

СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО ПОЛЕВЫХ КУЛЬТУР

Известия ТСХА, выпуск 6, 1986 год

УДК 633.13:576.356:576.3.31

НЕКОТОРЫЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕТРАПЛОИДОВ ЯЧМЕНЯ

Н. А. КОРЯБИН

(Кафедра генетики, селекции и семеноводства полевых культур)

У ряда сортов и разновидностей ди- и тетраплоидных форм ячменя изучались размеры клеток и ядер, число ядрышек в ядрах с целью определения по этим показателям пloidности клеток. Наиболее стабильным оказалось содержание ядрышек в ядре. У диплоидов — 1—3, у тетраплоидов — 1—7 ядрышек.

При работе с полиплоидами растений необходимо постоянно определять основное число хромосом в соматических клетках. Это связано с тем, что в большинстве случаев искусственно полученные полиплоиды, особенно автополиплоиды, склонны возвращаться к пloidности исходных родительских форм. Если регулярно не проводить соответствующего отбора, полученные полиплоидные формы можно потерять [2, 14]. Такое явление наблюдается и у тетраплоидов ячменя [6].

Обычно для определения числа хромосом у пророщенного семени перед посевом берут для цитологического анализа часть корешков, а проросток с оставшимися корешками высаживают в почву. Ячмень прорастает 4—8 корешками, из которых наиболее развиты 3—4 первых, поэтому для анализа можно взять не более 2—3 корешков. Этого часто бывает недостаточно, чтобы найти хорошую метафазную пластинку, где можно точно подсчитать число хромосом.

Для накопления клеток, находящихся в метафазе, перед фиксацией корешки обрабатывают колхицином или другими веществами, блокирующими веретено деления. При работе с полиплоидами данный прием применять нежелательно, поскольку колхицин может вызвать удвоение числа хромосом в клетках, что приведет к ошибочному определению уровня пloidности. Поэтому целью наших исследований было выявить стабильные цитологические признаки у тетраплоидов ячменя, по которым их можно легко отличить от диплоидов, когда не удастся подсчитать число хромосом в соматических клетках.

Методика

Объектами изучения служили ди- и тетраплоидные формы ранее полученных нами разновидностей ячменя: *nutans* (сорта Мами и Надя), *nudum* (Нудум 155), *nigrinudum* и *abyssinicum* [6]. Тетраплоидные формы были представлены селекцией и генетикой Тимирязевской академии. В 1984 и 1985 гг. весь материал (тетраплоиды C_2 , C_4 и C_7 поколений) выращивали на одном участке опытного поля лаборатории селекции и генетики Тимирязевской академии. В 1985 и 1986 г. проведен цитологический анализ собранных семян.

Определяли размеры клеток меристемы корня, наибольший диаметр ядер и количество ядрышек в ядре клеток.

Семена проращивали в чашках Петри при температуре 25°. Корешки длиной 1—

1,5 см фиксировали в фиксаторе Ньюкомера (изопропиловый спирт, пропионовая кислота, диоксан, петролейный эфир, 6 : 3 : 1 : 1 : 1) 1 сутки. Кроме того, для сортов и тетраплоидных форм Надя и Мами применяли фиксатор Карнуа (этиловый спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота, 6 : 3 : 1) и уксусный алкоголь в соотношении 3:1 и 1:1. В дальнейшем зафиксированный материал промывали 80 % спиртом и окрашивали ацетокармином в течение 15 мин, помещая пробирку с корешками и красителем в кипящую воду. Затем готовили давленные препараты, которые исследовали под микроскопом, оборудованным окулярмикрометром при увеличении 1275 раз ($10 \times 85 \times 1.5$) с

применением водной иммерсии. В вариантах было по 10 препаратов, в каждом из них просматривали 10 клеток, в ядрах которых хорошо видны ядрышки. Резуль-

таты обработали статистически с использованием критерия Стьюдента [3].

Период формирования зерна в 1984 г. был умеренно влажным, а в 1985 г. — избыточно влажным.

Результаты

Полиплоидия часто ведет к увеличению размеров клеток растений [2, 5, 7]. Тетраплоиды ячменя не являются исключением из этого пра-

Таблица 1

Размеры клеток меристемы корня (мкм) ди- и тетраплоидов ячменя
(числитель — длина, знаменатель — ширина)

Разновидность, сорт, плоидность	Покоче- ние	1985 г.		1986 г.	
		$\bar{x} \pm s_x$	$t_{\text{факт}}$	$\bar{x} \pm s_x$	$t_{\text{факт}}$
Nutans:					
Надя, 2x	—	17,2±0,7	—	18,1±0,6	—
		14,1±0,6			
» 4x	C ₃	34,3±1,7	20,6	33,4±1,2	11,4
		18,1±0,8	4,0	19,2±0,7	4,5
» »	C ₅	32,3±1,3	10,2	31,3±1,6	7,7
		17,1±0,6	3,7	19,1±0,5	5,2
» »	C ₈	30,1±1,1	9,9	30,4±1,4	8,1
		17,3±0,9	2,9	17,6±0,4	3,6
Мами, 2x	—	19,7±0,6	—	21,2±1,3	—
		16,2±0,8			
» 4x	C ₃	35,3±1,8	8,6	33,3±2,2	4,7
		20,1±0,7	3,6	20,9±0,6	6,3
» »	C ₅	34,3±1,6	8,5	32,8±1,9	5,0
		18,2±0,9	1,7	19,8±0,9	4,1
» »	C ₈	34,6±1,4	9,6	30,3±1,6	4,4
		18,1±0,6	2,1	16,9±0,9	1,5
Nudum, Нудум 155, 2x	—	20,2±0,6	—	18,8±0,8	—
		15,5±0,2			
» 4x	C ₃	35,6±1,8	8,1	33,8±2,3	6,2
		18,4±0,5	5,8	19,2±0,7	5,1
» »	C ₅	35,3±1,5	9,4	32,3±1,6	7,6
		17,2±0,5	3,4	17,8±0,5	4,2
» »	C ₈	32,3±1,3	8,6	31,4±1,2	8,2
		17,7±0,4	5,5	18,2±0,6	4,3
Nigrinudum, 2x	—	16,2±0,4	—	15,4±0,7	—
		12,1±0,6			
» 4x	C ₃	27,2±1,6	4,0	27,6±1,4	4,9
		16,1±0,4	7,7	16,9±0,7	6,0
» »	C ₅	28,3±1,2	9,6	28,1±1,7	7,0
		16,6±0,7	5,3	17,2±0,7	6,3
» »	C ₈	25,5±1,3	6,8	26,3±1,4	6,9
		15,2±0,3	4,6	15,8±0,5	5,8
Abyssinicum, 2x	—	17,1±0,6	—	17,3±0,9	—
		15,4±0,4			
» 4x	C ₃	33,1±2,4	6,1	34,4±2,1	7,6
		18,4±0,5	4,7	17,2±0,7	1,2
» »	C ₅	34,0±1,9	8,5	35,2±1,6	9,4
		18,9±0,7	4,5	17,8±0,6	1,9
» »	C ₈	30,4±2,1	4,7	32,1±1,6	8,2
		18,5±0,5	5,2	16,9±0,8	0,8

При м е ч а н и е . Здесь и далее /факт рассчитано между 2x и 4x формами. При 100 измерениях $t_{05} = 1,98$, $t_{01} = 2,6$, $t_{001} = 3,4$.

Диаметр ядра в клетках меристемы корня (мкм) у ди- и тетраплоидов ячменя

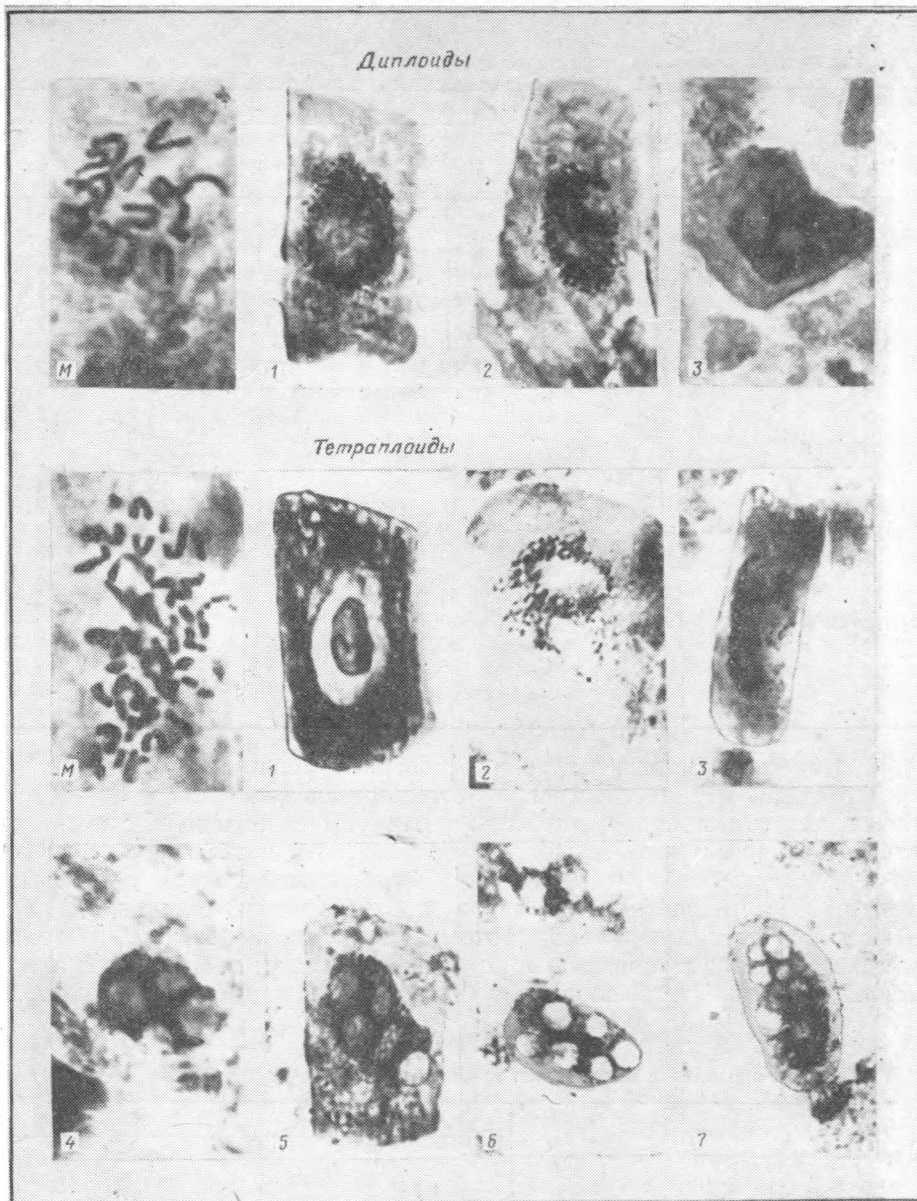
Разновидность, сорт; плоидность	Покolle- ние	1985 г.		1986 г.	
		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$t_{\text{факт}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$t_{\text{факт}}$
Nutans:					
Надя, 2x		10,1±1,7		11,8±1,2	
» 4x	C ₃	15,4±1,4	2,4	16,1±1,5	2,2
* »	C ₅	15,2±1,2	2,5	18,3±1,7	3,1
Надя, 4x	C ₈	16,2±1,1	3,0	15,2±1,2	2,0
Мама, 2x		10,9±1,5	—	11,2±0,9	—
» 4x	C ₃	17,3±1,2	3,3	17,4±1,4	3,7
» »	C ₅	16,2±1,6	2,4	18,1±1,9	3,3
» » 9»	C ₈	15,9±1,5	2,3	15,3±1,6	2,2
Nudum, Нудум 155, 2x		12,6±1,7	—	12,6±0,9	—
» 4x	C ₃	18,4±1,4	2,6	18,2±1,1	3,9
» »	C ₅	18,1±1,6	2,3	19,4±1,3	4,3
» »	C ₈	17,6±1,2	2,4	17,9±1,6	2,9
Nigrinudum, 2x		9,2±1,5	—	10,1±1,3	—
» 4x	C ₃	15,5±1,1	3,5	16,3±1,4	3,2
» »	C ₅	15,7±1,6	2,9	14,2±1,1	2,4
» »	C ₈	14,2±1,8	2,2	13,3±0,8	2,1
Abyssinicum, 2x		10,7±1,6	—	11,9±1,4	—
» 4x	C ₃	16,3±1,4	2,6	17,1±1,2	2,8
» »	C ₅	16,5±1,2	2,9	16,8±1,3	2,5
	C ₈	15,9±1,6	2,3	16,3±1,1	2,4

вила. В наших опытах получены достоверные различия в размерах клеток меристемы корня (табл. 1). У тетраплоидов они были в 1,5—2 раза больше, чем у диплоидов, особенно в длину. Тем не менее данный признак не может служить надежным показателем полиплоидного состояния ячменя, поскольку у многих его тетраплоидных форм проявляется тенденция к уменьшению размеров клеток в старших поколениях по сравнению с ранними, а также потому, что на размеры клеток большое влияние оказывают условия выращивания. Нами отмечено, что при проращивании семян тетраплоидного ячменя при температуре ниже 20°

Таблица 3

Количество ядрышек в клетках меристемы корня у ди- и тетраплоидов ячменя

Разновидность, сорт, плоидность	Покolle- ние	1985 г.		1986 г.	
		$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$t_{\text{факт}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$t_{\text{факт}}$
Nutans:					
Надя, 2x	—	1,4±0,6	—	1,5±0,4	—
» 4x	C ₃	4,2±1,1	2,2	3,7±0,6	3,0
» »	C ₅	4,6±0,8	3,2	4,2±1,0	2,5
» »	C ₈	4,9±0,7	3,8	4,4±1,2	2,3
Мама, 2x	—	1,6±0,5	—	1,6±0,6	—
» 4x	C ₃	4,7±1,3	2,2	4,7±0,9	2,8
» »	C ₅	4,6±1,2	2,3	4,4±0,5	3,6
» »	C ₈	4,8±0,9	3,2	5,1±0,8	3,5
Nudum, Нудум 155, 2x	—	1,3±0,5	—	1,4±0,8	—
» 4x	C ₃	4,2±0,8	3,1	4,1±0,4	3,0
» »	C ₅	4,3±0,7	3,5	3,9±0,6	2,5
» »	C ₈	4,3±0,9	2,9	4,2±0,7	2,6
Nigrinudum, 2x	—	1,4±0,4	—	1,7±0,6	—
» 4x	C ₃	3,7±0,8	2,6	3,6±0,7	2,2
» »	C ₅	3,9±0,7	3,1	3,9±0,5	2,8
» »	C ₈	4,1±0,9	2,7	3,9±0,6	2,6
Abyssinicum, 2x	—	1,3±0,6	—	1,5±0,8	—
» 4x	C ₃	4,6±1,1	2,6	4,3±1,0	2,2
» »	C ₅	4,6±0,8	3,3	4,5±0,7	2,8
» »	C ₈	4,7±0,8	3,4	4,5±0,9	2,5



Метафазные пластинки (М) и количество ядрышек в ядрах (1—7 шт.) диплоидов и тетраплоидов ячменя, ($\times 1275$).

размеры клеток уменьшаются, к тому же становится невозможным найти нормальную метафазную пластинку для подсчета числа хромосом.

Аналогично изменялись в зависимости от пloidности и размеры ядер в клетках меристемы корня (табл. 2). Ядра тетраплоидов оказались в 1,3—1,5 раза крупнее, чем диплоидов. Кроме того, в них содержалось гораздо больше центров конденсации хроматина.

Наиболее стабильный показатель полиплоидного состояния растений — количество ядрышек в ядре [16]. Ядрышко, или нулеола, является производным хромосом. Образованию ядрышка способствует один из участков хромосомы, активно функционирующий в интерфазе и профазе. Этот участок хромосомы называют ядрышковым организатором. Считают, что ядрышко является местом синтеза рибосом и рибосомных РНК [1, 9, 12]. Ядрышковые организаторы находятся в месте образования вторичных перетяжек на хромосоме.

Ячмень содержит 14 хромосом в соматических клетках, две пары которых имеют спутники и вторичные перетяжки [13]. Поэтому диплоиды ячменя теоретически могут иметь 4 ядрышка, а тетраплоиды, содержащиеся в соматических клетках 28 хромосом, — 8.

В наших исследованиях у диплоидов ячменя в ядре обнаружено 1—3 ядрышка, у тетраплоидов — 1—7 (табл. 3, рисунок). Три ядрышка у диплоидов встречается редко, чаще их 1—2. У тетраплоидов обычно 3—4 ядрышка, 7 ядрышек встречается редко. Клетки с 4 ядрышками наблюдались в каждом препарате. Таким образом, если в клетках меристемы корня обнаружены ядра с 4 ядрышками и более, это указывает на полиплоидное состояние данных клеток.

Следует отметить, что при использовании более жестких фиксаторов (Ньюкомера, Карнуа) ядрышки в ядре видны отчетливее, чем при использовании уксусного спирта. Лучшую мацерацию тканей у ячменя обеспечивал фиксатор Ньюкомера.

В центре ядрышка выделяют гранулярный и фибриллярный компоненты, а по периферии — конденсированный хроматин [8—11]. Гранулярный компонент представлен частицами рибонуклеопротеида (РНК + белок), которые близки по химическому составу и строению к рибосомам цитоплазмы, но размеры их меньше. Фибриллярный компонент состоит из нитей рибонуклеопротеида. В ядрышках часто видны округлые светлые зоны — фибриллярные центры, которые состоят из тонкофибрилярного материала [4, 15]. Они являются постоянной структурной частью интерфазного ядрышка. Число их, морфологическое строение и размеры зависят от функционального состояния ядрышка [10, 11]. Ядрышки с сетчатой поверхностью находятся в активном состоянии, фибриллярные центры в них плохо заметны. При естественной или искусственной задержке транскрипции рибосомной РНК и при постепенном расходовании гранулярного рибонуклеопротеида появляются ядрышки с крупными фибриллярными центрами, особенно в клетках тетраплоидов, что свидетельствует о более активной транскрипции рибосомной РНК в ядрышках тетраплоидов, чем у диплоидов.

Таким образом, количество ядрышек в ядре КЯеток ячменя является признаком, определяющим его плоидность. У диплоидов ячменя в ядре клеток содержится 1—3, у тетраплоидов—1—7 ядрышек. Размеры клеток и ядра могут использоваться только как косвенные показатели плоидности ячменя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Восток К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки/Пер. с англ. — М.: Мир, 1981. — 2. Бреславец Л. П. Полиплоидия в природе и опыте. — М.: Изд-во АН СССР, 1963. — 3. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1973. — 4. Зыбина Е. В., Грищенко Т. А., Семенов В. М. Ультраструктура фибриллярного центра в ядрышках ооцитов на стадии диплономы у золотистого хомячка. — Цитология, 1984, Т. XXVI, № 12, с. 1246—1249. — 5. Колесников А. И. Колхицин и получение новых форм сельскохозяйственных растений. — Л.: Колос, 1972. — 6. Корябин Н. А. Получение и хозяйственно-биологическая характеристика тетраплоидных форм ячменя. — Изв. ТСХА, 1983, вып. 3, с. 58—64. — 7. Лаптев Ю. П. Гетероплоидия в селекции растений. — М.: Колос, 1984. — 8. Парфенов В. Н., Дудина Л. М., Костючек Д. Ф., Грузова М. Н. Ультраструктура ядра ооцитов из полостных фолликулов человека. Формирование кариосферы. — Цитология, 1984, Т. XXVI, № 12, с. 1343—1350. — 9. Сто-

ляров С. Д. Выделение и характеристика ядерного матрикса лука *Allium cepa*. — Цитология, 1984, Т. XXVI, № 8, с. 874—877. — 10. Туманишвили Г. Д., Челидзе П. В. Ультраструктура и функции кольцевых ядрышек и фибриллярных центров в процессе клеточной дифференцировки на примере эритробластов печени 12-суточных эмбрионов мыши. — Цитология, 1984, Т. XXVI, № 8, с. 878—885. — 12. Ченцов Ю. С., Поляков В. Ю. Ультраструктура клеточного ядра. — М.: Наука, 1974. — 13. Чугунков А. Т. В., Шевцов И. А., Тарасенко Л. В. Дифференциальная окраска хромосом ячменя. — Цитология и генетика, 1978, Т. XII, № 6, с. 512—515. — 14. Шевцов И. А. Генетические принципы улучшения аутополиплоидных растений. — Киев: Наукова думка, 1976. — 15. Mirre C., Stahl A. — J. Ultrastruct. Res., 1976, vol. 56, p. 186—201. — 16. Georgiev S., Kristeva M., Nicolov N. — Kulturpflanze. 1981, Bd 29, S. 389.