

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

## **ГРУЗ ПИГМЕНТНЫХ МУТАЦИЙ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ РАСТЕНИЙ В ПОТОМСТВАХ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS., СФОРМИРОВАННЫХ НА МУТАНТНОЙ ОСНОВЕ**

**О. Н. Лебедева, Т. С. Николаевская, А. Ф. Титов**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

Представлены результаты исследований груза пигментных мутаций и выживаемости у многолетнего перекрестноопыляющегося злака *Festuca pratensis* Huds. в ближайших и отдаленных от мутагенного воздействия потомствах. Показаны длительность мутационного процесса, нестабильность результатов как по частоте, так и по спектру пигментных мутаций, а также зависимость их фенотипического проявления от уровня выживаемости и условий культивирования растений. Установлены высокая выживаемость и сильное давление стабилизирующего отбора в отношении компонентов выживаемости у мутантных потомств, сформированных на основе действия химических мутагенных агентов.

**Ключевые слова:** индуцированный мутагенез, пигментные мутации, выживаемость, *Festuca pratensis* Huds.

### **O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. PIGMENT MUTATION LOAD AND SURVIVAL RATE OF PLANTS IN *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. MUTATION BASED PROGENY**

The paper presents the results of research into the pigment mutation load and the survival rate in the perennial cross-pollinated grass *Festuca pratensis* Huds. in generations immediately following and remote from the mutation generating impact. Long duration of the mutation process, instability of the results both in terms of the frequency and of the spectrum of pigment mutations, as well as dependence of their phenotypic manifestation on the plants' survival rate and cultivation conditions are demonstrated. High survival rate and strong pressure of stabilizing selection for components of the survival rate were detected in the generations of mutant progeny formed through the action of chemical mutagen agents.

**Key words:** unduced mutagenesis, pigment mutations, survival rate, *Festuca pratensis* Huds.

---

#### **Введение**

Важнейшая проблема индуцированного мутагенеза у высших растений касается специфичности и продуктивности действия мутаген-

ных агентов, длительности генетической нестабильности мутантных популяций, их выживаемости и жизнеспособности, влияния панмиксии. Однако при индуцированном мутагенезе перекрестноопыляющихся видов расте-

ний, в том числе и многолетних злаков, возникают трудности с переводом мутантных генов в гомозиготное состояние. Впервые на это обратил внимание С. Бликст [Blizt, 1976], показав преимущество парного скрещивания мутантного и интактного растений в сравнении с самоопылением и перекрестным опылением обработанных мутагенами растений. Отличия в частотах составили не более 0,5 % при общей частоте выщепляющихся мутантов, равной 1,5–2,0 %. Попытки анализа мутационного процесса у перекрестноопыляющихся видов растений встречаются довольно редко [Drozdová, 1985; Алексеева, Парок, 1989]. Чаще всего мутагенные агенты используются лишь для получения исходного селекционного материала [Будяк, 1971; Писковацкий, 1975; Кремина, Кулешов, 1982].

Целью настоящего исследования явилась оценка величины и характера формирования индуцированного генетического груза (на основе теста «хлорофилльные мутации»), выживаемости растений и действия естественного отбора в отношении компонентов выживаемости в ближайших и отдаленных от мутагенного воздействия потомствах.

## Материал и методы

В качестве объекта исследований использовали диплоидный многолетний перекрестноопыляющийся злак – овсяницу луговую (*Festuca pratensis* Huds.;  $2n = 14$ ). Исследование проводилось на  $M_3$ – $M_5$ -потомствах, сформированных на основе независимого и комбинированного действия физических ( $\gamma$ -излучение) и химических (этилметансульфонат, этиленимин, азид натрия) мутагенных агентов. Доза облучения, концентрации химических мутагенов и последовательность обработки приведены в табл. 1. Растения  $M_1$  культивировали при умеренном фоне почвенного питания растений ( $N_{60}P_{60}K_{60}$ ). Семена, полученные с растений  $M_1$  на основе трех способов опыления (ауткросс, инцухт,

гибридизация), высевали семьями, и в дальнейшем проводили внутрисемейное опыление в течение трех вегетационных периодов. В  $M_2$ – $M_4$ -поколениях внутрисемейное опыление следовало после ауткросса. Оценку выживаемости растений в условиях полевого эксперимента осуществляли при трех уровнях почвенного питания растений: высоком (органические удобрения – 60 т/га +  $N_{120}P_{60}K_{60}$ ), умеренном ( $N_{60}P_{60}K_{60}$ ) и низком (почва не удобрялась).

В лабораторном эксперименте десятидневные проростки  $M_3$ – $M_5$ -поколений, выращенные в фитотроне между двумя слоями влажной фильтровальной бумаги при температуре 25 °С и круглосуточном освещении 96–120  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , оценивали по частоте и спектру пигментных (хлорофилльных) мутаций [Калам, Орав, 1974]. Для каждого способа опыления проанализировано 44–56 семей, для вариантов мутагенной обработки – 1000–7000 проростков.

Оценку выживаемости проводили на основе анализа фертильности пыльцы, всхожести семян, доли выживших проростков и доли растений, достигших репродуктивного развития. Общую выживаемость рассчитывали как произведение компонентов выживаемости в долях [Тимофеев-Ресовский и др., 1977].

Для оценки действия естественного отбора (стабилизирующей формы) вычисляли среднюю арифметическую, а также разность между средним и конкретным значением соответственно для каждого признака. Полученные ряды разностей ранжировали. По диаграммам рядов разностей от средней вычисляли тренды (линии рассеивания) и по углу их наклона (крутизны) устанавливали степень различий между группами индивидуумов (особей) в отношении действия стабилизирующего отбора. Использовали формулу линейной регрессии  $y = a + bx$ , где  $y$  – разность между средним и конкретным значением признака;  $a$  – значение пересечения линии тренда с осью  $Y$ ;  $b$  –  $\text{tg}$  угла наклона линии тренда;  $x$  – номер ранга особи. Отклонения от средних в большинстве слу-

Таблица 1. Способы и условия обработки семян *Festuca pratensis*  $\gamma$ -квантами и химическими мутагенами

Способ мутагенной обработки семян	Доза (концентрация) мутагена, сопутствующие условия
Контроль	Замачивание в дистиллированной воде – 8 часов, отмывка проточной водопроводной водой – 1 час
$\gamma$ -излучение	Облучение сухих семян дозой 30 Гр, 3, 14 Гр/мин, РОКУС 018, $^{60}\text{Co}$ , замачивание, отмывка
Этилметансульфонат (ЭМС)	2%-й раствор, экспозиция 1 час, трисбуфер (pH 7), отмывка
Этиленимин (ЭИ)	0,08%-й раствор, экспозиция 1 час, трисбуфер (pH 7), отмывка
Азид натрия ( $\text{NaN}_3$ )	0,0065%-й раствор, экспозиция 4 часа, глицил-глициновый буфер (pH 3), отмывка
$\gamma$ + ЭМС	Непосредственно после $\gamma$ -облучения семян обработка ЭМС, отмывка
$\gamma$ + ЭИ	Непосредственно после $\gamma$ -облучения семян обработка ЭИ, отмывка
$\gamma$ + $\text{NaN}_3$	Непосредственно после $\gamma$ -облучения семян обработка $\text{NaN}_3$ , отмывка

чаев значительно отличались друг от друга при  $p < 0,05$ , что вместе со значениями коэффициента детерминации позволяет считать результаты статистически достоверными. Все вычисления проведены в программе MS Excel 6 [Кох, 1994].

Статистическую оценку учета мутаций и влияния мутагенной обработки на частоту пигментных мутаций проводили с использованием рангового критерия Фридмана, сравнение долей выборок – по методу Фишера [Зайцев, 1984], оценку взаимных связей – через коэффициент непараметрической корреляции Кендалла [Айвазян и др., 1985].

## Результаты и обсуждение

Для определения частоты индуцированных мутаций у многих видов растений в качестве основного критерия используются видимые рецессивные мутации, связанные с нарушением синтеза хлорофилла, которые могут быть проанализированы уже на стадии проростка [Найлэн, 1967]. В нашем исследовании при выборке 1–7 тыс. проростков по каждому мутантному потомству зависимость выхода частоты хлорофилльных мутантов от способа перевода мутантных генов в гомозиготное состояние (ауткросс, инцухт, гибридизация) статистически не подтвердилась. Одной из возможных причин является то, что один и тот же мутантный фенотип контролируется не единственным генным локусом. Очевидно, этим же объясняется и наличие семей, неустойчиво выщепляющих мутации в течение трех лет наблюдений (табл. 2).

Для контроля над величиной груза мутаций был выбран внутрисемейный инцухт, следующий после ауткросса. При таком чередо-

вании способов опыления отчетливо проявляются и сохраняются на протяжении трех генераций различия между потомствами, полученными на основе воздействия химическими мутагенами и комбинированного применения их с  $\gamma$ -радиацией. Как показали исследования, для получения наибольшего количества мутаций в ранних генерациях предпочтительнее следующее чередование типов опыления: инцухт соцветия в  $M_1$ , а затем инцухт семей  $M_2$ -растений (рис. 1).

Наибольшая частота хлорофилльных мутаций (20–30-кратное превышение над контролем) в нашем, как и в ряде других исследований [Heiner et al., 1960; Blizt et al., 1963; Gustafsson, 1963], наблюдалась у растений  $M_3$ -потомств, сформированных на основе действия алкилирующих монофункциональных соединений (этиленимин, этилметансульфонат). В случае применения  $\gamma$ -излучения и азида натрия отмечено 7–10-кратное превышение частоты мутаций над контролем. Комбинированное использование  $\gamma$ -излучения с алкилирующими соединениями по тесту «хлорофилльные мутации»

Таблица 2. Выщепление пигментных мутаций в  $M_3$ -поколении при различных способах опыления растений *Festuca pratensis*

Способ опыления	Проанализировано семей	Семьи, выщепляющие мутации, %		
		всего	устойчиво	неустойчиво
Ауткросс $M_1$ , инцухт семей $M_2$	56	30,4	16,1	14,3
Гибридизация $M_1$ , инцухт семей $M_2$	44	34,1	13,6	20,5
Инцухт соцветия $M_1$ , инцухт семей $M_2$	47	44,7	12,8	31,9

Таблица 3. Зависимость частоты пигментных мутаций у  $M_3$ – $M_5$ -проростков от способа мутагенной обработки семян

Потомства	$M_3$ -проростки				$M_4$ -проростки				$M_5$ -проростки			
	Проанализировано проростков	Частота мутаций в долях $1 \times 10^{-2}$	$P_1$	$P_2$	Проанализировано проростков	Частота мутаций в долях $1 \times 10^{-2}$	$P_1$	$P_2$	Проанализировано проростков	Частота мутаций в долях $1 \times 10^{-2}$	$P_1$	$P_2$
Контроль	3424	0,12			1802	0,72			1542	0,52		
$\gamma$ -потомство	3306	1,24	>0,001		4152	1,67	>0,01		2153	1,25	>0,05	
ЭМС-	4590	2,70	>0,001	>0,001	3211	1,46	>0,05	>0,001	2683	5,03	>0,001	>0,001
$\gamma$ + ЭМС-	5162	0,78	>0,001		814	3,69	>0,001		2181	0,50	<0,05	
ЭИ-	6672	3,22	>0,001	>0,001	1479	1,49	>0,05	>0,05	1459	1,30	>0,05	>0,001
$\gamma$ + ЭИ-	3827	0,13	<0,05		1519	1,05	<0,05		2071	11,25	>0,001	
$NaN_3$ -	3382	0,83	>0,001	>0,01	1973	3,96	>0,001	>0,001	3338	1,50	>0,001	>0,01
$\gamma$ + $NaN_3$ -	5650	0,48	>0,001		2056	0,63	<0,05		999	2,60	>0,001	

Примечание.  $p_1$  – достоверность различий между контролем и мутантными потомствами;  $p_2$  – достоверность различий между мутантными потомствами: «химический мутаген» и « $\gamma$ -облучение + химический мутаген».

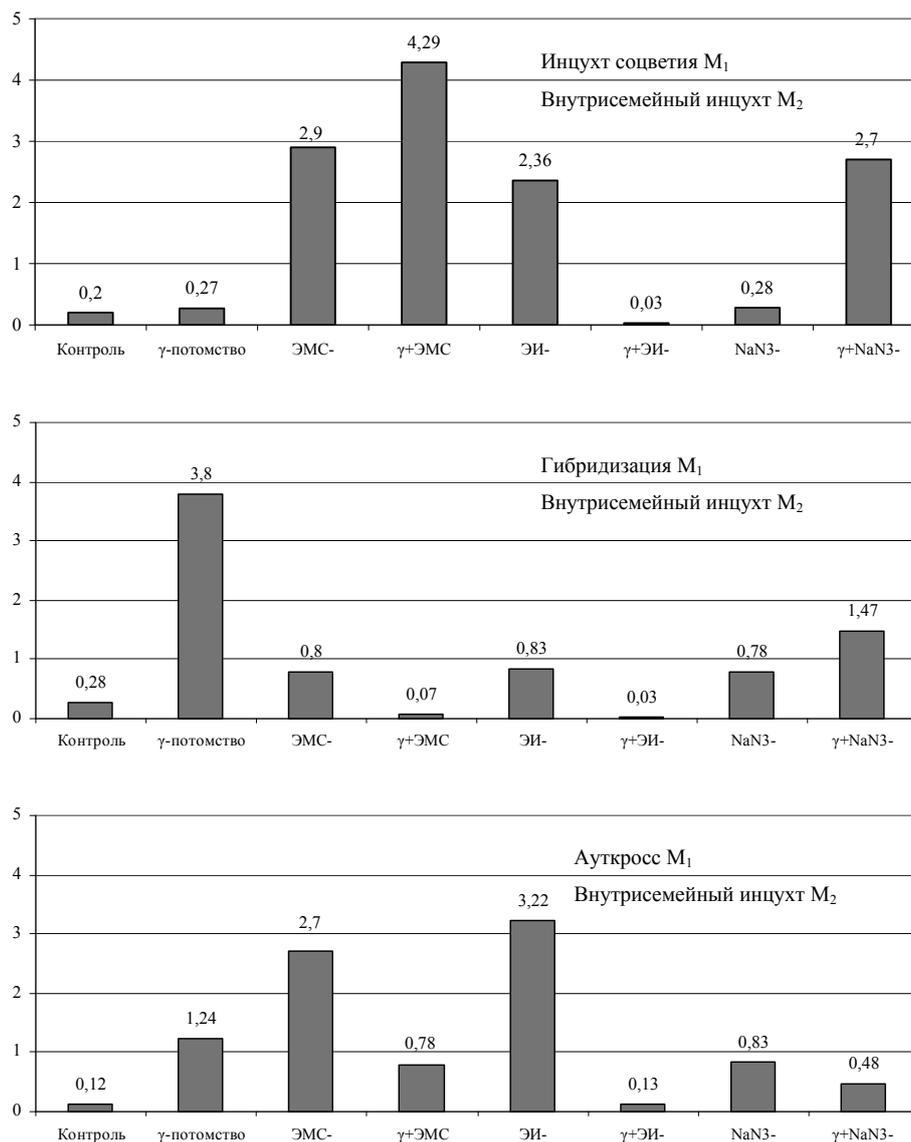


Рис. 1. Зависимость частоты пигментных мутаций от способа опыления у M<sub>3</sub>-мутантных потомств:

по оси ординат – частота пигментных мутаций, %; по оси абсцисс – потомства

или не давало эффекта (результат не превышал контроль), или он был не столь значительным: 4–6-кратное повышение (табл. 3).

По данным нашего анализа этот последний результат связан с элиминацией растений уже в первых генерациях после комбинированной обработки семян мутагенами, и в варианте γ + ЭИ-потомства особенно высокой. Элиминация растений и частота пигментных мутаций оказались количественно связаны, но лишь в пределах двух следующих друг за другом генераций (M<sub>2</sub>–M<sub>3</sub>). Как оказалось, уровень элиминации растений в мутантных популяциях поддается регулированию через уровень почвенного питания. «Комфорту» (высокий фон почвенного питания) и дефициту (обедненный фон почвен-

ного питания) адекватно соответствуют реакции толерантности и резистентности, при которых элиминация растений в условиях полевого эксперимента минимальна. Чередование условий «дефицит – комфорт» или «комфорт – дефицит» сохраняет выживаемость растений при высоком уровне генетических повреждений клеток, и это важно в селекционном отношении (табл. 4).

Анализ частоты пигментных мутаций M<sub>4</sub>- и M<sub>5</sub>-поколений показал существование у мутантных потомств долгоживущих потенциальных генетических повреждений ДНК, постепенно переходящих в реальные (табл. 3). Возможно, именно поэтому экспериментальные данные двух последующих генераций (M<sub>3</sub>–M<sub>4</sub>; M<sub>4</sub>–M<sub>5</sub>) у

Таблица 4. Элиминация растений *Festuca pratensis* в зависимости от характера мутагенной обработки семян и условий выращивания в M<sub>1</sub>–M<sub>5</sub>-поколениях, %

Потомство	Фон почвенного питания материнских растений в двух последующих поколениях						
	умеренный, M <sub>1</sub> высокий, M <sub>2</sub>	высокий, M <sub>2</sub> высокий, M <sub>3</sub>	высокий, M <sub>2</sub> умеренный, M <sub>3</sub>	умеренный, M <sub>1</sub> умеренный, M <sub>2</sub>	умеренный, M <sub>2</sub> умеренный, M <sub>3</sub>	умеренный, M <sub>3</sub> умеренный, M <sub>4</sub>	умеренный, M <sub>4</sub> умеренный, M <sub>5</sub>
Контроль	7	2	0	6	5	0	12
γ-потомство	2	2	0	10	0	0	12
ЭМС-	5	0	2	8	0	0	6
γ + ЭМС-	0	11	0	14	0	0	10
ЭИ-	5	5	2	8	0	0	20
γ + ЭИ-	4	14	0	22	0	0	30
NaN <sub>3</sub> -	3	5	0	14	0	0	12
γ + NaN <sub>3</sub> -	3	5	0	4	0	0	4

ЭМС-, γ + ЭМС-, ЭИ-, NaN<sub>3</sub>-потомств характеризуются простой закономерностью: ниже частота хлорофилльных мутаций в предшествующей генерации и выше – в последующей. Эта закономерность не относится к γ-потомству, показывающему по пигментным мутациям стабильные результаты в M<sub>3</sub>–M<sub>5</sub> генерациях. В вариантах γ + ЭИ- и γ + NaN<sub>3</sub>-потомств частота мутаций возрастала от M<sub>3</sub>- к M<sub>5</sub>-поколению. Превышение частоты пигментных мутаций над контролем в M<sub>5</sub>-поколении составило 2–7-кратный уровень у потомств, полученных на основе действия химических мутагенов, и 5–20-кратный уровень – при комбинированном применении их с γ-радиацией (табл. 3). Общее количество мутаций, выщепляющихся у мутантных потомств, возрастает от M<sub>3</sub>-, M<sub>4</sub>- к M<sub>5</sub>-генерации (соответственно 9,38; 13,95 и 23,43 %), что указывает на значительную величину генетического груза в отдаленных от мутагенного воздействия потомствах, скрытого от действия отбора, вероятнее всего, высоким уровнем гетерозиготности перекрестно-опыляющихся растений. Оценка варьирования частоты пигментных мутаций по поколениям у 7 мутантных потомств показала, что оно существенно и статистически значимо ( $\chi^2 = 12,25$ ;  $p < 0,01$ ). Увеличение частоты пигментных мутаций к M<sub>5</sub>-поколению привело к снижению выживаемости растений и возрастанию их элиминации, особенно высокой у ЭИ- и γ + ЭИ-потомств (табл. 4). Таким образом, полученные результаты показывают, что процессы изменения величины груза пигментных мутаций и выживаемости растений носят волнообразный характер со сдвигом максимума частот на одно-два поколения.

Аддитивный эффект совместного действия γ-радиации и химических мутагенов при используемых способах обработки, дозе γ-излучения и концентрациях химических мутагенов по тесту «пигментные мутации» не выявлен. Одна из причин отсутствия аддитивного эффекта при комбинированном применении

мутагенных агентов может быть связана с развитием реакции адаптивного ответа – индукционной формы репарации ДНК, направленной против повреждений, обусловленных алкилированием [Samson, Cairns, 1977]. Изучение радиочувствительности растений M<sub>3</sub>-потомств с использованием кофеина позволило выявить у них реакцию адаптивного ответа [Олимпиаенко, Павлова, 1990]. Кривые дозовой зависимости по уровню клеточной пролиферации имели различные формы у потомств, полученных на основе действия химических мутагенов и комбинированного применения γ-излучения и алкилирующих соединений. Для первой группы потомств характерны кривые доза – эффект с максимумом в середине, а не в начале диапазона доз. Данные, полученные с использованием кофеина, отчетливо указывают, что подобная реакция относится к классу адаптивных: форма кривой, отражающей наличие адаптивного ответа, утрачивается и приобретает альтернативный характер.

Спектр пигментных мутаций в группе M<sub>3</sub>-потомств, сформированных на основе действия алкилирующих агентов, был шире, чем у γ-потомства, и в количественном отношении преобладал мутантный тип *viridis*. Совместное использование мутагенных агентов изменяло соотношение основных типов мутаций: у γ + ЭМС-потомства превалировали мутации *albina*, у γ + NaN<sub>3</sub>-потомства отмечен более широкий спектр мутаций, чем при независимой обработке, спектр мутаций у γ + ЭИ-потомства обеднен (рис. 2). У M<sub>4</sub>-потомств (по сравнению с M<sub>3</sub>) произошло изменение спектра депигментации проростков: он расширился у NaN<sub>3</sub>-, γ + ЭМС- и γ-потомств и сузился у ЭИ- и γ + NaN<sub>3</sub>-потомств. Наибольшее колебание частот у всех потомств отмечено по основному мутантному типу *viridis* и по количеству мутантных проростков с фенотипом *albina*. Число потомств, имеющих более глубокий тип депигментации – *xantha* и комбинированные фенотипы, увеличилось (табл. 5).

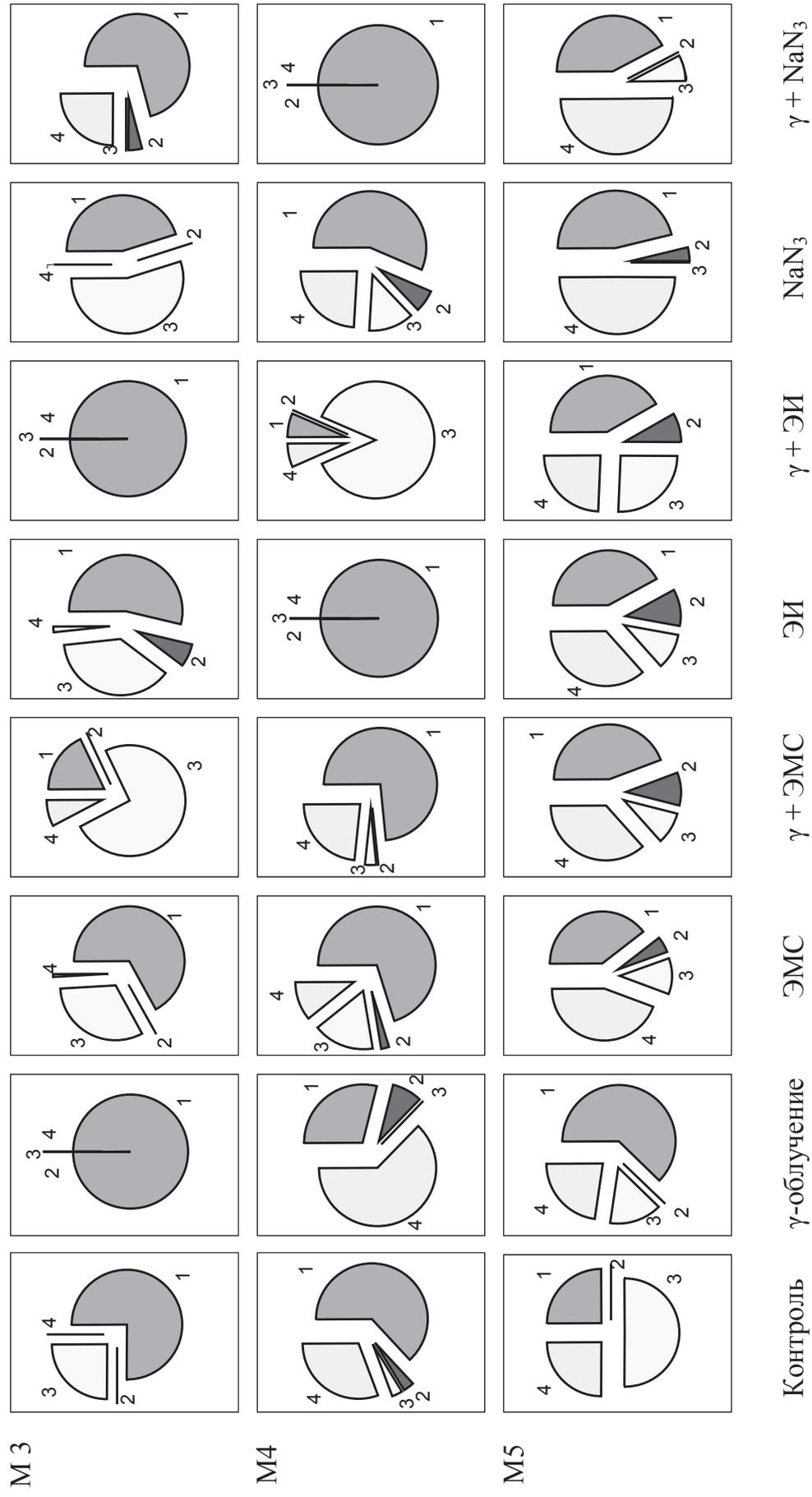


Рис. 2. Частота и спектр отдельных классов пигментных мутаций у мутантных потомств  $M_3$ – $M_5$ -поколений:  
 1 – *viridis*, 2 – *xantha*, 3 – *albina*, 4 – комбинированные фенотипы. Мутантные потомства:  $\gamma$ -облучение, ЭМС,  $\gamma$  + ЭМС, ЭИ,  $\gamma$  + ЭИ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\gamma$  +  $\text{NaN}_3$

Таблица 5. Общее число мутантных классов пигментных мутаций в  $M_3$ – $M_5$ -поколениях *Festuca pratensis*

Потомство	Поколение		
	$M_3$	$M_4$	$M_5$
Контроль	2	5	3
$\gamma$ -потомство	1	5	7
ЭМС-	4	4	12
$\gamma$ + ЭМС-	3	4	6
ЭИ-	5	1	6
$\gamma$ + ЭИ-	1	3	11
$NaN_3$ -	2	5	8
$\gamma$ + $NaN_3$ -	4	1	6

В  $M_5$ -поколении у мутантных потомств увеличивается не только частота пигментных мутаций, но и сохраняется тенденция расширения фенотипического спектра за счет *xantha*, *albina* и комбинированных фенотипов, что, на наш взгляд, связано с отсутствием в  $M_3$ – $M_4$ -поколениях элиминации растений, несущих нежизнеспособные мутации (рис. 2). В целом спектр хлорофилльных мутаций, так же как и их частота, характеризуется значительным варьированием результатов у всех мутантных потомств на протяжении трех генераций. Немногочисленные данные литературы также показывают нестабильность результатов в  $M_2$ - и  $M_3$ -поколениях у многолетних перекрестноопыляющихся злаков *Phleum pratense* L. и *Festuca pratensis* Huds. как по частоте пигментных мутаций, так и по отдельным фенотипическим классам [Blitz, 1976; Drozdová, 1985].

Оценка специфичности и продуктивности действия физических и химических мутагенов в отношении пигментных мутаций является одним из дискуссионных и нерешенных вопросов мутагенеза у высших растений. В работах Найлона и Конзака [Nilan, Konzak, 1961] химические мутагены (ДЭС, ЭМС и ЭИ) индуцировали у ячменя большее количество мутаций с фенотипом *viridis* и *xantha* и меньшее – с фенотипом *albina*, чем рентгеновское и  $\gamma$ -облучение. Авторы сделали такой вывод, опираясь на большое число полученных мутантных типов, использованных для анализа мутационных спектров. Аналогичные данные в отношении алкилирующих соединений получены на ячмене и другими исследователями [Ehrenberg et al., 1961; Gustafsson, 1963]. Отличия в спектрах пигментных мутаций авторы связывают с различиями как в частоте индуцированных хромосомных aberrаций, так и/или в фертильности растений.

Показана также зависимость фенотипического спектра от целого ряда внешних факторов, прежде всего, температурных условий выращивания растений [Hallquist, 1924; Collins, 1937; Nybom, 1955; Hänsel, 1960; Gaul, 1964].

В приведенных исследованиях специфичность действия физических и химических мутагенов оценивалась, как правило, лишь в одном:  $M_2$ - или  $M_3$ -поколении, об условиях их культивирования не сообщалось.

Анализ спектра пигментных мутаций в отношении специфичности действия  $\gamma$ -излучения и химических мутагенов, проведенный нами на трех последовательных мутантных поколениях, показывает, что выщепление отдельных типов мутаций у потомств, полученных на основе действия  $\gamma$ -излучения и алкилирующих соединений, колеблется от поколения к поколению (рис. 2). Статистическая оценка этого события для фенотипа *viridis*, который дает наибольшую частоту, выявила отсутствие влияния показателя «потомства» (генетических особенностей мутантных потомств, связанных с действием физических и химических мутагенных агентов) на его проявление ( $\chi^2 = 8,94$ ;  $p > 0,05$ ). В то же время сила влияния показателя «поколение» (генотипических особенностей мутантных потомств в каждом поколении и условий их культивирования) оказалась существенной ( $\chi^2 = 390,0$ ;  $p < 0,001$ ).

Приведенные результаты позволяют предположить, что специфичность действия мутагенов обусловлена, вероятнее всего, процессами внутриклеточного характера, не имеющими прямого отношения к реакции отдельных локусов на действие мутагенов. Преимущественное появление определенных мутантных фенотипов зависит не только от первичного генетического акта, т. е. взаимодействия мутагена и ДНК, но и от тех последствий, которые вносят активность ферментов репарации, наличие предшественников репарационного синтеза ДНК, процессы трансляции, размножение клеток, несущих мутации, и внешние условия: температура, кислород, почвенное питание растений. Таким образом, при оценке специфичности действия физических и химических мутагенов важно не только достаточно большое количество отдельных типов пигментных мутаций, но необходим и анализ спектра пигментных мутаций в ряде мутантных поколений, а также контроль за условиями выращивания растений.

Алкилирующие мутагенные агенты в нашем исследовании (ЭМС и ЭИ) оказались более продуктивны, чем  $\gamma$ -излучение, в отношении индуцированных пигментных мутаций: их количество (в сумме за три поколения), несмотря на колебания частот по поколениям, в 1,5–2 раза больше, чем у  $\gamma$ -потомства.

Следует отметить существование взаимосвязи спектра пигментных мутаций с мор-

фологическими мутациями, характеризующими жизнеспособность растений и являющимися ценными в селекционном отношении. Например, частота хлорофилльных мутаций у гороха и ячменя часто коррелирует с частотами других мутаций (эректоидные и карликовые мутанты, стерильные и полустерильные формы), что важно при теоретическом и практическом обосновании мутационной селекции [Lefort, 1959; Heringa, 1964; Ахунд-Заде, Хвостова, 1966; Сидорова, 1966; Валева, 1967; Орав и др., 1972]. У гороха расширение спектра хлорофилльных мутаций сопровождалось разнообразием морфологических мутаций, хотя автор не отрицает случаев, когда положительная зависимость между частотой пигментных и морфологических мутаций отсутствовала [Сидорова, 1966].

В  $M_2$ -поколении нами был выделен морфологический мутант эректоидного типа (компактный узел кущения, небольшое количество репродуктивных побегов и его средняя толщина, темно-зеленые с восковым налетом вертикально расположенные листья, компактная, реже полураскидистая метелка, крупные семена), но только при высоком уровне почвенного питания растений. Частота их у мутантных потомств оказалась незначительной:  $\gamma$ -потомство – 0,01, ЭМС-потомство – 0,02, ЭИ-потомство – 0,06. В последующем эректоиды были выделены только в  $M_6$ -поколении.

Между частотой пигментных мутаций, показателями жизнеспособности (фертильность пыльцы, всхожесть семян, масса 1000 семян) и репродуктивной способностью растений (масса семян на растение) в  $M_3$ – $M_5$ -поколениях не выявлено отрицательных корреляций. Это обусловлено гибелью хлорофилльных мутантов, не способных к восстановлению уже на ранних этапах развития в полевых условиях. Генетический груз в форме пигментных мутаций оказал негативное влияние лишь на формирование массы 10-дневных проростков (табл. 6).

Таблица 6. Взаимосвязь пигментных мутаций с показателями жизнеспособности и выживаемости у  $M_3$ – $M_5$ -потомств *Festuca pratensis*

Показатель жизнеспособности	Потомство		
	$M_3$	$M_4$	$M_5$
Фертильность пыльцы	0,07	0,07	0,29
Всхожесть семян	0,26	–0,05	–0,55*
Надземная масса, г/растение	0,07	0,29	–0,36
Масса семян, г/растение	0,86*	0,04	–0,11
Масса 1000 семян	–0,21	–	0,75*
Масса 100 проростков	–0,64*	–0,64*	–0,71*

Примечание. Значение коэффициента непараметрической корреляции по Кэндаллу значимо при  $p < 0,05$ .

Изучение общей выживаемости панмиктических популяций, представленной частотами жизнеспособных особей на разных этапах онтогенетического развития растений трех последовательных генераций ( $M_3$ – $M_5$ , 15 лет наблюдений), показало, что она выше у мутантных потомств, сформированных на основе действия химических мутагенных агентов, чем у потомств, сформированных на основе комбинированного их действия с  $\gamma$ -радиацией (табл. 7). Максимальные различия в выживаемости двух групп мутантных потомств выявлены в годы с наиболее благоприятными условиями произрастания растений. Величины относительной выживаемости (в сравнении с контрольной популяцией) указывают на развитие компенсационных реакций, обеспечивающих повышенную выживаемость растений только у потомств, сформированных на основе действия химических мутагенных агентов. Аналогичные эффекты в выживаемости мутантных особей тутового шелкопряда и растений гороха были получены ранее и объяснялись авторами формированием у них компенсационного комплекса генов [Струнников, 1974; Гостимский и др., 1987].

Оценка действия естественного (стабилизирующего) отбора в отношении растений с естественным и индуцированным генетическим грузом представляет особый интерес [Шмалгаузен, 1969; Алтухов, 2003]. Анализ ранжированных отклонений от среднего арифметического значения выживаемости и жизнеспособности растений на разных этапах онтогенеза (фертильность пыльцы, всхожесть семян, частота выживших проростков, частота растений, достигших репродуктивного развития) показал, что интенсивность стабилизирующего отбора на протяжении пяти поколений определяется типом мутагенеза (радиационный, химический) и способом использования мутагенов (простая и комбинированная обработка) (рис. 3). В отношении мутантных потомств, сформированных на основе простой обработки семян химическими мутагенами (ЭИ, ЭМС,  $NaN_3$ ), стабилизирующий отбор действует более жестко для всех изученных признаков (пологие линии трендов), по сравнению с потомствами, сформированными на основе комбинированного их действия с  $\gamma$ -радиацией (более крутые линии трендов).  $\gamma$ -потомства характеризуются наиболее жестким давлением стабилизирующего отбора. В контроле действие стабилизирующего отбора проявляется в меньшей степени, чем у мутантных потомств.

Таким образом, анализ пигментных мутаций при описании количественных и качественных эффектов действия мутагенных агентов (как в

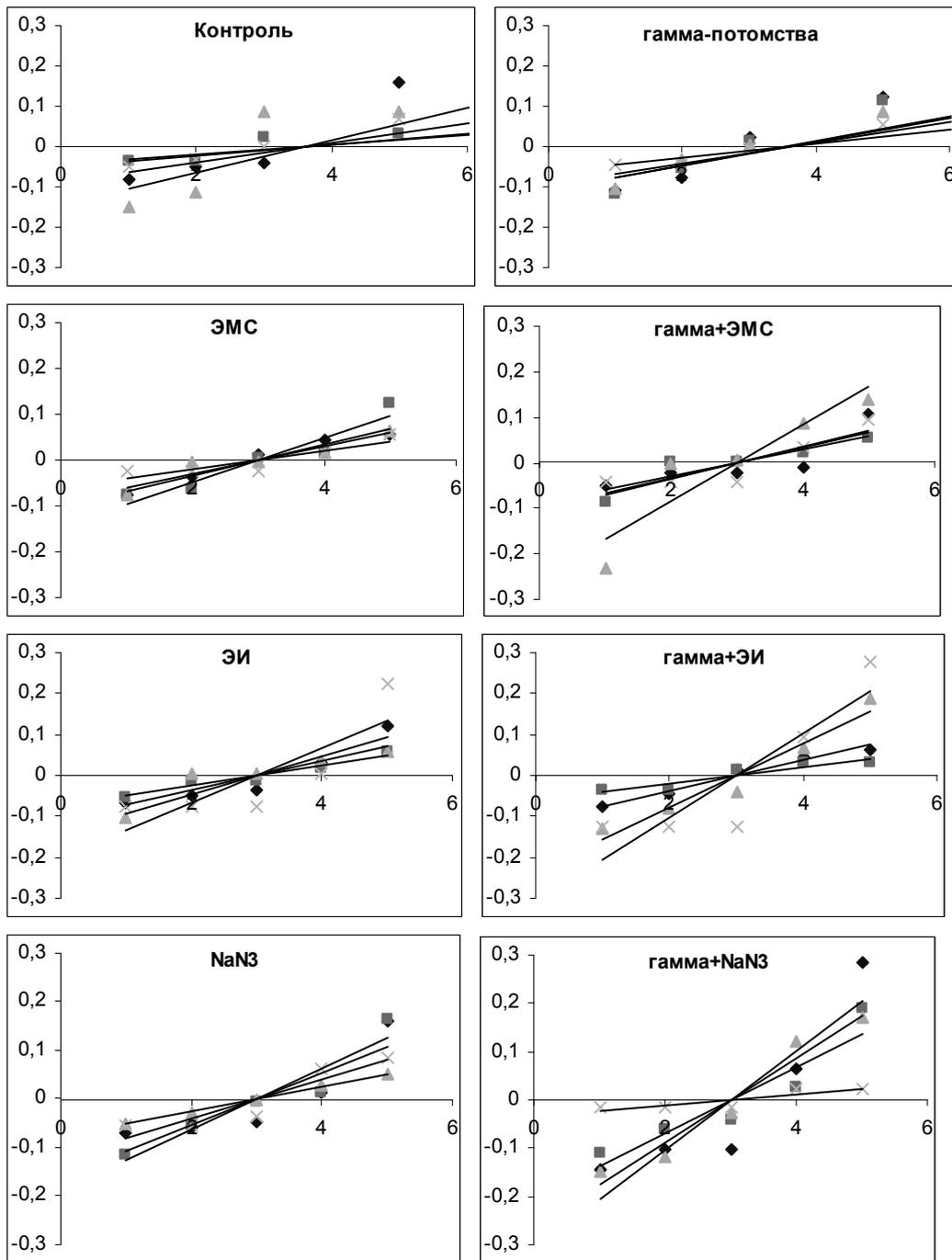


Рис. 3. Выживаемость растений мутантных потомств *Festuca pratensis*, выраженная в отклонениях значений от средней арифметической:

◆ – фертильность пыльцы; ■ – всхожесть; ▲ – частота выживших растений; × – частота растений, достигших репродуктивного развития. По оси ординат – отклонения от средних значений признаков; по оси абсцисс – номер ранга значения признака

отношении их природы: химические и физические мутагены, так и способа их использования – простое и комбинированное действие) у многолетних перекрестноопыляющихся злаков на примере *Festuca pratensis* Huds. показал их высокую генетическую продуктивность и выраженную нестабильность результатов от

поколения к поколению. Существенное влияние на частоту пигментных мутаций оказывает элиминация растений в ранних мутантных поколениях, а переход мутаций в гомозиготное состояние вызывает в свою очередь снижение выживаемости в более поздних поколениях. Общая выживаемость панмиктических попу-

Таблица 7. Выживаемость растений *Festuca pratensis* в M<sub>3</sub>-M<sub>5</sub>-мутантных потомствах на разных этапах онтогенеза

Признак	Мутантные потомства							
	контроль	γ-потомство	ЭМС-	γ + ЭМС-	ЭИ-	γ + ЭИ-	NaN <sub>3</sub> -	γ + NaN <sub>3</sub>
M <sub>3</sub> -потомство								
Фертильность пыльцы	0,86	0,69	0,82	0,91	0,96	0,85	0,91	0,92
Всхожесть семян	0,88	0,90	0,89	0,89	0,88	0,86	0,88	0,88
Частота выживших проростков	0,69	0,70	0,76	0,63	0,74	0,58	0,77	0,61
Частота растений, достигших репродуктивного развития	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Общая выживаемость	<b>0,50</b>	0,43	<b>0,55</b>	0,51	<b>0,63</b>	0,42	<b>0,62</b>	0,49
M <sub>4</sub> -потомство								
Фертильность пыльцы	0,89	0,89	0,95	0,88	0,94	0,94	0,90	0,88
Всхожесть семян	0,94	0,73	0,97	0,78	0,88	0,84	0,94	0,86
Частота выживших проростков	0,69	0,66	0,81	0,77	0,77	0,81	0,85	0,81
Частота растений, достигших репродуктивного развития	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Общая выживаемость	<b>0,58</b>	0,43	<b>0,75</b>	0,53	<b>0,64</b>	<b>0,64</b>	<b>0,72</b>	0,61
M <sub>5</sub> -потомство								
Фертильность пыльцы	0,85	0,92	0,91	0,88	0,93	0,91	0,89	0,88
Всхожесть семян	0,94	0,96	0,96	0,80	0,92	0,91	0,66	0,63
Частота выживших проростков	0,69	0,78	0,83	0,68	0,72	0,70	0,79	0,66
Частота растений, достигших репродуктивного развития	0,88	0,92	0,96	0,92	0,70	0,60	0,88	0,96
Общая выживаемость	<b>0,49</b>	<b>0,63</b>	<b>0,70</b>	0,44	<b>0,43</b>	0,35	0,41	0,35
Общая выживаемость (среднее по 3 генерациям)	<b>0,52</b>	0,50	<b>0,67</b>	0,49	<b>0,57</b>	0,47	<b>0,58</b>	0,48
Относительная выживаемость (контроль) (среднее по 3 генерациям)	<b>1</b>	0,96	<b>1,29</b>	0,94	<b>1,10</b>	0,90	<b>1,12</b>	0,92

ляций, представленная частотами жизнеспособных особей на разных этапах онтогенетического развития, выше у мутантных потомств, сформированных на основе действия химических мутагенных агентов, чем у потомств, сформированных на основе комбинированного их действия с γ-радиацией. Величины относительной выживаемости указывают на развитие компенсационных реакций, обеспечивающих повышенную выживаемость растений, только у потомств, сформированных на основе действия химических мутагенных агентов. Стабилизирующий отбор действует более жестко в отношении всех компонентов выживаемости мутантных потомств, сформированных на основе простой обработки семян химическими мутагенами, γ-потомства характеризуются наиболее жестким давлением стабилизирующего отбора. Полученные в настоящем исследовании данные дополняют и углубляют теоретические представления о роли генофондов и условий произрастания в выживаемости растительных популяций и расширяют возможности направленной селекции.

## Литература

Айвазян С. А., Енюков И. С., Мешалкин Л. Д. Прикладная статистика. Исследование зависимостей. М., 1985. 472 с.

Алексеева Е. С., Парок В. А. Закономерности мутационного процесса у гречихи // Тез. докл. 1-го Всесоюз. радиобиол. съезда (Москва, 21–27 авг., 1989 г.). Пушино, 1989. Т. 5. С. 1169–1170.

Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М.: Академкнига, 2003. 431 с.

Ахунд-Заде А. И., Хвостова В. В. Цитогенетический анализ мутагенного эффекта ионизирующей радиации и алкилирующих соединений у гороха // Генетика. 1966. № 6. С. 47–54.

Будяк В. Т. Использование химических мутагенов для создания перспективного исходного материала ковра безостого (*Bromus inermis* Leyss.) // Химический мутагенез и селекция. М., 1971. С. 327–333.

Валеза С. А. Принципы и методы применения радиации в селекции растений. М.: Атомиздат, 1967. 87 с.

Гостимский С. А., Хартина Г. А., Багрова А. М. Селекция гороха на высокую комбинационную способность на фоне полуплетального рецессивного гена хлорофильной недостаточности // Докл. АН СССР. 1987. Т. 294, № 5. С. 1228–1232.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984. 424 с.

Калам Ю., Орав Т. Хлорофильная мутация. Таллин: Валгус, 1974. 60 с.

Кох О. Microsoft Excel 5.0. СПб.: ВНВ-Санкт-Петербург, 1994. 270 с. (Koch O. MS Excel 5.0. ВНВ-Verlag, 1994. 270 s.)

Кремина А. А., Кулешов Г. Ф. Создание стерильных линий ежи сборной на основе источников стерильности, индуцированных химическими мутагенами

ми // Улучшение культурных растений и химический мутагенез. М., 1982. С. 210–215.

Найлэн Р. А. Природа индуцированных мутаций у высших растений // Генетика. 1967. № 3. С. 3–21.

Олимпиев Г. С., Павлова Н. А. Радиобиологический критерий в мутационной селекции растений: адаптивные радиобиологические реакции при индуцированном мутагенезе // Вопросы генетики и селекции многолетних злаков. Петрозаводск, 1990. С. 35–43.

Орав Т., Шаньги-Березовский Г., Орав И. Радиационный мутагенез и модифицирующие его условия. Таллин, 1972. 198 с.

Писковацкий Ю. М. Использование химических мутагенов в селекции ежи сборной // Кормопроизводство. Вып. 11. М., 1975. С. 162–167.

Сидорова К. К. Хлорофильные мутации как показатель различий в мутабельности сортов гороха // Генетика. 1966. № 6. С. 81–87.

Струнников В. А. Возникновение компенсационного комплекса генов – одна из причин гетерозиса // Журн. общей биол. 1974. Т. 35. № 5. С. 666–677.

Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. Краткий очерк теории эволюции. М., 1977. 297 с.

Шмальгаузен И. И. Проблемы дарвинизма. Л.: Наука, 1969. 494 с.

Blizt S. Mutation induction in *Phleum* // *Agri Hortique Genetica*. Landstryck, 1976. Vol. 34. P. 58–82.

Blizt S., Ehrenberg L., Gelin O. Studies of induced mutation in peas. VII. Mutation spectrum and mutation rate of different mutagenic agents // *Agr. Hort. Genet.* 1963. Vol. 21. P. 178–216.

Collins J. L. A low temperature type of albinism in barley // *J. Heredity*. 1937. Vol. 18. P. 331–334.

Drozdová A. I. Proměnlivost výnosových a jakostních ukazatelů u kostřavy luční (*Festuca pratensis* Huds.) a

její ovlivnění N-metyl-N-nitrozomochovinou (NMM) // *Aut. dis. kand. zem.-lesn. věd.* Brno, 1985. 20 с.

Ehrenberg L., Gustafsson A., Lundqvist U. Viedle mutante induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens // *Hereditas*. 1961. Vol. 47. P. 243.

Gaul H. Mutations in plant breeding // *Radiat. Bot.* 1964. Vol. 4. P. 155–232.

Gustafsson A. Productive mutations induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens // *Hereditas*. 1963. Vol. 50. P. 211–263.

Hallquist C. Chlorophyllmutanten bei Gerste // *Hereditas*. 1924. Vol. 5. P. 49–83.

Hänsel H. Beobachtungen über albinotische und virescente Chlorophyllaberranten und deren Nachkommen bei Gerste (*Hordeum vulgare* convar. *distichon*). // *Z. für Vererbungslehre*. 1960. Vol. 91. P. 358–372.

Heiner E., Konsak C. F., Nilan R. A., Legault R. R. Diverse ration of mutation to chromosome aberration in barley treated with diethyl sulphate and gamma rays // *Proc. nat Acad. Sci. USA*. 1960. Vol. 46. P. 1215–1221.

Heringa R. Mutation research in peas // *Euphytica*. 1964. Vol. 13. P. 330–336.

Lefort M. Etude de quelques mutants chlorophylliness induits chez *Lycopersicum esculentum* Mill. // *Revue de cytologie et de biologie vegetales*. 1959. Vol. 20. P. 3–144.

Nilan R. A., Konzak C. F. Increasing the efficiency of mutation induction // *Mut. and Plant Breed.* Washington, 1961. 437 p.

Nybohm N. The pigment characteristics of chlorophyll mutations in barley // *Hereditas*. 1955. Vol. 41. P. 483–498.

Samson L., Cairns J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli* // *Nature*. 1977. Vol. 267. P. 281–283.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

### Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 774682

### Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: nikol@bio.krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 573107

### Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, чл.-корр. РАН, д. б. н.  
Институт биологии Карельского научного центра РАН  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: krcras@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 769710

### Lebedeva, Olga

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian  
Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: lebedeva@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 774682

### Nikolaevskaya, Tatyana

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian  
Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: nikol@bio.krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 573107

### Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian  
Academy of Science  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: krcras@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 769710