Кроме того, в листовых выборках по каждому образцу свеклы находили среднее число пластотипов и его ошибку ($Pt \pm m$). Коэффициент линейной корреляции (r) подсчитывали по формуле:

$$r = \frac{\sum a_x a_y}{n \sigma_x \sigma_y},$$

где a_x и a_y — отклонения вариант от среднего арифметического, n — объем выборки, σ — среднеквадратическое отклонение.

С помощью критерия согласия G осуществляли статистическую

оценку многопольных таблиц, сравнивая выборочные распределения с нуль-гипотезой. Величину критерия G находили по формуле:

$$G = 2 \left(\sum_i f_i \ln \frac{f_i}{f_i'} \right) = 2 \sum_i f_i (\ln f_i - \ln f_i'),$$

где f_i и f_i' — соответственно эмпирические и теоретические частоты конкретных распределений по исследуемому признаку (21).



Рис. 1. Диплоидный (слева) и гаплоидный (справа) проростки сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.).

Апозиготические семенные потомства, как правило, имеют диплоидное (дигаплоидное) число хромосом в клетках, поскольку возникают из эндотетраплоидных клеток археспория. Наряду с дигаплоидными часть семян, воспроизводимых апозиготически, — гаплоидные (16, 17). Гаплоидные проростки в 4 раза короче и имеют вдвое меньший диаметр, чем сестринские дигаплоидные (рис. 1).



Рис. 2. Хлоропласты в замыкающих клетках устьиц (эпидермальная ткань листа сахарной свеклы *Beta vulgaris* L.).

Результаты. Растениям свеклы присуща мультивидуальная изменчивость: цветки, расположенные на центральном побеге, могут иметь один фенотип пыльников, на боковых побегах — другой (22). Различают три фенотипа цветков по пыльникам и пыльцевым зернам: мс0 — полная пыльцевая стерильность (полностью дефектные пыльники и пыльцевые зерна); мсI — пыльцевая полустерильность (однойядерная пыльца, не способная к прорастанию); мсII — полуфертильный (часть пыльцевых зерен жизнеспособна). Мы получали семена только тех растений, цветки которых имели фенотипы мс0 и мсI.

Апозиготические семенные потомства, как правило, имеют диплоидное (дигаплоидное) число хромосом в клетках, поскольку возникают из эндотетраплоидных клеток археспория. Наряду с дигаплоидными часть семян, воспроизводимых апозиготически, — гаплоидные (16, 17). Гаплоидные проростки в 4 раза короче и имеют вдвое меньший диаметр, чем сестринские дигаплоидные (рис. 1).

Число хлоропластов в отдельной клетке эпидермы листа мы обозначили термином «пластотип» — Pt (plastotype). В ткани эпидермы встречалось несколько пластотипов, отличавшихся друг от друга по числу хлоропластов в цитоплазме (рис. 2). В отличие от числа хлоропластов, число пластотипов — это интегральный признак, присущий отдельному листу (отдельному растению). Соотношение среднего числа хлоропластов (M) в клетках и числа пластотипов (Pt) ткани стохастически изменяется в процессе онтогенеза растения и соответствует обобщенному принципу формирования гармонических пропорций (23, 24). Как показали наши более ранние наблюдения, эта пропорция неодинакова у гибридных и инбредных растений (16).

Средние значения числа хлоропластов (средневзвешенные) у мс-гибридов Роксана и Ленора (поколение A_0) оказались примерно одинаковы — соответственно $12,79 \pm 0,35$ и $13,12 \pm 0,42$. У мс-гибрида Ирис клетки были крупнее и содержали около 15 хлоропластов ($14,92 \pm 0,53$), что достоверно превышало аналогичные значения у двух других гибридов: t -критерий соответственно 2,87 и 2,69 ($P > 0,95$). Средние значения числа пластотипов у всех трех мс-гибридов в эпидермальной ткани (поколение A_0) были статистически неразличимы ($7,2 \pm 0,35$; $6,5 \pm 0,41$; $7,3 \pm 0,54$) (табл. 1).

У дигаплоидных потомков (поколение A_1) число хлоропластов и пластотипов во всех вариантах достоверно не изменялось по сравнению с родительскими мс-гибридами (поколение A_0) (см. табл. 1). Следовательно, апозиготическое воспроизводство семян не оказывало влияния на эти по-

казатели в замыкающих клетках устьиц у дигаплоидов.

1. Число хлоропластов и пластотипов в эпидермальной ткани листа у диплоидных (поколение A_0), дигаплоидных (поколение A_1) и гаплоидных (поколение A_1) растений трех мужско-стерильных гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Плоидность	Поколение репродукции	Число растений	Число хлоропластов		Cv, %*	Число пластотипов		D _{ср.} (min-max)
			$M_{взв} \pm m$	min-max		Pt $\pm m$	min-max	
Г и б р и д Р о к с а н а								
Диплоиды	A_0	10	12,79 \pm 0,35	11,1-14,9	12,35	7,2 \pm 0,35	6-10	1,30 (1,18-1,44)
Дигаплоиды	A_1	10	13,16 \pm 0,41	11,3-15,6	14,69	8,2 \pm 0,47	7-10	1,24 (1,07-1,47)
Гаплоиды	A_1	55	12,32 \pm 0,30	10,3-16,0	17,43	8,8 \pm 0,17	6-12	1,16 (1,04-1,37)
Г и б р и д Л е н о р а								
Диплоиды	A_0	11	13,12 \pm 0,42	10,8-15,4	13,05	6,5 \pm 0,41	5-9	1,40 (1,19-1,70)
Дигаплоиды	A_1	15	14,22 \pm 0,41	13,1-15,5	9,50	7,2 \pm 0,45	5-10	1,50 (1,19-1,69)
Гаплоиды	A_1	38	11,85 \pm 0,35	9,4-19,2	17,96	8,8 \pm 0,31	6-12	1,16 (1,03-1,31)
Г и б р и д И р и с								
Диплоиды	A_0	10	14,92 \pm 0,53	13,9-17,5	10,89	7,3 \pm 0,54	5-9	1,39 (1,15-1,64)
Дигаплоиды	A_1	12	14,54 \pm 0,40	12,0-17,1	8,33	6,2 \pm 0,33	5-7	1,51 (1,39-1,70)
Гаплоиды	A_1	40	12,27 \pm 0,31	10,4-18,0	15,69	8,7 \pm 0,22	6-12	1,17 (1,04-1,46)

Примечание. $M_{взв} \pm m$ — среднее взвешенное и ошибка среднего для числа хлоропластов, Pt $\pm m$ — среднее значение и ошибка среднего для числа пластотипов, min-max — максимальное-минимальное значения, Cv — коэффициент вариации, D — эпигенотипная стабильность.
* Средневзвешенное значение.

У гаплоидов Ленора и Ирис среднее число хлоропластов было достоверно ниже, чем у растений родительского поколения (A_0) и сестринских дигаплоидных растений (поколение A_1). Только у мс-гибрида Роксана число хлоропластов у диплоидов, дигаплоидов и гаплоидов достоверно не различалось (соответственно 12,79; 13,16 и 12,32). Также у гаплоидов выявили наибольшую изменчивость по числу пластотипов. Если у диплоидных и дигаплоидных растений оно варьировало от 5 до 10, то у гаплоидов — от 6 до 12. Средние значения этого показателя у гаплоидов для всех трех гибридов оказались практически одинаковы (8,7-8,8) и достоверно выше, чем у диплоидов (7,2-7,3) или у дигаплоидов Ленора и Ирис (6,2-7,2). У гибрида Роксана разница между дигаплоидами и гаплоидами была недостоверна (8,2 и 8,8).

D (фрактальная размерность) соответствует эпигенотипной и эпипластомной пластичности (нестабильности) клеток в ткани листа: величина D оценивает изменчивость клеточной популяции по числу хлоропластов на клетку и числу пластотипов в ткани. По показателю эпигенотипной стабильности D наиболее существенные различия наблюдались между диплоидными и гаплоидными растениями (см. табл. 1). Диапазон величин D у диплоидов (1,30-1,40) и дигаплоидов (1,24-1,51) перекрывался, то есть однократное партеногенетическое размножение не оказало выраженного влияния и на этот параметр. Между тем, у гаплоидов значения D (1,16-1,17) были существенно ниже, чем у диплоидов и дигаплоидов. Их перекрывания с другими вариантами не наблюдалось, и они были близки к показателям, ранее установленным для инбредных линий сахарной свеклы (15).

2. Распределение растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) по геномной стабильности (D) в клеточных популяциях гаплоидов, выделенных из трех мужско-стерильных гибридов (поколение A_1)

Группа	Гибрид			Всего растений
	Ленора A_1	Ирис A_1	Роксана A_1	
1,01-1,10	13	9	20	42
1,11-1,20	14	21	21	56
1,21-1,30	9	8	8	25
1,31-1,40	1	1	6	8
1,41-1,50	1	1	-	2
Всего растений	38	40	55	133

В таблице 2 приведено распределение параметра D в трех популя-

циях гаплоидов (133 растения). Наиболее часто величина D варьировала в интервале 1,11-1,20, и лишь у небольшой части растений она была выше или равна таковой у диплоидов. Сравнивая распределение величины D в трех выборках гаплоидов, мы вычислили критерий согласия G . Его значение оказалось равным 13,6 ($df = 12$; $0,50 < P < 0,30$), что свидетельствовало о случайном характере распределения показателя D у гаплоидных растений в трех выборках (табл. 3). Это позволило объединить и сравнивать распределение D у гаплоидных растений, диплоидов и дигаплоидов.

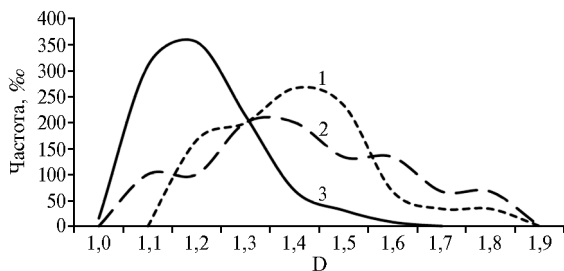


Рис. 3. Распределение эпигеномной стабильности (D) у диплоидных (1), дигаплоидных (2) и гаплоидных (3) растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.).

Заменяя число диплоидных, дигаплоидных и гаплоидных растений частотами, обозначенными в промилле, мы составили график распределения параметра D по объединенной выборке по всем гибридам. У диплоидов и дигаплоидов диапазон вариации был примерно одинаковым, тогда как у гаплоидов он существенно отличался от диплоидных аналогов и показывал большую цитологическую однородность (рис. 3). Средние значения параметра D у трех гаплоидных выборок были идентичны (1,16-1,17), отличаясь от значений этого параметра у их дигаплоидных аналогов, хотя гаплоиды и дигаплоиды были выделены из одних и тех же семенных потомств (см. табл. 3).

3. Статистические параметры клеточных популяций в эпидермисе листа у гаплоидных и дигаплоидных растений мужско-стерильных гибридов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) (поколение A_1)

Гибрид	N	$M \pm m$	$Cv, \%$	$Pt \pm m$	D	$r_{D/Cv}$
Гаплоиды						
Ирис	40	12,27±0,31	15,69	8,7±0,22	1,17	-0,77±0,07
Ленора	38	11,85±0,35	17,96	8,8±0,31	1,16	-0,87±0,04
Роксана	55	12,32±0,30	17,43	8,8±0,17	1,16	-0,86±0,03
Дигаплоиды						
Ирис	12	14,54±0,40	8,33	6,2±0,33	1,51	-0,50
Ленора	15	14,22±0,41	9,22	7,2±0,45	1,50	-0,82
Роксана	10	13,16±0,41	14,69	8,2±0,47	1,24	-0,93

Примечание. N — число растений, $M \pm m$ — среднее и ошибка среднего для числа хлоропластов, Cv — коэффициент вариации, $Pt \pm m$ — среднее значение и ошибка среднего для числа пластотипов, D — эпигеномная стабильность, $r_{D/Cv}$ — коэффициент линейной корреляции.

В таблице 3 приведены сводные статистические данные по гаплоидным и дигаплоидным растениям трех мс-гибридов. Как видно, коэффициент вариации (Cv), оценивающий изменчивость клеток по числу хлоропластов, и коэффициент эпигеномной стабильности клеточной популяции (D) имели отрицательную связь: коэффициент линейной корреляции в ряде случаев был близок к единице (от -0,77 до -0,93).

Полиплоидия широко распространена у растений и порождает различные формы внутри- и межвидовой изменчивости (9). Пример межвидовой изменчивости — полиплоидные ряды видов, встречающиеся во множестве ботанических родов и семейств. С полиплоидией связаны и различные формы индивидуальной изменчивости, широко используемой в селекционной практике (18, 19). Один из вариантов изменчивости — миксоплоидия в клеточных популяциях, когда наряду с доминирующей фракцией встречаются клетки с числом хромосом, меньшим или большим их основного числа (5-7, 10).

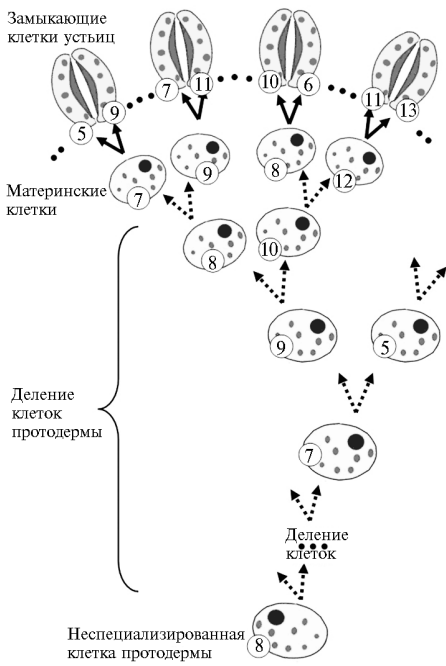


Рис. 4. Схема формирования генеалогического дерева замыкающих клеток устьиц (цитофрактал) в структуре эпидермальной ткани листа (цифрами обозначено число хлоропластов в клетке).

Изменчивость числа хлоропластов и пластотипов в эпидермальной ткани свеклы отражает эпигеномную и эпипластомную нестабильность клеток в процессе онтогенеза. При делении одна из клеток протодермы становится материнской, образуя две дочерние клетки, которые в дальнейшем развиваются как замыкающие, фиксируя свойства родительских (протодермальных) клеток: их линейные размеры, ploидность ядер и число органелл в цитоплазме (19).

Фракталы позволяют моделировать различные биологические процессы (25, 26). С математической точки зрения фракталом называется множество, для которого размерность Хусдорфа-Базикевича строго больше его топологической размерности (18). В евклидовой геометрии размерность — это число координат в пространстве, определяющих положения точки (одно-, двух- и трехмерные объекты). Размерность фракталов (D) определяется дробными числами, что служит атри-

бутивным признаком любых фракталов.

Клетки эпидермальной ткани можно уподобить древовидному фракталу (24). Ткань зеленого растения представлена множеством клеток с одинаковым или неодинаковым числом органелл. Ее можно сравнить с «генеалогическим деревом», начало которому положила примордиальная клетка с определенным числом пластид в цитоплазме. Каждая клетка растет и со временем делится на две дочерние. Множество клеток одной ткани представляют геометрическую структуру (рис. 4), или «пластидный фрактал» (15). При формировании генеалогического дерева клеток (см. рис. 4) реализуется одна и та же итерационная процедура: клетки делятся на две дочерние с равным или не равным числом пластид в них. После некоторого числа делений (поколений) возникает ткань — множество клеток с различным числом хлоропластов. Изменчивость в популяции клеток определяется ploидностью генома и способом воспроизводства семян (оплодотворением или партеногенезом) (10).

Как следует из данных таблицы 1, изменчивости числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сопутствует эпигеномная нестабильность клеточных ядер у гаплоидов, которая, в свою очередь, коррелирует с гомозиготностью геномов самоопыленных потомств. Ранее мы отмечали, что у инбредных растений свеклы наблюдается довольно существенное увеличение как среднего числа органелл в замыкающих клетках устьиц (8), так и среднего числа пластотипов в эпидерме листа (16). Пропорция $M:P_t$ позволяет связать признаки двух уровней: тканевого (среднее значение числа хлоропластов на клетку) и индивидуального (среднее число пластотипов на ткань), то есть эта пропорция представляет собой новый геометрический признак, присущий эпидермальной ткани листа (растения) как целому.

Изменения цитологических переменных в эпидермальной ткани у инбредных форм свеклы приводит к снижению величины D (фрактальной размерности), если сравнивать ее у инбредных и гибридных растений. Дру-

гими словами, инбредным линиям свеклы присуща более высокая степень эпигеномной изменчивости (нестабильности), чем гибридам. Наименьшее значение для величины эпигеномной стабильности отмечено у инбредных растений, наибольшее — у гибридных мс-растений.

Моногенность клеточных ядер у гаплоидов ведет к повышению миксоплоидности клеток (эндополиплоидизация), что влияет на число хлоропластов в них (8, 15). Наличие большего числа пластотипов в эпидермальной ткани у гаплоидов, чем у дигаплоидов, свидетельствует о более высокой нестабильности гаплоидных геномов. Показатели D у гаплоидов Ленора и Роксана оказались полностью идентичными и равными 1,16, у гаплоидов Ирис — равными 1,17. Значения D у гаплоидов были существенно ниже, чем у сестринских дигаплоидных растений (A_1) и диплоидных мс-гибридов (A_0). Во всех трех популяциях гаплоидов величина D фактически представляла собой инвариант, который существенно отличался от инвариантных значений D у диплоидных и дигаплоидных растений.

Изменчивость числа хлоропластов в эпидермальных клетках связана с вариацией объемов клеточных ядер, определяемой тканевой эндополиплоидией. Природа высокой миксоплоидии у инбредных линий очевидна — это различного типа отклонения при клеточных делениях, ведущие не только к росту доли миксоплоидии в популяциях соматических клеток, но и к изменчивости числа органелл в цитоплазме (эпипластомная изменчивость). При нарушении механизмов митоза в клеточных популяциях могут возникать как эндополиплоидные клетки (редупликация хромосом не сопровождалась кариокинезом), так и эндогаплоидные (кариокинезу не предшествовала редупликация хромосом). В популяциях меристем наряду с диплоидными клетками встречаются клетки с триплоидным или тетраплоидным числом хромосом в ядрах, а также клетки с другой ploidy (5-8). То есть на уровне клеточных популяций реализуется эпигеномная изменчивость (число геномов в клеточных ядрах), определяющая и эпипластомную изменчивость клеток.

В наших экспериментах значения коэффициентов вариации (Cv) у гаплоидных растений были выше, чем у дигаплоидных и диплоидных. Коэффициент вариации не связан напрямую с активностью отдельных генов, генных блоков или условиями произрастания, а определяется всей совокупностью внутриклеточных генетических и физиолого-биохимических процессов в клетках. Следовательно, наблюдаемую изменчивость следует отнести к эпигенетической, то есть реализуемой в процессе онтогенеза растений. Известно, что гомозиготным (и гаплоидным) растениям присущ феномен депрессии, что проявляется, в частности, в нестабильности и нарушениях развития по сравнению с гибридными растениями. Эту нестабильность можно было наблюдать и при анализе эпипластомной изменчивости у растений свеклы.

Величина D , найденная для различных образцов свеклы, варьировала от 1,0 до 1,7. Значения D соответствовали числам, обозначаемым как золотые ρ -пропорции (23) — геометрическое понятие, описывающее деление целого на две неравные части (например, деление отрезка в крайнем и среднем отношении). А.П. Стаховым предложен «обобщенный принцип золотого сечения», согласно которому деление целого содержит в себе множество значений (структурных инвариантов), в частности «пропорцию дихотомии» ($\rho = 0$) и «пропорцию золотого сечения» ($\rho = 1$). Такие значения D были получены в настоящем эксперименте (см. табл. 3), но встречаются и другие значения, которые соответствуют гармоническим пропорциям, возникающим при значениях $\rho \geq 2, 3, 4$ и т.д. Для начальных значений ρ последовательность гармонических пропорций (структурных инвариантов) выглядит следующим образом: 1,618, 1,465, 1,380, 1,324, 1,285, 1,255, 1,232 и т.д. (26). Если у гибридных растений величина D соответствовала пропорциям, представленным первыми

значениями последовательности ($\rho \geq 1, 2, 3, 4$), то у гаплоидов — более дальним членам этой же последовательности ($\rho \geq 8, 9, 10 \dots$).

Гармонические пропорции и золотое сечение — это, по сути, числовые инварианты, отражающие принципы самоорганизации живой материи. Система в целом может претерпевать последовательные изменения, но некоторые ее свойства, параметры сохраняются неизменными.

Таким образом, найденные значения пропорций (D) у гаплоидных и диплоидных растений сахарной свеклы позволяют оценивать количественно эпигеномную стабильность и эпигеномную вариабельность клеточных популяций. Эпигеномная и эпипластомная вариабельность, оцениваемая через геометрический показатель D, характеризуют общее физиологическое состояние клеточных популяций у растений в процессе онтогенеза. Одной группе (мужско-стерильные гибриды) присущ эффект гетерозиса (гибридной мощности), и они имеют высокие значения эпигеномной стабильности D, для другой (гаплоидные растения) характерен эффект депрессии, чему соответствуют низкие значения D.

ЛИТЕРАТУРА

1. Johannsen W. The genotype conception of heredity. *Int. J. Epidemiol.*, 2014, 43(4): 989-1000 (doi: 10.1093/ije/dyu063).
2. Sisodiya D., Dashora K., Pandey P. Cellular organization and cell reproduction. *International J. Adv. Pharm., Biol. Chem.*, 2012, 1(1): 138-150.
3. Малецкий С.И., Роиц Н.В., Драгавцев В.А. Третья изменчивость, типы наследственности и воспроизводства семян у растений. *Сельскохозяйственная биология*, 2013, 5: 3-29 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.5.3rus, doi: 10.15389/agrobiology.2013.5.3eng).
4. Jablonka E. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 2009, 84(2): 131-176 (doi: 10.1086/598822).
5. D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 1985, 3(1): 73-112.
6. Кунях В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. В сб.: *Жебраковские чтения III*. Минск, 2011: 53.
7. Малецкий С.И., Колодяжная Я.С. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и вариация репродуктивных признаков у покрытосеменных растений. *Успехи современной биологии*, 1999, 119(2): 128-143.
8. Barow M. Endopolyploidy in seed plants. *BioEssays*, 2006, 28(3): 271-281 (doi: 10.1002/bies.20371).
9. Strakova N., Kosova V., Kolarcik V., Martonfi P. Endopolyploidy in organs of *Trifolium pratense* L. in different ontogenetic stages. *Cariologia*, 2014, 67(2): 116-123 (doi: 10.1080/00087114.2014.931632).
10. Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками. Канд. дис. СПб, 2004.
11. Kolano B., Siwinska D., Maluszynska J. Endopolyploidy patterns during development of *Chenopodium quinoa*. *Acta biologica cracoviensia, Series Botanica*, 2009, 51(2): 85-92.
12. Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic. *Sexual Plant Reproduction*, 2007, 20(2): 99-107 (doi: 10.1007/s00497-007-0047-7).
13. Kolano B., Siwinska D., Maluszynska J. Comparative cytogenetic analysis of diploid and hexaploid *Chenopodium album* Agg. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2008, 77: 293-298 (doi: 10.5586/asbp.2008.037).
14. Barow M., Jovtchev G. Endopolyploidy in plants and its analysis by flow cytometry. In: *Flow cytometry with plant cells* /J. Dolezel, J. Greilhuber, J. Suda (eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007: 349-372.
15. Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, 17(1): 72-80.
16. Maletskaya E.I., Yudanov S.S., Maletskii S.I. Haploids in apozygotic seed progenies of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sugar Tech.*, 2009, 11(1): 61-65.
17. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Генетика*, 1996, 32(12): 1643-1650.
18. Мандельброт Б. *Фрактальная геометрия природы*. М.-Ижевск, 2010.
19. Yudanov S.S., Maletskaya E.I., Maletskii S.I. Epiplasm variation of the number of chloroplasts in stomata guard cells of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Russian J.*

- Genetics, 2004, 40(7): 756-764.
20. Германа В.А. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(5): 839-857 (doi: 10.1007/s00299-011-1061-7).
 21. Sokal R.R., Rohlf F.J. *Biometry the principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company, NY, 1995.
 22. Малецкий С.И., Юданова С.С. Зародышевый путь и ствольные клетки у высших растений. *Цитология и генетика*, 2007, 41(5): 67-80.
 23. Стахов А.П. Золотое сечение, священная геометрия и математика гармонии. В сб.: *Метафизика. Век XXI. М., 2006: 174-215.*
 24. Уфимцев Р. Хвост ящери. *Метафизика метафоры*. Калининград, 2010.
 25. Nunez J.A., De Marco R.J. Functional fractals in biology. *Biological Theory*, 2008, 3(4): 293-296 (doi: 10.1162/biot.2008.3.4.293).
 26. Traverso S. Cytoskeleton as a fractal percolation cluster: some biological remarks. In: *Fractals in biology and medicine. V. 4* /T.F. Nonnenmacher, G.A. Losa, E.R. Weibel (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel—Boston—Berlin, 2011.

Институт цитологии и генетики СО РАН,
630090 Россия, г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 10,
e-mail: stas@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию
28 июля 2014 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 5, pp. 579-589

ANALYSIS OF EPIGENOMIC AND EPIPLASTOME VARIABILITY IN THE HAPLOID AND DIHAPLOID SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) PLANTS

S.I. Maletskii, S.S. Yudanova, E.I. Maletskaya

Institute of Cytology and Genetics of SD of Russian Academy of Science, Federal Agency of Scientific Organizations, 10, pr. Lavrentieva, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail stas@bionet.nsc.ru

Acknowledgements:

Supported by a budget project of Institute of Cytology and Genetics of SD of RAS

Received July 28, 2014

doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.579eng

Abstract

Reproduction of cells, individuals, populations is a principal concept of biology. This process is characterized by two properties: heredity and variation. The concept of inheritance indicates the identity of the parents and the offspring's; the concept of variability indicates the incompleteness of this identity. There is a direct proportional relationship between the genome level ploidy, the cytoplasm volume and the cell size (nuclear-plasma ratio). Variation of chromosome or chromatid numbers in the cell nuclei determines the epigenomic variability and variation of intracellular organelle numbers in the cell (for example chloroplasts) determines epiplastome variability in plants. Relationship of the chloroplast number in stomata guard cells and nucleus ploidy level in sugar beet is well known that permit to compare an epiplastome variability in plants and different ploidy of genomes. Chloroplast number in the cells varies, partly due to the asymmetric organelle distribution during cytokinesis. However the epiplastomic variability is related not only with a random organelle distribution during cytokinesis, but also with a genome number variation per cell nucleus (epigenomic variability). An endohaploidy, i.e. an appearance of haploid cells in cell population, is one of the variant of epigenetic variability display. Sugar beet may form the haploid seeds spontaneously both by biparental and uniparental reproduction. In the work the diploid (control, generation A_0), dihaploid and haploid (generation A_1) seed progeny were used. Dihaploids and haploids were obtained by the parthenogenetic reproduction mode (pollen less condition). In the paper we considered a variability of chloroplast number in stomata guard cells and integral tissue characteristic which are compared with harmonious proportions (Fibonacci number, golden ratio). It was studied following parameters: a) a chloroplast number in stomata guard cells; b) a plastotype number in the epidermal tissue. And it was determined the average value of chloroplast (M) and plastotypes (Pt) number in stomatal guard cells of haploid, diploid and dihaploid plants. On the base of obtained data the ratios of epigenetic stability (D-ratio) in haploid, diploid and dihaploid (control) sugar beet plants were estimated. D is logarithmic ratio of the chloroplast number to plastotypes and indicates the physiological and epiplastome stability of cell populations. It was shown the differences between the experiment simples: D-ratio in dihaploids is always above than one in the haploids. It was established for the first time that integral tissue characteristic (D-ratio) corresponds to harmonious proportions (bio-logical invariants), i.e. Fibonacci numbers (golden ratio). In diploids and dihaploids this ratio corresponds to the first terms of the harmonious series (from first to fifth), in haploids D-ratio corresponds to eighth and higher terms of the harmonious sequence.

Keywords: apozygoty, haploids, dihaploids, variability, harmonious proportions, fractals, endopolyploidy, epigenetics.