

*На правах рукописи*

ЛЕБЕДЕВА Ольга Николаевна

**МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ИНДУЦИРОВАННОМ  
МУТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ ПЕРЕКРЕСТНООПЫЛЯЮЩИХСЯ  
РАСТЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ *FESTUCA PRATENSIS* Huds.**

03.00.12-физиология растений

03.00.15-генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

146038 K

Работа выполнена в лаборатории генетики Института биологии Карельского научного центра Российской Академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук  
ОЛИМПИЕНКО Г.С.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
МАРКОВСКАЯ Е.Ф.  
доктор биологических наук  
ПИТИРИМОВА М.А.

Ведущая организация: Всероссийский ордена Ленина и ордена Дружбы народов научно-исследовательский институт растениеводства имени Н.И.Вавилова (Санкт-Петербург) РАСХН

Защита состоится *22 февраля* 1994 года в *14<sup>00</sup>* часов на заседании специализированного совета К.200.07.01 при Институте биологии Карельского научного центра РАН по адресу: 185610, г.Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского научного центра РАН.

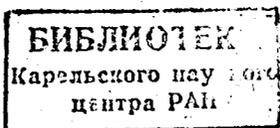
Автореферат разослан *21 февраля* 1994 года.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
кандидат биологических наук

*Акимова*

Акимова Т.В.

146038 K



## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Молекулярно-генетические механизмы формирования мутаций при индуцированном мутагенезе достаточно хорошо изучены. Однако, если говорить о растениях, то подобные знания наиболее приемлемы в отношении самоопыляемых видов, фиксирующих мутантные признаки на основе самосовместимости, обеспечивающей одновременно и широкий скрининг индуцированных мутантов. Что касается перекрестноопыляющихся видов растений, то, хотя работы по индуцированному мутагенезу и были успешно начаты в свое время и на них (Blixt, 1976), дальнейшего развития в силу известных трудностей, главная из которых связана с самостерильностью, они не получили. Стало очевидно, что перенос известных генетических моделей с самоопыляющихся на перекрестноопыляющиеся виды растений не гарантирует успех и, следовательно, необходим поиск новых генетических и селекционных концепций, которые могли бы обеспечить и для аллогамных видов растений столь же результативный итог.

При изучении индуцированного мутационного процесса в панмиктических популяциях, как представляется, желательны такие критерии его оценки, которые, будучи связаны со структурно-функциональными особенностями генетического материала клетки, в достаточной мере способны отражать различия между мутантными популяционными фенотипами. Морфофизиологический контроль может быть осуществлен через изучение нормы реакции клеток и тканей на те или иные действующие факторы: дефицит или избыток почвенного питания, экстремальная температура,  $\gamma$ -облучение семян, а также биологически активные вещества, соединения-энергоносители, используемые как в лабораторном, так и полевом экспериментах.

Что касается мутационной селекции, другой части работы, то она, как одна из отраслей биологических дисциплин, совершенствуется не только на генетических представлениях, но и на основе достижений широкого спектра наук, способствующих решению селекционных проблем. И в этом случае морфофизиологическое тестирование может служить надежным средством селекционно-генетического мониторинга при создании сортов перекрестноопыляющихся видов растений.

В данном исследовании сформировано представление о роли

в процессах мутагенеза индуцированного генетического груза, сохраняющегося в ряде генераций. В панмиктических популяциях он может достигать значительной величины и оказывать влияние на целый ряд признаков, в том числе продуктивность, ограничивая ее потенциал, с одной стороны, и, способствуя развитию компенсаторных реакций, с другой.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение индуцированного мутационного процесса у перекрестноопыляющихся растений в ближайших и отдаленных от мутагенного воздействия генерациях. При этом предполагалось решить следующие задачи:

- теоретически и экспериментально изучить возможности применения морфофизиологических критериев оценки мутантных панмиктических популяций;

- изучить реакции мутантных потомств к действию физиологических нагрузок;

- проследить характер формирования популяционного фенотипа у  $M_1$ - $M_2$  мутантных потомств;

- сопоставить популяционные физиологические характеристики у потомств, полученных на основе действия на семена ионизирующей радиации, химических мутагенов, совместного их действия;

- сформулировать на основе морфофизиологического контроля рекомендации для мутационной селекции.

Научная новизна. В результате проведенных исследований впервые показано, что предложенные нами морфофизиологические критерии (АТФ- и кофеин-зависимая частота потенциально летальных проростков, температурозависимая хлорофилльная депигментация, ростовые процессы, продуктивность) позволяют оценить мутантные потомства в широком диапазоне их биологических особенностей.

Впервые получены данные о величине и характере действия пула мутационной изменчивости в панмиктических популяциях, установлены способы его регулирования.

Показано, что морфофизиологический статус мутантных потомств может быть описан через реакцию клеток и тканей на физиологические нагрузки.

Проведено изучение характера мутационного процесса в

ближайших и отдаленных от мутагенной обработки семян генерациях, показана его временная длительность и нестабильность.

Сформулированы рекомендации для мутационной селекции перекрестноопыляющихся видов растений.

Практическая значимость работы. Разработан и защищен авторским свидетельством Госкомитета СССР по делам изобретений и открытий № 1505456 от 8.05.89 г. "Способ оценки посевных качеств семян зерновых и кормовых злаков".

Радиационный сорт овсяницы луговой "Снежская" находится в государственном сортоиспытании.

Проведено предварительное испытание пяти селекционных линий овсяницы луговой различного характера роста, высокопродуктивных и устойчивых к действию низких температур (заморожек).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Всесоюзном симпозиуме "Молекулярные механизмы генетических процессов" (Москва, 1983); Всесоюзной школе-семинаре "Надежность биологических систем (Чернигов, 1984, 1986); Всесоюзном совещании "Радиационная генетика - селекция" (Москва, 1986); Всесоюзных съездах ВОГиС им. Н.И.Вавилова (Москва, 1987; Минск, 1992); Всесоюзной конференции "Экологическая генетика растений и животных" (Кишинев, 1987, 1992); научно-методическом совещании "Генетические методы в селекции кормовых трав" (Вильнюс, 1987); Президиуме Карельского научного центра РАН (Петрозаводск, 1987, 1993); Всесоюзной конференции "Синергизм действия ионизирующей радиации и других физических и химических факторов на биологические системы" (Пушино, 1988); II Всесоюзном координационном совещании "Эколого-генетические последствия воздействия на окружающую среду" (Сыктывкар, 1989); Всесоюзном радиобиологическом съезде (Москва, 1989).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы, включающего 241 наименование. Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 43 таблицы и 11 рисунков.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.) – диплоидный ( $2n=14$ ) перекрестноопыляющийся многолетний злак с развитой системой самонесовместимости.

На мутантной основе (табл. 1) нами был получен своеобразный материал, изученный в отношении формирования продуктивности мутантных потомств, температурозависимой депигментации проростков, АТФ – зависимости восстановления пигментации, интенсивности ростовых процессов, радиочувствительности, кофеинзависимости. Именно такие условия проведения экспериментов, как дефицит или избыток почвенного питания растений, высокая температура проращивания семян,  $\gamma$ -облучение семян, действие биологически активных соединений, веществ-энергоносителей позволяют выявить мутационные изменения физиологического статуса растительного организма.

Таблица 1  
Способы и условия обработки семян овсяницы луговой  $\gamma$ -квантами и химическими мутагенами

| Варианты мутагенной обработки семян | Способы и условия обработки               |   |
|-------------------------------------|---|---|
|                                     | облучение, доза, Гр, мощность 3.14 Гр/мин | замачивание в воде или растворе мутагенов, рН |
| Контроль                            | -   | в воде  |
| $\gamma$ -радиация                  | 30 Гр                                     | — —   |
| $\gamma$ +ЭМС                       | 30 Гр                                     | 2 % р-р, 1 час, рН 7                          |
| ЭМС                                 | -   | — —   |
| $\gamma$ +ЭИ                        | 30 Гр                                     | 0.02 % р-р, 1 час, рН 7                       |
| ЭИ                                  | -   | — —   |
| $\gamma$ +NaN <sub>2</sub>          | 30 Гр                                     | 0.0065 % р-р, 4 часа, рН 3                    |
| NaN <sub>2</sub>                    | -   | — —   |

Примечание. Отмывка в воде 1 час для всех вариантов.

Продуктивность  $M_2$ - $M_4$ -потомств изучали в условиях полевого эксперимента при трех различных уровнях почвенного питания растений: высоком (избыточном) - 60 т/га органических удобрений и  $N_{120}$   $P_{60}$   $K_{60}$ , умеренном -  $N_{60}$   $P_{60}$   $K_{60}$  и обедненном - почва не удобрялась. Влияние генетического груза на продуктивность изучали у инцухт- и ауткросс-потомств двух генераций ( $M_3$ ,  $M_4$ ).

Температурозависимую депигментацию изучали в  $M_3$ -генерации. Семена замачивали в воде и растворе динатриевой соли АТФ ( $1 \cdot 10^{-5}$  М) в течение суток и проращивали десять дней в фитотроне при 35°C и постоянном освещении 5000 лк. Проростки идентифицировали по характеру депигментации (Калам, Орав, 1974), а через 4 суток - по типу восстановления при температуре физиологического оптимума (25°C) по 350-400 проростков на вариант.

Интенсивность ростовых процессов оценивали по частоте жизнеспособных проростков с длиной листа более 2 см, анализируя семена, сформировавшиеся при свободном опылении  $M_1$ - $M_4$  растений. Условия проращивания семян стандартные: температура 20 - 25°C, освещенность - 3000 лк, длительность - 7 суток. Для каждого варианта мутагенной обработки проанализировано по 350-400 проростков.

Радиационное зондирование мутантных потомств проводили на основе анализа семян, образовавшихся при свободном опылении  $M_1$ - $M_2$ -растений, выращенных при трех уровнях почвенного питания: высоком, умеренном и дефиците. Семена облучали  $\gamma$ -квантами на установке АГАТ-С 91 (Co<sup>60</sup>, 2,75 Гр/мин) дозами 50, 100, 150, 200 Гр, затем в течение суток обрабатывали 5 мМ водным раствором кофеина и семь дней проращивали по стандартной методике.

В качестве критерия радиочувствительности использовали потенциально летальные проростки. Эффект кофеина-ингибитора пострепликативной рекомбинационной репарации ДНК устанавливали на основе регрессионного анализа логистической зависимости доли потенциально летальных проростков от дозы облучения. Коэффициенты регрессии сравнивали попарно, оценивая различия по t-критерию.

Генетический груз мутантных популяций определяли по

уровню элиминации растений в полевом эксперименте, частоте пигментных мутаций и потенциально летальных проростков у индукт- и ауткросс- потомств.

Оценку достоверности различий проводили с использованием критерия Стьюдента, сравнение долей выборок - метода Фишера, а взаимных связей - коэффициента непараметрической корреляции Кендалла (Айвазян и др., 1985).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продуктивность мутантных потомств как критерий индуцированного мутагенеза. Изменение в физиологическом статусе растений может быть обнаружено, прежде всего, по характеру чувствительности растений к уровню почвенного питания, т. е. через отношение продуктивности к заданному плодородию почвы. В результате оказалось, что дефицит или избыток почвенного питания существенно усиливает фенотипические различия среди мутантных линий и между ними и контролем. При дефиците почвенного питания у мутантных потомств продуктивность ниже, чем в контроле - индуцированная в результате мутагенеза физиологическая дефективность обнаружила себя в полной мере. При умеренном и высоком уровне почвенного питания физиологическая дефективность маскируется действием удобрений, а спектр изменчивости по продуктивности расширяется (табл. 2).

Еще одна особенность этих экспериментов состоит в том, что они позволили дифференцировать мутантные потомства по их чувствительности к уровню почвенного плодородия: ЭИ- и ЭМС-потомства более чувствительны, а полученные с использованием  $\gamma$ -радиации независимо или совместно с химическими мутагенами - менее чувствительны. Наименьшая чувствительность характерна для  $\gamma$ - $\text{NaN}_3$ -потомства. Из представленных в таблице 2 данных также видно, что при использовании химических мутагенов продуктивность выше в условиях высокого, а у потомств с комбинированной обработкой семян - умеренного фона почвенного питания.

Таким образом, использование дифференцированного плодородия в оценке продуктивности позволяет четко различать мутантные потомства по характеру действия мутагенных агентов.

Таблица 2

Продуктивность растений овсяницы луговой  $M_2$ -поколения при различном уровне питания, кг/растение

| Потомства            | Уровень почвенного питания |       |       |           |        |       |           |        |        |
|----------------------|----------------------------|-------|-------|-----------|--------|-------|-----------|--------|--------|
|                      | высокий                    |       |       | умеренный |        |       | низкий    |        |        |
|                      | $\bar{x}$                  | $P_1$ | $P_2$ | $\bar{x}$ | $P_1$  | $P_2$ | $\bar{x}$ | $P_1$  | $P_2$  |
| Контроль             | 0.687                      |       |       | 0.322     |        |       | 0.078     |        |        |
| $\gamma$ -           | 0.756                      | >0.05 |       | 0.296     | >0.05  |       | 0.041     | <0.001 |        |
| ЭМС-                 | 0.760                      | >0.05 | <0.05 | 0.316     | >0.05  | <0.05 | 0.037     | <0.001 | >0.05  |
| $\gamma$ +ЭМС-       | 0.680                      | >0.05 |       | 0.388     | >0.05  |       | 0.050     | <0.001 |        |
| ЭИ-                  | 0.814                      | <0.01 | <0.05 | 0.251     | <0.001 | <0.01 | 0.047     | <0.001 | >0.05  |
| $\gamma$ +ЭИ-        | 0.710                      | >0.05 |       | 0.358     | >0.05  |       | 0.038     | <0.001 |        |
| $NaN_2$ -            | 0.602                      | >0.05 | >0.05 | 0.309     | >0.05  | <0.05 | 0.049     | <0.001 | <0.001 |
| $\gamma$ + $NaN_2$ - | 0.582                      | <0.01 |       | 0.251     | <0.001 |       | 0.075     | >0.05  |        |

Примечание.  $P_1$  - достоверность различий между контрольным и опытными вариантами;  $P_2$  - достоверность различий между опытными вариантами: химический мутаген и  $\gamma$ -радиация + химический мутаген.

Температурозависимая хлорофильная депигментация. Как феномен температурозависимые пигментные нарушения хорошо известны, но лишь в отношении низкотемпературных условий их экспрессии при 10 - 15°C, как результат снижения уровня метаболизма (Nyboen, 1965; McWilliam, Naylor, 1967; Land et al., 1971 ).

Обнаруженные нами хлорофильные <sup>9c</sup>эффекты, напротив, возникают при высокой температуре: 30 - 35°C. Доля их в популяциях существенна, и, насколько можно судить, такие скрытые при обычной температуре генетические дефекты не устраняются отбором (Олимпиевко, Титов, Николаевская, 1982 ).

В данной работе частота температурозависимых депигментированных проростков, а также восстановление пигментации после перевода проростков в режим оптимального функционирования, были использованы нами как критерий физиологического состояния мутантных потомств.

В таблицах 3 и 4 отчетливо видны различия как по час-

Таблица 3

Температурозависимая депигментация и восстановление пигментации М<sub>1</sub>- проростков после снятия температурной нагрузки, %

| Потомства            | Проростки с депигментацией, % к контролю | P <sub>2</sub> | Проростки, ревертирующие к нормальному фенотипу | P <sub>1</sub> | P <sub>2</sub> |
|----------------------|--|----------------|---|----------------|----------------|
| Контроль             | 100.0±2.0                                |                | 65.4±4.4  |                |                |
| γ-                   | 71.3±2.0                                 |                | 73.9±3.4  | <0.05          |                |
| ЭМС-                 | 63.9±2.7                                 | <0.001         | 73.6±1.8  | <0.05          | <0.001         |
| γ+ЭМС-               | 83.6±3.5                                 |                | 39.0±5.0  | <0.001         |                |
| ЭИ-                  | 51.8±1.6                                 | <0.001         | 77.7±2.3  | <0.01          | <0.001         |
| γ+ЭИ-                | 94.4±2.6                                 |                | 28.3±3.9  | <0.001         |                |
| NaN <sub>3</sub> -   | 100.0±1.3                                | <0.01          | 63.3±3.6  | >0.05          | <0.001         |
| γ+NaN <sub>3</sub> - | 94.8±3.3                                 |                | 41.1±3.6  | <0.001         |                |

тоте и спектру депигментации, так и по характеру восстановления между потомствами с различной генетической историей. У потомств, полученных с помощью химического мутагенеза, в фенотипическом спектре преобладают проростки с неглубокой степенью депигментации (тип виридис), частота их невелика. Для потомств, полученных с помощью совместного действия  $\gamma$ -радиации и химических мутагенов, напротив, характерна глубокая степень депигментации проростков (тип ксанта), а доля их существенна.

Таблица 4  
Фенотипический спектр депигментированных проростков, образовавшихся в условиях повышенной температуры, %

| Потомства                    | Температурозависимые фенотипы |          |                 |
|------------------------------|-------------------------------|----------|-----------------|
|                              | виридис                       | ксанта   | комбинированный |
| Контроль                     | 23.5±3.5                      | 72.1±3.9 | 2.3±0.5         |
| $\gamma$ -                   | 6.1±1.9                       | 1.2±0.1  | 1.2±0.1         |
| ЭМС-                         | -                             | -        | 4.2±1.0         |
| $\gamma$ +ЭМС-               | 24.3±5.7                      | 67.2±7.6 | 0.7±0.01        |
| ЭИ-                          | 1.6±0.6                       | -        | 2.8±0.3         |
| $\gamma$ +ЭИ-                | 22.7±3.1                      | 68.3±5.0 | 1.3±0.1         |
| NaN <sub>3</sub> -           | 5.3±0.4                       | 3.6±0.6  | 5.3±0.6         |
| $\gamma$ +NaN <sub>3</sub> - | 18.6±3.7                      | 74.0±5.3 | -               |

Нами были показаны два возможных пути восстановления пигментации после перевода проростков в режим оптимального по температуре функционирования: реверсия (полная или частичная) от дефектного к нормальному фенотипу и репопуляция - за счет неповрежденной группы клеток базальной части проростков (рис.1). Реверсия доминирует у проростков с неглубокой степенью депигментации (виридис), а репопуляция - у проростков с глубокой степенью депигментации (ксанта и альбина). Подобные механизмы восстановления у высших растений были показаны и при действии ионизирующей радиации (Гудков, Гродзинский, 1986).

Сделано предположение, что подобные различия могут быть

связаны с теми или иными нарушениями в клетке синтеза веществ-энергосителей. При дефиците эндогенных энергосителей в клетках растений может существовать выраженная конкуренция за АТФ между системами восстановления.

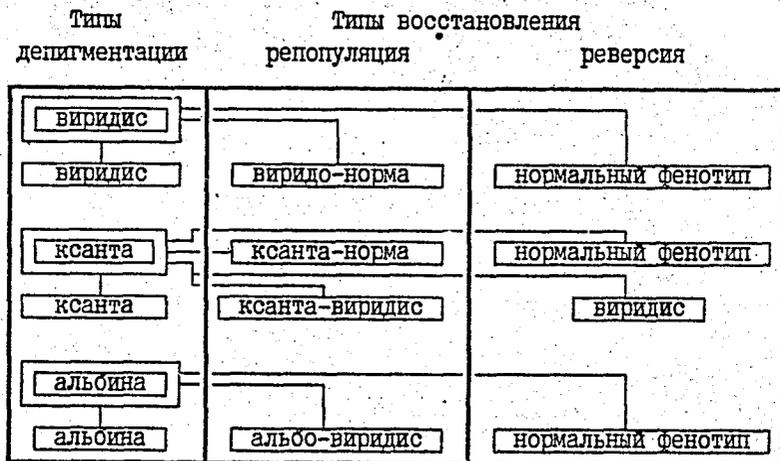


Рис. 1. Схема температурозависимой хлорофильной депигментации и характера ее восстановления:   - фенотип при температуре 35°C,   - фенотип при температуре 25°C.

И, действительно, (рис. 2) в присутствии экзогенной АТФ после снятия температурной нагрузки среди проростков, восстановившихся до нормального фенотипа, увеличивается доля тех, которые при высокой температуре были депигментированы сильнее, т.е. конкурентноспособнее та система восстановления, которая находится в состоянии функционального дефицита. Существование конкурирующих за АТФ метаболических процессов клетки показано в ряде исследований (Бенова, Рупова, 1934; Ankeren, Wheller, 1935; Leff, 1937).

Ростовые реакции. Потенциально летальные проростки. Результаты индуцированного мутационного процесса прослеживались и в отношении интенсивности ростовых процессов. Данные таблицы 5 демонстрируют специфичность действия мутагенных агентов и

возможность ее модификации условиями внутренних и внешних факторов, влияющих на физиологическое состояние проростков третьей генерации. У потомств, полученных на основе совместного использования  $\gamma$ -радиации и химических мутагенов, активность роста проростков ниже по сравнению с потомствами, сформировавшимися на основе химического мутагенеза и в том случае, когда формирование семян проходило в условиях умеренного почвенного питания материнских растений. Можно было ожидать, что активность роста проростков будет выше, когда формирование семян проходило в условиях высокого уровня почвенного питания растений. И это действительно так, но лишь в отношении ряда потомств:  $\gamma$ -,  $\gamma$ +ЭИ-,  $\gamma$ +NaN<sub>3</sub>-потомства. Как показало наше дальнейшее исследование, главным фактором, ограничивающим интенсивность ростовых процессов, является генетический груз популяций, в виде тех или иных нарушений структуры ДНК и хромосом.

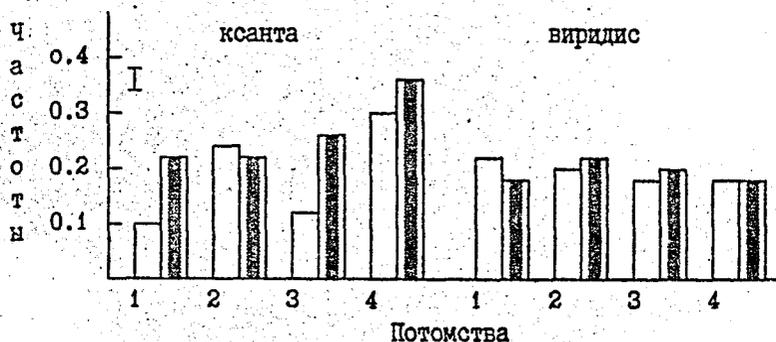


Рис.2. АТФ - зависимое восстановление температурозависимой депигментации проростков. 1 - контроль, 2 -  $\gamma$ +ЭМС-, 3 -  $\gamma$ +ЭИ-, 4 -  $\gamma$ +NaN<sub>3</sub> - потомства. □ - без АТФ, ■ - с АТФ.

Их количество преобладает у  $\gamma$ +ЭМС-,  $\gamma$ +ЭИ- и  $\gamma$ +NaN<sub>3</sub>-потомств при высоком уровне почвенного питания материнских растений, если судить по выходу потенциально летальных проростков, которые выглядят как нежизнеспособные - не формирующие первый настоящий лист при наличии первичного корешка или, напротив, имеющие первый настоящий лист, но не способные сформировать

ровать первичный корешок в 7 - 10 дневном эксперименте. 30-процентное значение потенциально летальных проростков можно рассматривать в качестве пороговой величины, поскольку при данном их количестве доля проростков с нормальной жизнеспособностью снижается в 2 раза.

Таблица 5

Зависимость частоты потенциально летальных и жизнеспособных проростков (> 2.0 см) в  $M_3$ -генерации от фона почвенного питания материнских растений, %

| Потомства            | Фон почвенного питания           |                          |                                  |                          |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|
|                      | высокий                          |                          | умеренный                        |                          |
|                      | потенциально летальные проростки | жизнеспособные проростки | потенциально летальные проростки | жизнеспособные проростки |
| Контроль             | 14.2±2.5                         | 61.4±4.7                 | 10.8±1.1                         | 69.1±2.5*                |
| γ-                   | 9.0±1.6                          | 77.9±4.8                 | 14.2±1.8                         | 70.2±3.1*                |
| ЭМС-                 | 33.7±2.9                         | 34.8±5.5                 | 9.8±2.2***                       | 68.7±4.5***              |
| γ+ЭМС-               | 25.0±2.3                         | 50.4±3.8                 | 14.8±1.8                         | 64.5±2.8***              |
| ЭИ-                  | 14.9±2.1                         | 72.4±3.5                 | 7.6±1.5**                        | 74.2±2.4                 |
| γ+ЭИ-                | 12.0±2.3                         | 69.1±2.2                 | 14.5±1.9                         | 58.1±3.5**               |
| NaN <sub>3</sub> -   | 31.4±2.7                         | 40.8±3.7                 | 8.0±1.3***                       | 77.3±3.2***              |
| γ+NaN <sub>3</sub> - | 8.5±0.8                          | 78.9±3.4                 | 13.7±2.2                         | 67.6±3.1**               |

Примечание. Различия в частотах по фонам почвенного питания значимы при: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ .

Что касается генетического груза, то сохранению его от элиминации способствовал высокий уровень почвенного питания растений. Более широкое манипулирование уровнем почвенного питания в  $M_3$ -генерации позволило установить, что сохранению жизнеспособности растений при высоком уровне генетических пов-

реждений клеток способствует чередование условий "комфорт-дефицит". "Комфарту" ( высокий фон почвенного питания ) и "дефициту" (обедненный фон почвенного питания) адекватно соответствуют реакции толерантности и резистентности, при которых элиминация растений в условиях полевого эксперимента минимальна, и это важно в селекционном отношении.

Как представляется, критерий давления отбора может быть использован для сравнительной оценки эффективности того или иного метода мутагенной обработки семян в отдаленных потомствах панмиктических популяций.

Особенности радиобиологического популяционного фенотипа при индуцированном мутагенезе. Радиочувствительность растений также представляет ценную возможность установить различия между мутантными потомствами, путем модификации лучевого эффекта в пред- и пострадиационный периоды радиобиологического эксперимента (Khilman, 1974; Ганасси, 1976; Хестянкиков, 1979; Hamilton, 1983; Шевченко, Померанцева, 1986)

Радиобиологический эксперимент, выполненный на сухих семенах третьей генерации, показал, что отчетливый, зависимый от кофеина выход потенциально летальных проростков обнаруживался лишь в том случае, если формирование семян проходило в условиях дефицита питания  $M_2$ -растений (рис.3). Такой результат соответствует, в принципе, классическому эффекту пострадиационного восстановления, установленного В.И.Корогодиным ( 1986 ) для диплоидных дрожжей, выдержанных после облучения в стерильной водопроводной воде. Кофеин-зависимость в этом случае предполагает, что пострадиационное восстановление происходит за счет пострепликативной рекомбинационной репарации ДНК.

Отсутствие кофеин-зависимости у семян, сформировавшихся при высоком почвенном питании материнских растений, одновременно низкий уровень радиочувствительности, а также высокий выход потенциально летальных проростков у необлученных семян указывает на то, что в данном случае мы сталкиваемся, скорее, с эффектом радиобиологической толерантности, нежели с собственно репарацией. Толерантность мы рассматриваем как способность растительных тканей функционировать без видимого физиологического напряжения при наличии повреждений ДНК.

Потенциально летальные проростки

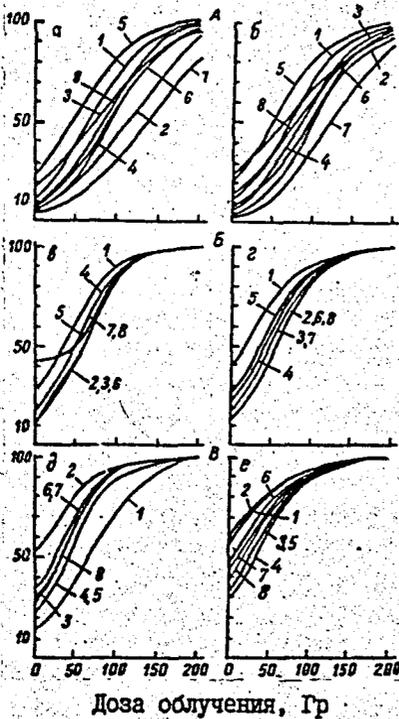


Рис. 3. Радиочувствительность семян овсяницы луговой при различных уровнях почвенного питания N<sub>2</sub>-растений (высокий - А, умеренный -Б, дефицит - В) в отсутствие (а, в, д) и присутствии (б, г, е) кофеина.  
 1.  $\gamma$ +ЭМС-,  
 2.  $\gamma$ +ЭИ-,  
 3.  $\text{NaN}_3$ -,  
 4.  $\gamma$ -,  
 5. ЭМС-,  
 6. ЭИ-,  
 7.  $\gamma$ + $\text{NaN}_3$ -потомства, 8. Контроль

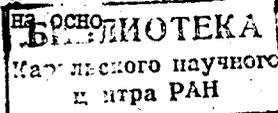
Эксперимент позволил также установить различия в радиочувствительности семян двух групп потомств: полученных на основе комбинированного действия мутагенов и химического мутагена. Кривые доза - эффект оказались в первой группе потомств более пологими, 50-процентное насыщение их по уровню потенциально летальных проростков смещено в область высоких доз ( 100 - 150 Gr ), а выход их на плато у ряда потомств не происходит даже при дозе 200 Gr. В связи с этими различиями, сделано предположение, что индуцированная толерантность тоже модифицируется уровнем генетического груза ( в форме хромосомных нарушений и потенциально летальных проростков ) и что более высокая толерантность свойственна тем потомствам, которые несут меньший генетический груз. Действительно, ранжированному ряду данных по количеству потенциально летальных проростков соот-

ветствует обратный ряд по их радиорезистентности.

Таким образом, проведенная серия радиобиологических экспериментов позволила оценить мутантные потомства по различиям в радиочувствительности и по возможности модифицировать лучевой эффект уровнем почвенного питания материнских растений. При этом обнаружилось такое пострадиационное состояние, которое может быть описано в понятии радиобиологической толерантности. Критерий потенциально летальных проростков, который мы здесь используем, согласуется с радиобиологическим критерием летальности, но представляется более приемлемым в случае работы с семенами перекрестноопыляющихся растений.

Продуктивность и генетический груз. Генетический груз мутантных популяций выступает в качестве центрального фактора наблюдаемых различий в спектре показателей. И даже продуктивность оказалась с ним связанной. У ауткросс- и инцукт-потомств между частотой потенциально летальных проростков и продуктивностью растений (надземной массой) установлена обратная взаимосвязь ( $r_s = -0.64$ ;  $p < 0.05$ ). Определенное своеобразие на эту взаимосвязь накладывает модифицирующее действие условий почвенного питания дочернего поколения. В случае избыточного его уровня, при котором индуцированные генетическим грузом компенсаторные реакции сохраняются, подобная взаимосвязь не наблюдается ( $r_s = 0.29$ ;  $p > 0.05$ ). Компенсаторные реакции могут обслуживать не только вегетативную, но и репродуктивную сферу растений. В нашем случае это выражается в том, что между частотой пигментных мутаций и семенной продуктивностью у инцукт-потомств обнаруживалась положительная взаимосвязь ( $r_s = 0.86$ ;  $p < 0.05$ ). Подобные компенсаторные механизмы постулированы В.А.Струнниковым (1976) в виде компенсационного комплекса генов (ККГ) и на растениях показаны С.А.Гостимским (1987). Данные исследования, а также наш экспериментальный результат позволяют констатировать, что продуктивность у перекрестноопыляющихся растений контролируется пулом хромосомных и генных мутаций, а зависимость продуктивности от генетического груза осуществляется по схеме: генетический груз - компенсаторные реакции (изменение чувствительности к действию физиологических нагрузок) - продуктивность надземной массы и семян.

Интересно отметить, что у потомств, полученных



ве химического мутагенеза, компенсаторные реакции обслуживают, главным образом, вегетативную сферу, а у потомств, полученных на основе действия  $\gamma$ -радиации независимо или совместно с химическими мутагенами, — репродуктивную сферу, и в этом случае мы сталкиваемся со специфическими эффектами индуцированного мутагенеза.

Таким образом, изучение формирования продуктивности и поведения генетического груза показывают, во-первых, что избыточное почвенное питание выступает в качестве условия временной консервации потенциально летальных повреждений; во-вторых, что генетический груз выступает в качестве главного фактора, контролирующего продуктивность растений; в-третьих, что условия культивирования в предшествующей генерации влияют на продуктивность следующей. Все это позволяет сформулировать селекционную стратегию для панмиктических популяций, согласно которой семена, предназначенные для мутагенной обработки лучше брать с посева, находящегося при высоком уровне почвенного питания растений, а селекционную работу на основе индуцированных мутаций выгоднее проводить, чередуя обильно и умеренно удобряемые почвы. Подобная схема позволяет сохранить от отбора еще не реализованные повреждения ДНК и, тем самым, существенно повысить эффективность мутагенеза. Учитывая, что продуктивность надземной массы и семян зависят от условий культивирования растений в предшествующей генерации, семеноводство лучше вести на менее плодородных почвах, чем товарное производство.

## ВЫВОДЫ

1. Изменения морфофизиологического статуса панмиктических популяций, сформированных на мутационной основе, обнаружены:

- по чувствительности растений к уровню почвенного питания;
- по спектру и характеру восстановления температурозависимой хлорофилльной депигментации проростков;
- по чувствительности к веществам — знергоносителям и метаболитам;
- по радиочувствительности.

Этот статус определяется, главным образом, генетическим действием мутагенных агентов при обработке семян.

2. Морфофизиологический контроль позволил оценить мутационный процесс в отношении специфичности его действия. При химическом мутагенезе мутантные потомства оказались чувствительными к изменению уровня почвенного питания и действию радиации. Температурная зависимость физиологически дефектной части проростков характеризовалась менее глубоким типом депигментации, а восстановление шло путем реверсии признака. При комбинированном мутагенезе, напротив, мутантные потомства в этом отношении были менее чувствительны и характеризовались глубокой степенью температурозависимой хлорофилльной депигментации, восстанавливались преимущественно путем клеточной репопуляции. Радиационные потомства отличались как низкой чувствительностью к изменению уровня почвенного питания растений, так и низкой степенью температурозависимой депигментации проростков.

3. Индуцированный мутационный процесс в панмиктических популяциях представляет собой длящееся событие, охватывающее несколько генеративных циклов и характеризующееся сохранением в ряде поколений структурно-генетических повреждений ДНК и хромосом.

4. Скрытый пул аберраций (пигментные мутации и полулетаги) способствуют развитию компенсаторных реакций, которые различны у потомств, сформировавшихся в условиях панмиксии при химическом и радиационном мутагенезе. В первом случае компенсируется вегетативный рост за счет повышения чувствительности к условиям культивирования, во втором - репродуктивная сфера за счет снижения чувствительности к ним.

5. Уровень генетического груза у мутантных потомств поддается регулированию через способ репродукции и условия почвенного питания растений. Критерий давления отбора, отражаемый уровнем элиминации, может быть использован для сравнительной оценки эффективности методов мутагенной обработки семян в отдаленных потомствах панмиктических популяций.

6. Радиобиологическая реакция у семян, оцениваемая через частоту потенциально летальных проростков, зависит от условий выращивания материнских растений и уровня генетического

груза. Обильное почвенное питание повышает их радиорезистентность. Индуцированная радиорезистентность снижается при повышении уровня генетического груза в форме хромосомных нарушений и потенциально летальных проростков.

7. Радиобиологическими исследованиями показано, что репарация радиационных повреждений и клеточная пролиферация представляют собой сопряженные и конкурирующие за источники АТФ процессы, причем конкурентноспособнее тот из них, который находится в функциональном дефиците.

8. Жесткость связей между морфологическими признаками в неблагоприятных условиях среды (дефицит элементов питания, экстремальная температура) может уменьшаться, при этом сохраняются или даже усиливаются те признаки, которые связаны с продуктивностью. И в этом отношении мутантные потомства различались: у радиационного потомства это признаки репродуктивной сферы, у ЭМС-, ЭИ-,  $\text{NaN}_3$ -потомств - вегетативной, а у  $\gamma$ +ЭМС-,  $\gamma$ +ЭИ- и  $\gamma$ + $\text{NaN}_3$ -потомств и той, и другой.

9. Возможности морфофизиологического контроля связаны как с целями и задачами селекции, так и с характером экспрессии тех признаков, на которые направлен отбор. В условиях высокого почвенного питания легко идентифицируются растения сенокосного и эректоидного типов, а при умеренном - пастбищного.

10. На основе использования методов массового отбора и мутационной селекции получены гибриды, сочетающие высокую продуктивность и заморозкоустойчивость.

11. Морфофизиологический контроль на ранних этапах развития растений показал, что признак "масса на побег" эффективен в условиях физиологического экстремума.

12. Из оценки свойств и особенностей мутагенных агентов вытекает, что сорта, отзывчивые на минеральное, питание легче получать на основе химического, а сорта менее пластичные - на основе радиационного и радиационно-химического мутагенеза.

Основные положения диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Олимпиенко Г.С., Титов А.Ф., Лебедева О.Н. Самофертильность как показатель уровня мутирования у овсяницы луговой // Генетика. 1977. Т.Х, № 7. С.1169-1171.

2. Олимпиенко Г.С., Титов А.Ф., Николаевская Т.С., Павлова Н.А., Лебедева О.Н. Температурозависимый хлороз как популяционный признак у овсяницы луговой. 1. Некоторые аспекты экспрессии // Селекционно-генетические исследования многолетних трав. Петрозаводск, 1980. С.17-28.

3. Олимпиенко Г.С., Титов А.Ф., Николаевская Т.С., Павлова Н.А., Лебедева О.Н. Температурозависимый хлороз как популяционный признак у овсяницы луговой. II. Наследуемость. Возможное участие в формировании гетерозиса. Там же. С.26-33.

4. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Харин В.Н. Факторный анализ количественных признаков как метод статистического контроля в селекции перекрестноопыляющихся растений // С.-х. биология. 1983. № 10. С.116-119.

5. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А. Значение генетического груза в радиорезистентности мутантных потомств диплоидных и полиплоидных видов многолетних злаковых трав // Информац. бюлл. по радиобиол. 1985. № 31. С.66-67.

6. Лебедева О.Н. Экспрессия количественных признаков у  $M_2$  ( $F_1$ )-поколения овсяницы луговой при различном уровне плодородия почвы // Многолетние травы. Вопросы селекции и агрономии. Петрозаводск, 1985. С.15-22.

7. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Титов А.Ф. Создание высокопродуктивных и устойчивых к заморозку сортов овсяницы луговой методами экспериментальной селекции в условиях Севера // С.-х. биология. 1985. № 4. С.14-17.

8. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н. Радиорезистентность семян, сформировавшихся при свободном переопылении растений  $M_1$  овсяницы луговой и модифицирующий эффект кофеина // С.-х. биология. 1985. № 11. С.56-59.

9. Лебедева О.Н. Об эффективности индивидуального отбора на продуктивность зеленой массы у овсяницы луговой в  $M_2$  на селектирующих фонах // С.-х. биология. 1987. № 5. С.14-16.

10. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А., Николаевская Т.С., Холощева Н.П. Генетический груз и толерантность растений // Надежность и гомеостаз биологических систем. Киев: Наукова думка. 1987. С.101-111.

11. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А., Николаевская Т.С. Радиочувствительность семян и модифицирующий эф-

фект кофеина при различном уровне питания материнских растений - Радиобиология. 1987. Т.27, вып.3. С.427. / Инст. биол. Кар. филиал АН СССР. Петрозаводск, 1987. 10 с. Деп. в ВИНТИ 29.01.1987 № 688-1387, деп.

12. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А. Проблемы мутационной селекции в панмиктических популяциях многолетних злаковых трав // Индуцированный мутагенез и принципы мутационной селекции многолетних злаковых трав. Петрозаводск, 1988. С.5-25.

13. Лебедева С.Н. Мутационная селекция овсяницы луговой. Генетический груз // Индуцированный мутагенез и принципы мутационной селекции многолетних злаковых трав. Петрозаводск, 1988. С.47-54.

14. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А., Николаевская Т.С. Цитогенетические аномалии в материнских клетках пыльцы овсяницы луговой под влиянием постмутационных условий почвенного питания // С.-х. биология. 1989. № 3. С.136-138.

15. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Николаевская Т.С. Способ оценки посевных качеств семян зерновых и кормовых злаков: А.с. № 1505456 СССР // БИ. 1989. С.4.

16. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н. Влияние экзогенного источника АТФ и глутаминовой кислоты на радиочувствительность семян овсяницы луговой // Вопросы генетики и селекции многолетних злаков. Петрозаводск, 1990. С.23-24.

17. Олимпиенко Г.С., Лебедева О.Н., Павлова Н.А., Николаевская Т.С., Тихов П.В. Растительные популяции и индуцированный мутагенез // Препринт докл. на засед. Президиума КНЦ РАН. Петрозаводск, 1993. 34 с.

*Лебедева*

Сдано в производство 17.01.94г. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Уч.-изд. л. 1,0. Тир. 100 экз. Заказ №4.

РИО КНЦ РАН. Петрозаводск, ул.Пушкинская, 11.