

М.Ф. КОЗАК

Астраханский государственный университет, Россия
e-mail: astun@astranet.ru**РИТМЫ МИТОЗА
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДА *GLYCINE* L.**

Исследовали циркадные ритмы митоза у представителей двух видов сои: *Glycine. max* (L.) Merr. (*G. hispida* Max.) и *G. soja* Sieb. & Zucc. (*G. ussuriensis* Reg. & Maack), а также гибридов, полученных от скрещивания указанных видов. В течение суток отмечены три подъема и спада митотической активности клеток апикальной меристемы корня с исходным моментом полного отсутствия митозов в 24 ч и четко выраженной дальнейшей периодичностью подъема митотической активности. На начальных этапах роста первичного корня также обнаружена ритмичность подъема митотической активности клеток апикальной меристемы корня различной длины. Полученные данные указывают на значительную естественную синхронизацию начальных этапов роста и митотической активности клеток меристемы зародышевого корня сои.

© М.Ф. КОЗАК, 2004

Введение. Проблема изучения динамики митотической активности привлекает внимание многих исследователей как с теоретической, так и практической стороны, так как в основе роста растений лежит новообразование клеток, тканей, органов. Деление клеток является конечным этапом многих биохимических превращений, связанных с воспроизведением генетической информации и началом нового этапа биосинтеза соединений, включающихся в информационную, энзиматическую и структурную организацию образующихся клеток. Создание и нахождение гибридных форм с изначально высокой митотической активностью меристематических клеток должно являться первым и главным условием успешного селекционного процесса, направленного на создание высокопродуктивных форм с высокой интенсивностью ростовых процессов. Установлено, что интенсивность деления клеток у многих растений отличается четкой ритмичностью в течение суток [1–10], а также в процессе роста зародышевого корня [11]. Это доказано для значительного числа видов и родов растений. Представители рода *Glycine* L. не затронуты исследованиями периодичности митоза, несмотря на большое теоретическое и практическое значение таких исследований.

Род *Glycine* L. включает 11 видов [12] из двух подродов: *Glycine* Willd и *Soja* (Moench.) F. Herm. К подроду *Glycine* относятся девять дикорастущих видов, распространенных преимущественно в Австралии. Подрод *Soja* объединяет культурную сою — *G. max* (L.) Merr. (*G. hispida* Max.) и дикорастущую уссурийскую сою (*G. soja* Sieb. & Zucc или *G. ussuriensis* Reg. & Maack), единственный дикорастущий вид из рода *Glycine* L., произрастающий в Дальневосточном регионе России.

Дикая уссурийская соя представляет интерес для селекции как источник новых ценных генов. Скрещивание представителей культурной сои с дикой уссурийской дает фертильное потомство с высокой потенциальной продуктивностью [12–24]. В связи с этим представляет интерес сравнительное исследование ритмов митоза у представителей исходных видов, а также у межвидовых гибридов, полученных при их скрещивании. У растений активное деление клеток происходит в меристемах. Меристемы — это асинхронные популяции клеток [2] с различной длиной митотического цикла. Иссле-

довательская работа такого плана в значительной степени теряет точность, если не учитывает асинхронности деления клеток в популяции. Получение синхронно делящихся клеток представляет большой интерес. Описаны различные химические и физические методы, позволяющие получать синхронно делящиеся клеточные популяции тканей высших растений. К ним относятся нанесение ингибиторов (Т. Ericson, 1965) и активаторов (К.З. Гамбург, Е.Ф. Буренкова, 1970) метаболических процессов, воздействие низкими температурами (S. Okamura, 1973; Н.Н. Smith, 1963) и другие методы (цит. по [5]). Однако степень синхронизации, полученная в этих опытах, невысокая, а действие экспериментальных факторов не всегда безвредно, влияет на ход эксперимента и требует проверки.

Вместе с тем доказано существование естественной синхронизации начальных периодов митотического цикла при прорастании семян некоторых видов растений. Значительная естественная синхронизация начальных этапов прорастания семян в отношении периодов митотического цикла доказана методом радиоавтографии [5] для гороха посевного (*Pisum sativum* L.) — представителя семейства *Fabaceae* Lindl., к которому относится также род *Glycine* L. Исследования доказывают, что покоящаяся меристема корня отдельных видов растений находится в фазе G_1 [5, 8]. При прорастании семян значительная часть клеток меристемы первичных корней синхронно проходит пресинтетическую фазу и вступает в период синтеза ДНК. Цитофотометрическое исследование содержания ДНК показало, что 80 % клеток на 25-й час прорастания находятся в G_1 -фазе. На 36-й час свыше 70 % клеток меристемы уже перешли в S-фазу.

Целью настоящей работы является исследование ритмов суточной периодичности митотической активности клеток апикальной меристемы зародышевых корней, а также ритмов митотической активности клеток меристемы на первых этапах роста зародышевого корня у представителей культурной и дикорастущей сои, а также гибридов между ними, полученных и описанных нами и другими авторами [12–24].

В наших опытах установлено, что все три изучавшиеся формы сои обладают естествен-

ной синхронизацией перехода клеток к делению на начальных этапах роста первичного корня, что делает представителей рода *Glycine* L. весьма перспективными объектами для исследования закономерностей процесса клеточной пролиферации.

Материал и методика. Межвидовые гибриды получены нами от скрещивания сортов культурной сои *Glycine max* (L.) Merr. с дикой уссурийской соей *G. soja* Sieb. & Zucc., собранной нами в Амурской области вблизи г. Благовещенска в районе впадения реки Зеи в Амур. Представители исходных видов и исследуемые линии межвидовых гибридов (F_2) высевались для воспроизведения в сравнимых условиях. Семена проращивали в чашках Петри в термостате в темноте при температуре 24 °С. Для исследования циркадных (суточных) ритмов митоза зародышевые корни длиной 10–12 мм фиксировали ацетоалкоголем темпорально [25] с 0 до 24 ч через каждые 60 мин. Препараты окрашивали ацетокармином по Ремедеру [15]. На каждом этапе исследования анализировали от 6 до 10 тыс. клеток апикальной меристемы у всех трех исследуемых форм. Митотическую активность выражали в митотических индексах отношением числа делящихся клеток в различных фазах митоза к общему количеству проанализированных клеток меристемы. Исследование суточных ритмов митоза в клетках меристемы корня проведено у следующих трех форм сои: 1) *G. max* (L.) Merr., сорт Бельцкая 636 (Б-636) — представитель культурного вида сои; 2) *G. soja* Sieb. & Zucc. — дикорастущая уссурийская соя; 3) межвидовые гибриды — МВГ (F_2), полученные от скрещивания: ♀ сорт Бельцкая 636 × ♂ дикая уссурийская (*G. soja* Sieb. et Zucc.), — линия I-17/4 — желтые матовые семена.

Независимо от циркадных ритмов изучали митотическую активность клеток апикальной меристемы в процессе роста корня путем темпоральной фиксации первичных корней различной длины: от 3 до 40 мм в одно и то же время суток — с 12 до 13 ч. В это время нами была обнаружена высокая митотическая активность клеток меристемы, и это время является наиболее удобным для проведения фиксации апексов корней для исследования. Вместо сорта Бельцкая 636 для скрещивания с дикой уссу-

рийской соей и последующего сравнения использовали сорт Амурская бурая 57 по следующей схеме: 1) *G. max* (L.) Merr., сорт Амурская бурая 57 (А.Б.57); 2) *G. soja* Sieb. & Zucc., дикорастущая уссурийская соя — та же популяция из Амурской области; 3) линия I^{18/15} шестого поколения (F₆) межвидовых гибридов (МВГ), полученных от скрещивания: ♀ сорт Амурская бурая 57 × ♂ дикая уссурийская соя.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ митотической активности клеток апикальной меристемы корня показал, что у всех трех исследуемых форм сои деление клеток в течение суток происходит волнообразно при четко выраженной периодичности подъема и спада значений митотических индексов. В течение суток нами обнаружено три подъема (и спада) митотической активности клеток меристемы. Первые два подъема совпадают по времени у всех исследуемых форм — в 6 и 12 ч. Исходной точкой стабилизации и полного отсутствия митотической активности является полночь. В 24 ч ночи деление клеток почти не обнаружено ни у одной из исследуемых форм. В митозе в это время находятся единичные клетки апикальной меристемы. Следовательно, наблюдаемая ритмичность митоза у всех форм является генетически синхронизированной. В меристеме корня дикой уссурийской сои (*G. soja* Sieb. & Zucc.) в течение суток обнаружено наиболее четко выраженное чередование трех периодов подъема и спада митотической активности — три волны митозов (рис. 1). Начиная с 1 ч ночи после полного «митотического покоя» нарастает первая волна митозов, имеющая свой «пик» в 6 ч утра. В это время значения митотических индексов достигают максимума — 18,76 %. После этого к 9 ч утра происходит спад митотической активности клеток меристемы, и в 10 ч утра митотическая активность клеток достигает минимальных значений — MI = 3,11 %. С этого момента в клетках меристемы дикой уссурийской сои постепенно нарастает вторая волна митозов с «пиком» митотической активности в 12 ч дня (MI = 17,9 %). Постепенный спад митотической активности клеток меристемы дикой уссурийской сои происходит к 15 ч, когда значение митотических индексов снижается до 1,54 %. Третий, небольшой подъем митотической ак-

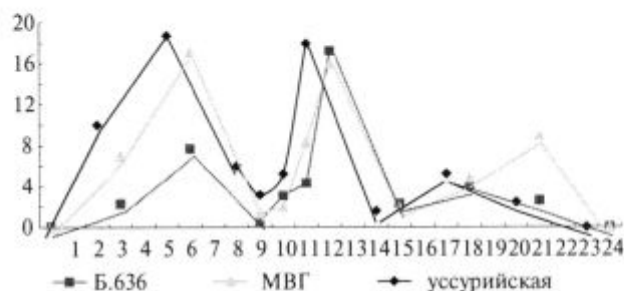


Рис. 1. Митотическая активность (по вертикали, %) клеток корневой меристемы двух видов сои и межвидовых гибридов в зависимости от времени суток (по горизонтали): Б.636 — сорт Бельцкая 636 — *G. max* (L.) Merr.; уссурийская — дикорастущая уссурийская соя *G. soja* Sieb. & Zucc.; МВГ — межвидовые гибриды F₆: ♀ Бельцкая 636 × ♂ дикая уссурийская (*G. soja* Sieb. et Zucc.)

тивности клеток меристемы корня дикой уссурийской сои происходит к 18 ч (MI = 5,22 %) с постепенным снижением митотических индексов к 24 часам почти до нуля.

Суточные ритмы митоза клеток сои сорта Бельцкая 636, представителя культурного вида сои *G. max* (L.) Merr., совпадают по времени подъема митотической активности с дикой уссурийской соей. Время максимальной митотической активности клеток меристемы приходится у обоих видов на 6 ч утра, 12 ч дня и 18 ч. Первая «волна» митотической активности, достигающая максимума к 6 ч утра, по значениям митотических индексов у представителей дикорастущей (18,70 %) и культурной сои (7,65 %) сильно отличается. В 12 ч дня митотическая активность клеток меристемы представителей *G. max* (L.) Merr. и *G. soja* Sieb. & Zucc. почти совпадает, составляя соответственно 17,17 и 17,90 %. В 18 ч митотические индексы клеток культурной и дикой уссурийской сои составляют 3,97 и 5,22 % соответственно.

Апикальная меристема клеток межвидовых гибридов (F₆) в течение суток характеризуется также тремя волнами митоза. По абсолютным значениям митотических индексов они занимают среднее положение, приближаясь к значениям этого показателя у дикой уссурийской сои. Исключение составляет третья, последняя волна митозов, которая у МВГ достигает максимальных значений позже исходных видов — к 21-му часу при уровне митотической активности 8,93 %, что почти вдвое превышает

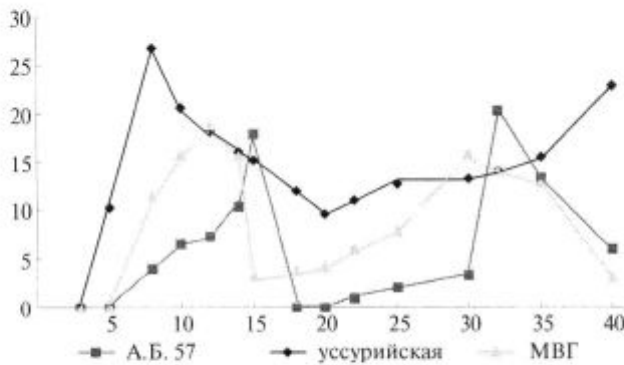


Рис. 2. Динамика изменения митотической активности (по вертикали, %) клеток меристемы в зависимости от длины первичного корня сои (по горизонтали, мм): А.Б. 57 — сорт Амурская бурая 57 — *G. max* (L.) Merr.; уссурийская — дикорастущая уссурийская соя — *G. soja* Sieb. & Zuss.; МВГ — межвидовой гибрид F_6 : ♀ Амурская бурая 57 × ♂ дикая уссурийская

значения митотических индексов исходных родительских видов. В целом ритмы митоза межвидовых гибридов по времени и абсолютным значениям колебаний митотических индексов близки к дикорастущей уссурийской сое.

У разных родов растений отмечено различное количество подъемов и спадов митотической активности в течение суток: у элодеи 3 «пика» митотической активности, у традесканции — 4, у донника — 8 пиков митоза, у сахарной свеклы — 5 подъемов митотической активности [1–4, 6, 7, 9, 10] и др. Наблюдаемая высокая продуктивность и энергия роста у межвидовых гибридов сои [12–24] связана с генетически детерминированной высокой митотической активностью клеток меристемы, с четкими ритмами митоза, унаследованными от дикорастущей уссурийской сои.

Кроме суточных ритмов деления клеток, естественная синхронизация зародышевых меристем сои инициирует наличие достаточно четких ритмов деления клеток в процессе роста зародышевого корня (рис. 2). Зародышевый корень, появляющийся при прорастании семени у всех трех изучавшихся форм сои, не содержал в меристеме клеток в состоянии митоза. Первые митозы в клетках апикальной меристемы дикой уссурийской сои начинаются раньше, чем у других сравниваемых форм. При длине зародышевого корня 5 мм в меристеме корешков дикой уссурийской сои отме-

чается деление клеток ($MI = 10,29\%$). Корни такой длины у сои сорта Амурская бурая 57 и гибридных форм еще не содержат делящихся клеток. Начало митотической активности в апикальной меристеме корня культурной сои (сорт Амурская бурая 57) и межвидовых гибридов F_6 отмечено при длине зародышевого корня 8 мм. Увеличение значений митотических индексов в клетках меристемы корня сои сорта Амурская бурая 57 на первых этапах его роста происходит медленно и плавно, достигая своего максимума при длине первичного корня 14–15 мм. Меристема корня дикой уссурийской сои достигает максимальной митотической активности клеток уже при длине зародышевого корня 8 мм, причем нарастание митотической активности происходит относительно быстро. В это время митотический индекс клеток меристемы дикой уссурийской сои достигает величины 26 %, которая не отмечена ни у представителей *G. max*, ни у межвидовых гибридов.

В процессе роста меристема корня гибридных форм сои (рис. 2) по динамике митотической активности занимает среднее положение между исходными родительскими видами, приближаясь по значениям митотических индексов к дикой уссурийской сое. В шестом поколении гибридные формы сохраняют высокую митотическую активность клеток меристемы (при длине зародышевого корня с 8 до 14 мм).

Вслед за первой волной митозов у всех трех исследуемых форм отмечен спад митотической активности клеток меристемы в процессе роста корня. У сорта культурной сои (А.Б. 57) он выражен наиболее четко, так как в меристеме корня сорта Амурская бурая 57 митотическая активность при длине 18–25 мм падает до нулевых значений. У межвидовых гибридов снижение митотической активности отмечено при увеличении длины корня до 15 мм, но уменьшение митотических индексов не происходит до нулевых значений. Меристема дикой уссурийской сои в процессе роста зародышевого корня при любой его длине, кроме первых этапов роста, имеет достаточно высокую митотическую активность.

Таким образом, естественная синхронизация начальных этапов митотического цикла позволяет выявить в течение суток три «волны» ми-

тотической активности в клетках апикальной меристемы корня при прорастании семян исследуемых форм сои с исходным моментом полного покоя в 24 ч, с четко выраженной дальнейшей периодичностью. Начиная с одного часа ночи, к 6 ч утра нарастает первая максимальная «волна» митотической активности, вторая — к 12 ч дня, третья, менее четкая, у разных форм в 18–21 ч. Каждая из исследуемых форм отличается своеобразием «волновых» процессов по высоте подъема и спада митоза, значениям митотических индексов. Кроме того, естественная синхронизация начальных этапов митотического цикла позволяет выявить у всех исследованных форм четкие, отличающиеся своими особенностями процессы подъема и спада митотической активности в процессе роста зародышевого корня.

Выводы. Межвидовые гибриды сои по суточным ритмам митоза занимают среднее положение между исходными родительскими видами, приближаясь по значениям этого показателя к дикой уссурийской сое, наследуя высокую пролиферативную активность клеток меристемы и способность к ростовым процессам высокой интенсивности. Приведенные результаты указывают на значительную естественную синхронизацию начальных этапов роста первичного корня исследованных форм сои, что делает представителей рода *Glycine* L. весьма перспективными объектами для исследования закономерностей процесса клеточной пролиферации.

SUMMARY. The circadian mitotic rhythms in representatives of soybean *Glycine max* (L.) Merr., *G. soja* Sieb. & Zucc., as well as in homozygote forms of tibia F_2 hybrids were studied. We observed three «waves» of the mitotic activity in the cells of apical root meristem with the initial moment of the perfect rest at 24 o'clock; and the legible periods which decreased later on. Beginning from 1 o'clock to 6 o'clock the first maximum mitotic «wave» increased; the second one evolved up to 12 o'clock, the third less legible one arised at 18–21 o'clock. Each of soybean tested forms was distinguished by the peculiarity in periodical processes and the values of mitotic indexes

РЕЗЮМЕ. Досліджували циркадні ритми мітозу в представників двох видів сої: *Glycine max* (L.) Merr. та *G. soja* Sieb. & Zucc., а також у гібридів (F_2) між ними. Протягом доби виявили три «хвилі» підйому митотичної активності клітин апікальної меристеми кореня з вихідним моментом повного «митотичного спокою» о

24-й годині, з чітко вираженою подальшою періодичністю. Починаючи з 1-ї години ночі, до шести годин ранку зростає перша максимальна «хвиля» митотичної активності, друга до 12 год дня, третя, менш чітка, у різних форм в 18–21 год. Кожна з досліджених форм відрізняється своєрідністю в періодичних процесах і за значеннями митотичних індексів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гриф В.Г. О суточной периодичности митозов в меристеме ячменя // Цитология. — 1959. — 1, № 2. — С. 229–233.
2. Гриф В.Г., Иванов В.Б. Данные о временных параметрах митотического цикла у цветковых растений // Цитология. — 1980. — 22, № 2. — С. 107–120.
3. Лебедев П.В., Мельникова М.Ф., Уткина И.А. Суточная ритмика митотической активности клеток верхушечной меристемы кормового люпина // Цитология и генетика. — 1974. — 8, № 3. — С. 241–244.
4. Немилостивая Т.И. Суточный ритм митотической активности клеток листьев гибридного подсолнечника и его исходных форм // Вестн. Харьк. ун-та. — 1982. — С. 45–47.
5. Троян В.М., Яворская И.П., Стасевская И.П., Калинин Ф.Л., Ильченко Л.Н. Естественная синхронизация начальных периодов митотического цикла при прорастании семян гороха // Физиология и биохимия культур. растений. — 1975. — 7, вып. 4 (37). — С. 372–376.
6. Чугункова Т.В., Дубровная О.В., Шевцов И.А. Динамика митотической активности и временные параметры клеточного цикла корневой меристемы сахарной свеклы // Докл. АН УССР. Сер. биол. — 1988. — № 3. — С. 84–87.
7. Шаталин Л.И. О суточной динамике роста некоторых луговых злаков // Бот. журн. — 1964. — 48, № 3. — С. 395–398.
8. Богданов Ю.Ф., Иорданский А.Б. Радиографическое исследование ядер корневой меристемы прорастающих семян гороха с применением H_3 тимидина // Журн. общ. биологии. — 1964. — 25, № 5.
9. Lence A. Sur la structure et le fonctionnement du point vegetated de *Vicia faba* L. // Ann. sci. nat., bot. — 1952. — № 11. — P. 301–339.
10. Sevelkoul R. Distribution of mitotic activity Nathan the shoot of *Elodea canadensis* // Amer. J. Bot. — 1957. — 44, № 3. — P. 311–317.
11. Ковалев А.Г., Обручева Н.А. Характеристика начального этапа сигмоидальной кривой корня // Физиология растений. — 1978. — 23, вып. 2.
12. Лещенко А.К., Михайлов В.Г., Сичкарь В.И., Шелко Л.Г., Кудрякова И.В. Генетика сои // Генетика культурных растений: зернобобовые, овощные, бахчевые / Под. ред. Т.С. Фадеевой, В.И. Буренина. — Л.: Агропромиздат, 1990. — С. 111–134.
13. Козак М.Ф. Генетические особенности межвидовых гибридов сои // Вопросы биологии. — Хабаровск, 1974. — С. 66–72.

14. Козак М.Ф. Фенотипические корреляции признаков у представителей двух видов сои и межвидовых гибридов : Доклады. Общая биология / Комиссия по применению математики в биологии // Бюл. Моск. общ-ва испытателей природы. — М.: Изд-во МГУ, 1975. — С. 126–128.
15. Козак М.Ф. Межвидовая гибридизация как фактор изменения клеточных циклов // 5-й съезд Всесоюзного общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. — М., 1987. — 4, ч. 4. — С. 9–10.
16. Козак М.Ф. Наследование окраски семян у межвидовых гибридов сои // Генетика. — 1978. — 14, № 1. — С. 36–43.
17. Козак М.Ф. Результаты цитогенетических исследований гибридов культурной и дикорастущей сои : Исходный материал, генетика, систематика и селекция зерновых бобовых культур // Сб. науч. тр. по приклад. ботанике, генетике и селекции. — 1990. — 135. — С. 96–100.
18. Козак М.Ф. Цитогенетический анализ мейоза в микроспорогенезе у межвидовых гибридов сои // Цитология и генетика. — 1983. — 20, № 3. — С. 206–208.
19. Козак М.Ф. Митотическая активность и временные параметры митоза и митотического цикла у двух видов сои и межвидовых гибридов // Цитология и генетика. — 1993. — 27, № 1. — С. 18–22.
20. Козак М.Ф. Анатомическая и морфологическая структура стебля межвидовых гибридов сои в связи с исследованием филогенетических связей представителей исходных видов рода *Glycine* L. // Естественные науки : Журн. фундамент. и приклад. исследований. — Астрахань : Изд-во АГУ, 2003. — № 6. — С. 34–47.
21. Седова Т.С. Межвидовая гибридизация культурной сои и диких видов сои подвидов *Glycine* и *Soja* // Генетика. — 1982. — 28, № 9. — С. 1532–1536.
22. Karasawa K. Crossing experiments with *Glycine soja* and *G. ussuriensis* // Jap. J. Bot. — 1936. — 8, № 2. — P. 113–118.
23. Soybean: Improvement, Production, and Uses. — Madison, 1973. — 300 p.
24. Ting C.L. Genetic studies on the wild and cultivated soybeans // J. Amer. Soc. Agron. — 1946. — 38, № 5. — P. 381–393.
25. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Пер. с нем. В.Я. Александрова, З.И. Крюковой. — М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1953.

Поступила 30.01.04