

IV. ГЕНЕТИКА ПОПУЛЯЦИИ

ЦИТОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДНК
В СПЕРМИЯХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РЕДИСА И ИХ ГИБРИДА

Н. А. Максюк, С. И. Нарбут, А. Ф. Смирнов

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Цитофотометрический анализ окрашенных по Фельгену спермиев инбредных линий редиса выявил у них ослабление окраски по сравнению с сортом, из которого они выделены. Это, как обычно и принято, трактуется как уменьшение содержания ДНК в них (Полякова и др., 1971). Однако ослабление интенсивности окраски при реакции Фельгена, которое является результатом образования хромофора, т. е. комплекса ДНК-фуксин-сернистая кислота, может указывать не только на уменьшение количества ДНК, но и на измененное ее состояние (Ringertz, 1969; Gledhill, 1970).

Можно предположить, что в связи с особым функциональным состоянием спермиев растений линий их ДНК находится в более дисперсном виде и при реакции Фельгена частично теряется во время гидролиза (Данилина и др., 1965; Дженсен, 1965, и др.). Кроме того в зависимости от разного функционального состояния хроматина (наличия или отсутствия тех или иных белковых фракций) может измениться число мест, доступных для красителя, что также сказывается на интенсивности окраски (Ringertz, 1969).

Следовательно, с чем связано отмеченное явление снижения интенсивности фельгеновской окраски спермиев в пыльцевых зернах линий редиса в сравнении с сортом, неясно. Выяснение этого явилось одной из задач настоящего исследования. Второй задачей было выяснение вопроса о наличии связей между качеством спермиев и жизнеспособностью полученного от них потомства, так как уменьшение количества ДНК или изменение ее состояния может иметь значение для его структуры и жизнеспособности.

Материал и методика. Материалом служили гомозиготные линии редиса из Петергофской генетической коллекции лаборатории генетики и цитогенетики растений Биологического института ЛГУ (Нарбут, 1966, 1967).

Исследованы 3 инбредные линии, выделенные из сорта Сакса: родственные линии с высокой степенью инбредной депрессии: ЛС-337/24- I_{10} и ЛС-337/25- I_{11} и линия ЛС-43/51- I_{14} , у которой депрессия почти отсутствует, гетерозисное по ряду признаков F_1 межлинейного гибрида от скрещивания линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25. Исследованы также ранее изученные на этот предмет, но при несколько измененной методике (Полякова и др., 1971) депрессивная линия ЛВ-269- I_{13} и сорт Вировский белый, от которого она получена.

У каждой из перечисленных форм от пяти растений в один и тот же срок (29 июля 1970 г.) фиксировали (по Карнуа 3:1) два крупных бутона, накануне распускания. Окрашивание проводили по Фельгену.

Гидролиз вели в 3N HCl при температуре 30° С. Для каждой из форм экспериментально устанавливали оптимальное время гидролиза, которое находили по максимальной интенсивности окраски спермия. С этой целью гидролиз каждой из форм проводили в 6 вариантах, различающихся по времени с интервалами в 15 мин (45, 60, 75, 90, 105, 120). Исследования проводили на давленных препаратах, в глицерине.

Интенсивность окраски спермиев определяли в лаборатории экспериментальной цитологии БиНИИ ЛГУ на цитоспектрофотометре марки «Jena» К. Цейс двухволновым методом при длине волны 480 и 539μ постоянным зондом диаметром в 5μ, полностью охватывающим спермий. Площадь спермия вычисляли по формуле $S = \frac{\pi d_1 \cdot d_2}{4}$, где d_1 и

d_2 — диаметры спермия. Оптическую плотность и содержание хромофора вычисляли по формулам, общепринятым для двухволновой цитофотометрии (Дейч, 1969; Гарсиа и Иорио, 1969; Мендельсон, 1969).

Результаты исследования. У редиса, как и у других представителей рода *Raphanus* L., деление генеративной клетки происходит в пыльцевом зерне и зрелая пыльца, как правило, трехъядерная.

При исследовании в пыльце на препаратах отчетливо были видны два спермия и вегетативное ядро, редко встречались и исключения. Отдельные пыльцевые зерна некоторых форм имели три, четыре и даже пять спермиев. Встречались также деформированные и крупные, вероятно, диплоидные пыльцевые зерна. Для цитофотометрических измерений брали только нормальную зрелую, трехъядерную пыльцу.

Сравнительную характеристику исследованных форм вели по сумме содержания ДНК в обоих спермиях пыльцевого зерна, хотя и имеются некоторые данные, полученные на ржи (Маханец и Лысюк, 1967) и редисе (Полякова и др., 1971; Нарбут и др., 1971), указывающие на различия по содержанию хромофора между спермиями одного и того же пыльцевого зерна.

Площадь спермиев определяли на основе измерений их диаметров на препаратах. Это определение не выявило различий между исследуемыми формами. Средняя площадь спермиев пыльцевого зерна оказалась практически одинаковой, так как ее показатели лежат в пределах $8,2^2 - 8,5^2$ ($P < 0,05$). Это дало право на основании данных измерения оптической плотности судить о содержании ДНК (Бродский, 1966).

Результаты измерений средней оптической плотности спермиев бутона у линии ЛС-337/24 указывают на их значительную изменчивость (табл. 1). Коэффициент варьирования этого показателя в большинстве случаев составляет около 50%. В разных бутонах растения средняя оптическая плотность спермиев в большинстве случаев также довольно сильно варьирует. У отдельных растений она изменяется слабо. Сходные результаты по изменчивости этого показателя получены и для других исследованных форм. Значительное варьирование средней оптической плотности спермиев пыльцевого зерна в бутоне указывает, что взятые для измерения однородные по морфологии пыльцевые зерна, как и их спермии, физиологически различны.

Цитофотометрическое исследование спермиев растений инбредной линии ЛВ-269 обнаружило меньшую интенсивность окраски по Фельгену в сравнении со спермиями сорта Вировский белый, из которого выделена эта линия. Оптическая плотность спермиев ЛВ-269 при 90 мин гидролиза составляет $0,064 \pm 0,0083$ единицы, а у сорта Вировский белый — $0,1260 \pm 0,0106$. Сходные данные для этой линии и сорта при времени гидролиза, оптимальном для сорта, были получены и в опытах Т. Ф. Поляковой и др. (1971), при использовании другой методики.

Исходя из литературных данных об особенностях реакции Фельгена и возможности использования времени гидролиза при определении содержания ДНК как инструмента для исследования функциональных и морфологических параметров окрашиваемого материала, нами были построены кривые зависимости интенсивности окраски от времени гидролиза и для каждой из исследуемых форм определено оптимальное время гидролиза, при котором с ДНК связывается наибольшее количество красителя и обнаруживается более интенсивная окраска спермия. В случае, когда при определении средней оптической плотности окрашенных по Фельгену спермиев и определении содержания

Таблица 1

Средняя оптическая плотность спермиев пыльцевого зерна ЛС-337/24 в зависимости от бутона и растения (гидролиз 90 мин)

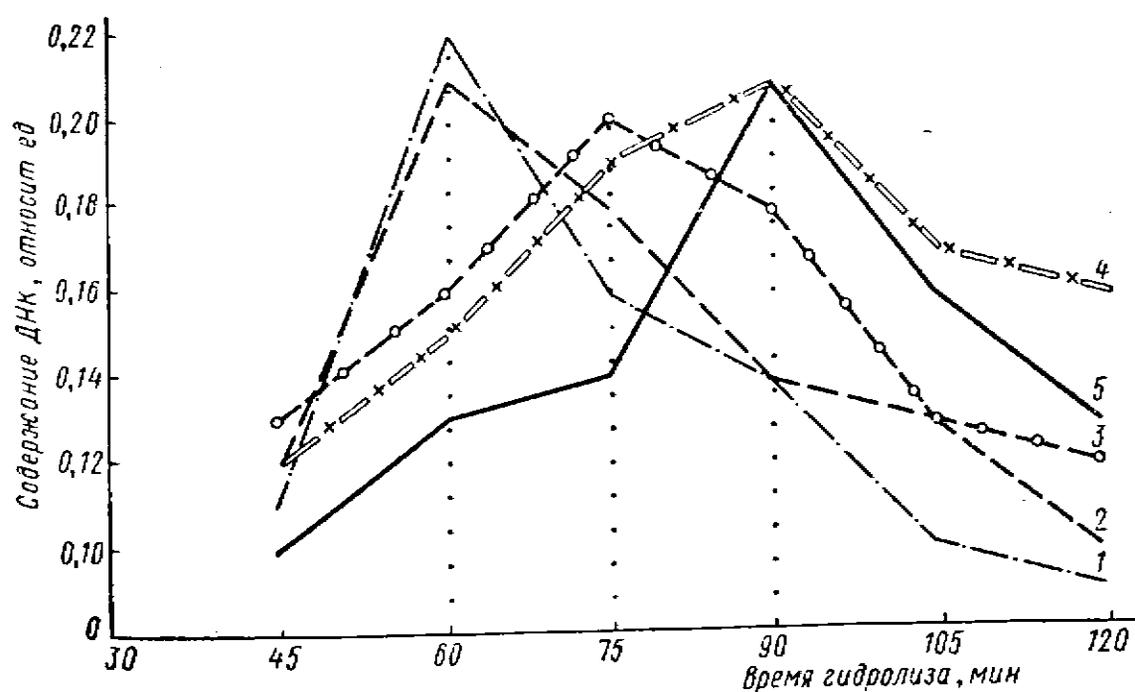
Растение	Бутон	Число исследованных пыльцевых зерен	Оптическая плотность	Коэфф. варьирования
2	I	22	$0,071 \pm 0,0087$	$56 \pm 8,4$
	II	22	$0,070 \pm 0,0093$	$53 \pm 8,0$
	Среднее . . .		$0,070 \pm 0,0063$	$55 \pm 5,8$
4	I	25	$0,074 \pm 0,0050$	$33 \pm 4,7$
	II	24	$0,078 \pm 0,0095$	$58 \pm 8,4$
	Среднее . . .		$0,076 \pm 0,0053$	$48 \pm 4,9$
5	I	24	$0,071 \pm 0,0080$	$54 \pm 7,8$
	II	20	$0,073 \pm 0,0068$	$41 \pm 6,5$
	Среднее . . .		$0,072 \pm 0,0052$	$47 \pm 5,0$
8	I	23	$0,082 \pm 0,0081$	$52 \pm 7,6$
	II	25	$0,078 \pm 0,0061$	$38 \pm 5,4$
	Среднее . . .		$0,080 \pm 0,0055$	$48 \pm 4,8$
9	I	20	$0,056 \pm 0,0058$	$46 \pm 7,3$
	II	22	$0,075 \pm 0,0046$	$28 \pm 4,2$
	Среднее . . .		$0,065 \pm 0,0037$	$37 \pm 3,9$
Среднее для линии			$0,074 \pm 0,0024$	$49 \pm 0,7$

в них хромофора не учитывалось оптимальное время гидролиза для каждой из форм в отдельности, результаты получены иные (табл. 2). При времени гидролиза 90 мин, оптимальном для сорта Сакса, интенсивность окраски спермиев и содержание хромофора у линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25 оказались значительно ниже, чем у сорта Сакса ($P \ll 0,001$), что отмечалось и для линии ЛВ-269. У линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25 эти показатели значительно ниже, чем у линии того же сорта ЛС-43/51, которая по оптической плотности и содержанию хромофора в спермиях, при данном времени гидролиза, очень слабо отличается от сорта и межлинейного гибрида. Все это говорит, что в результате инбридинга под влиянием процесса гомозиготизации сорт Сакса дифференцировался на линии, которые различаются между собой и отличны от сорта не только морфологическими признаками, но и цитохимическими показателями, характеризующими спермии. Последнее могло быть обусловлено или уменьшением количества ДНК, или изменением состояния молекул ДНК спермиев.

Из анализа данных, полученных с использованием разного времени гидролиза при реакции Фельгена, видно, что оптимальное время гидролиза линий, с одной стороны, и гибрида и сорта — с другой, не совпадает (рисунок). Если у инбредных линий наибольшая интенсивность окраски выявляется при 60—75 мин гидролиза, то у гибрида и

Средний показатель хромофора в спермиях линий, гибрида и сорта редиса при разном времени гидролиза
(в относительных единицах)

Название материала	Время гидролиза, мин	Исследовано пылевых зерен	Оптическая плотность	Содержание ДНК
ЛС-337/24 I_{10}	45	47	$0,059 \pm 0,0054$	$0,11 \pm 0,024$
	60	66	$0,116 \pm 0,0081$	$0,22 \pm 0,029$
	75	45	$0,083 \pm 0,0053$	$0,16 \pm 0,023$
	90	227	$0,074 \pm 0,0024$	$0,14 \pm 0,011$
	105	47	$0,058 \pm 0,0047$	$0,10 \pm 0,016$
	120	44	$0,049 \pm 0,0043$	$0,09 \pm 0,015$
ЛС-337/25 I_{11}	45	49	$0,067 \pm 0,0066$	$0,12 \pm 0,024$
	60	49	$0,112 \pm 0,0080$	$0,21 \pm 0,030$
	75	47	$0,098 \pm 0,0048$	$0,18 \pm 0,019$
	90	236	$0,077 \pm 0,0020$	$0,14 \pm 0,010$
	105	48	$0,069 \pm 0,0046$	$0,13 \pm 0,014$
	120	47	$0,056 \pm 0,0026$	$0,10 \pm 0,011$
ЛС-43/51 I_{14}	45	48	$0,067 \pm 0,0037$	$0,13 \pm 0,013$
	60	49	$0,088 \pm 0,0057$	$0,16 \pm 0,021$
	75	50	$0,106 \pm 0,0050$	$0,20 \pm 0,022$
	90	149	$0,093 \pm 0,0044$	$0,18 \pm 0,020$
	105	44	$0,071 \pm 0,0040$	$0,13 \pm 0,017$
	120	45	$0,064 \pm 0,0030$	$0,12 \pm 0,013$
ЛС-337/24 \times ЛС-337/25 F_1	45	48	$0,063 \pm 0,0045$	$0,12 \pm 0,019$
	60	47	$0,084 \pm 0,0054$	$0,15 \pm 0,024$
	75	47	$0,099 \pm 0,0063$	$0,19 \pm 0,028$
	90	202	$0,112 \pm 0,0032$	$0,21 \pm 0,017$
	105	49	$0,090 \pm 0,0054$	$0,17 \pm 0,020$
	120	47	$0,087 \pm 0,0061$	$0,16 \pm 0,022$
Сорт Сакса	45	44	$0,059 \pm 0,0046$	$0,10 \pm 0,020$
	60	48	$0,069 \pm 0,0076$	$0,13 \pm 0,029$
	75	48	$0,074 \pm 0,0041$	$0,14 \pm 0,016$
	90	95	$0,116 \pm 0,0193$	$0,21 \pm 0,025$
	105	45	$0,090 \pm 0,0074$	$0,16 \pm 0,016$
	120	45	$0,071 \pm 0,0068$	$0,13 \pm 0,021$



Содержание ДНК в спермиях линий, гибрида и сорта редиса при разном времени гидролиза.

1 — ЛС-337/24; 2 — ЛС-337/25; 3 — ЛС-43/51; 4 — ЛС-337/24 \times ЛС-337/25; 5 — сорт Сакса.

сорта, в том числе и сорта Вировский белый, только при 90 мин. У линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25 оптимум связывания красителя достигается в самое короткое время гидролиза, т. е. через 60 мин, тогда как у линии ЛС-43/51, которая представляет уже I_{14} , оптимум лежит между оптимумом других линий и сортом и составляет 75 мин.

После достижения максимума интенсивности окраски при дальнейшем гидролизе наблюдается снижение показателя оптической плотности, связанное, очевидно, с процессом разрушения и вымывания ДНК. В результате, при самом длительном времени гидролиза (120 мин) самые низкие показатели имеют спермии линий, у которых оптимальное время гидролиза оказалось наименьшим.

При сравнении данных, характеризующих оптическую плотность и содержание хромофора в спермиях и полученных при оптимальном времени гидролиза для каждой из форм, достоверных различий между линиями, гибридом и сортом не обнаружено ($P \gg 0,05$). Максимальное содержание хромофора в этом случае варьирует в пределах 0,18—0,21, а показатель оптической плотности — 0,106—0,116 единиц (рисунок).

Таким образом, полученные в этих опытах данные позволяют прийти к заключению, что у всех исследованных форм, различающихся многими признаками (Нарбут, 1966, 1967), спермии на пыльцевое зерно в среднем имеют практически одинаковое количество ДНК, но является это при разном времени гидролиза.

Итак, с помощью кривых гидролиза нам удалось установить различия между линиями и сортом, но эти различия, по-видимому, связаны не с уменьшением содержания ДНК, а с изменением состояния молекул ДНК в спермиях под влиянием инбридинга.

Фертильность, автофертильность и продуктивность характеризуют жизнеспособность растений. У инбредных линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25 по большинству этих показателей обычно и в год проведения эксперимента наблюдается снижение в сравнении с линией ЛС-43/51 и особенно сильное в сравнении с сортом и гибридом (табл. 3 и 4). Эти результаты могут рассматриваться как показатель депрессии, вызываемой инбридингом. Вместе с тем в высокой степени гомозиготная линия ЛС-43/51 (I_{14}) является настолько сбалансированной линией, что ни по одному из этих показателей (фертильности, автофертильности и продуктивности) не проявляет подобной депрессии. Следовательно, инбредная депрессия есть показатель не общей гомозиготности, а гомозиготности по определенным генам, ведущим к депрессии.

Первое поколение гибрида от скрещивания линий ЛС-337/24 и ЛС-337/25 по фертильности и автофертильности значительно превосходит обе родительские линии, а потомство гибрида, у которого материнской формой была линия ЛС-337/25, оказалось гетерозисным и по продуктивности. Отсутствие гетерозиса по продуктивности в потомстве гибрида реципрокной комбинации связано с низким абсолютным весом гибридных семян этой комбинации. В годы, когда удается получать хорошо выполненные семена, гибридное потомство и этой комбинации скрещивания обнаруживает гетерозис по продуктивности.

Сопоставление этих результатов с полученными при определении содержания ДНК в спермиях пыльцевого зерна позволяет отметить связь между показателями, характеризующими жизнеспособность растений исследованных форм и их оптимальным временем гидролиза. Гомозиготным линиям ЛС-337/24 и ЛС-337/25 со значительной инбредной депрессией, выражающейся в пониженной жизнеспособности растений, соответствует самый меньший оптимальный срок времени гидролиза (60 мин.). У другой гомозиготной линии ЛС-43/51, по данным этих и других опытов, почти не обнаруживающей депрессии, оптимальный

срок гидролиза несколько больший. Он лежит в пределах между сроком гидролиза, с одной стороны, сорта и гибрида, а с другой — линий, отличающихся резко пониженной жизнеспособностью. У гетерозиготных генотипов сорта и межлинейного гибрида с высокой жизнеспособностью максимальная интенсивность окраски спермиев наблюдалась и при наибольшем времени гидролиза.

Подобный параллелизм обнаруживается при сравнении жизнеспособности исследованных форм с показателями, характеризующими содержание хромофора, но полученными в варианте опыта, где использовалось для всех линий одинаковое время гидролиза, оптимальное для сорта. В этом случае наименьшее содержание хромофора имеют также спермии линий с наиболее высокой степенью инбредной депрессии, а спермии сорта и гибрида с высокой жизнеспособностью имеют и более высокое содержание хромофора.

Таблица 3

Фертильность и автофертильность исследованных форм редиса

Название материала	Число растений	Число изолиров. или этикетор. бутонов	Инбридинг		Свободное опыление	
			Процент завязавшихся стручков	Число семян на стручок	Процент завязавшихся стручков	Число семян на стручок
ЛС-337/24 I_{10}	39	3120	$8,6 \pm 0,50$	$1,9 \pm 0,12$	$42,3 \pm 0,78$	$3,7 \pm 0,13$
ЛС-337/25 I_{11}	25	2000	$15,5 \pm 0,81$	$2,5 \pm 0,15$	$65,8 \pm 1,06$	$3,1 \pm 0,09$
ЛС-43/51 I_{14}	21	1680	$50,0 \pm 1,22$	$3,4 \pm 0,22$	$81,9 \pm 0,94$	$4,5 \pm 0,17$
ЛС-337/24 \times	10	820	$32,6 \pm 1,64$	$4,1 \pm 0,29$	$84,4 \pm 1,26$	$8,0 \pm 0,26$
\times ЛС-337/25 F_1	12	960	$11,8 \pm 1,04$	$2,1 \pm 0,26$	$88,0 \pm 1,05$	$4,3 \pm 0,43$
Сорт Сакса						

Таблица 4

Продуктивность инбредных линий, F_1 гибрида и сорта редиса (1970 г.)

Название материала	Вес растения*, г			Вес корнеплода*, г		
	$\bar{x} \pm m$	в % к сорту	t_{diff} к сорту	$\bar{x} \pm m$	в % к сорту	t_{diff} к сорту
ЛС-337/24 I_{10}	$6,9 \pm 0,19$	48	8,3	$4,3 \pm 0,14$	44	10,4
ЛС-337/25 I_{11}	$21,3 \pm 0,64$	148	7,4	$15,3 \pm 0,82$	157	5,8
ЛС-43/51 I_{14}	$23,9 \pm 0,85$	163	8,7	$16,1 \pm 0,64$	163	7,9
ЛС-337/24 \times	$21,6 \pm 0,65$	150	7,7	$16,7 \pm 0,71$	172	8,1
\times ЛС-337/25 F_1						
ЛС-337/25 \times	$30,2 \pm 1,47$	209	10,1	$24,1 \pm 1,31$	248	10,3
\times ЛС-337/24 F_1						
Сорт Сакса Попул.	$14,4 \pm 0,67$	100	—	$9,7 \pm 0,50$	100	—

* $n = 55 - 60$.

Таким образом, устанавливается связь между состоянием молекул ДНК спермиев и жизнеспособностью потомства.

Обсуждение. Методом двухволновой цитофотометрии проведено определение содержания ДНК в спермиях инбредных линий, гибрида и сорта редиса с окраской по Фельгену. Известно, что в основе реакции Фельгена лежит мягкий кислотный гидролиз фиксированной ткани, благодаря которому освобождаются альдегидные группы дезоксирибозы ДНК, дающие с реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) пурпурную окраску (Feulgen u. Rossenbeck, 1924).

Значение продолжительности гидролиза и его связь с интенсивностью окраски по Фельгену рассматривалась многими исследователями (Ely, Ross, 1949; De Lamater, 1951; Phylip, Woods, 1957; Salisburi

а Baker, 1962, и др.). Показано, что при гидролизе интенсивность окраски вначале возрастает, затем, достигнув максимума, падает. Падение интенсивности окраски спермиев после достижения определенного оптимума является следствием наступившего при дальнейшем гидролизе процесса разрушения и вымывания ДНК.

Установлено, что продолжительность кислотного гидролиза в реакции Фельгена при строгой стандартизации прочих условий проведения окраски зависит не только от вида организма или исследуемой ткани, но и от функционального состояния клеток в момент исследования (Birge e. a., 1961; Bohm a. Sandritter, 1966; Roels, 1963a, 1963b; Sandritter e. a., 1965, и др.). Поэтому любая разница во времени гидролиза и форме гидролизных кривых является результатом различий между клеточными тканями (Gledhill, 1970). Следовательно, колебания, получаемые при количественном определении хромофора, не всегда могут отражать истинное варьирование собственно количества ДНК (Ringertz, 1969; Noeshe, 1971).

В наших опытах исследовался один тип клеток — спермии, а изучаемый материал относится к одному сорту, дифференцированному инбридингом на отдельные гомозиготные линии, различающиеся степенью жизнеспособности и другими морфофизиологическими признаками (окраской листа, венчика, формой стручка и др.).

Учитывая это, исследование интенсивности окраски спермиев с целью количественного определения ДНК мы проводили при оптимальном времени гидролиза в отдельности для каждой из исследуемых форм. Результаты этих исследований показали, что интенсивность окраски ДНК по Фельгену зависит от продолжительности гидролиза. Оказалось, что оптимальная длительность гидролиза ДНК различна у разных форм. У гомозиготных депрессивных инбредных линий максимальное прокрашивание спермиев наступило раньше, чем у гетерозиготных генотипов сорта и межлинейного гибрида.

Если сравнить показатели всех форм, полученные при одном времени гидролиза, оптимальном для сорта, т. е. 90 мин, то, как и в опытах Поляковой (1971), можно наблюдать у линий значительно более слабое окрашивание спермиев реактивом Шиффа. Следовательно, тоже можно предположить о наличии у них меньшего количества ДНК в спермиях в сравнении с сортом и гибридом, хотя в самом деле этого не наблюдается (рисунок 1). Спермии линий, сорта и гибрида имеют одинаковую степень интенсивности окраски, а следовательно, и содержание ДНК, но выявляемые при разной длительности гидролиза.

Однотипность результатов измерения интенсивности окраски ДНК в спермиях растений сорта Вировский белый и линии ЛВ-269 при одном времени гидролиза в этих опытах и опытах Поляковой (1971) с использованием отличной от нашей методики позволяет говорить о высокой надежности полученных данных. В том и другом случаях при времени гидролиза, оптимальном для сорта, спермии линии ЛВ-269 окрашивались менее интенсивно, чем сорта. Такая же закономерность отмечена для сорта Сакса и его линий. Эти данные совпадают с результатами наблюдений Мунтцинга и Акдика (Muntzing a. Akdik, 1948), полученными на ржи при визуальном исследовании, на основе которых ими было высказано также предположение о возможном снижении у линий содержания ДНК под влиянием инбридинга.

В некоторых случаях возможно и изменение содержания ДНК за счет образования крупных диплоидных пыльцевых зерен, сильных нарушений в мейозе, приводящих к образованию abortивной нежизнеспособной пыльцы и др. Подобные нарушения особенно часто встречаются у линий с высокой степенью депрессии (Полякова, Нарбут, 1967). Однако в этой работе, как упоминалось, для измерения бра-

лась только нормальная трехъядерная пыльца, потому на результаты исследования это не влияло.

Выявившиеся различия между линиями, гибридом и сортом по скорости гидролиза, очевидно, связаны с изменением состояния спермиев, которое согласно данным Рингертца (Ringertz, 1969) можно трактовать как различия в хромосомном материале. Подобное состояние спермиев линий, очевидно, обусловлено их гомозиготностью и высокой степенью инбредной депрессии.

Конкретные причины, вызывающие более быстрый гидролиз ДНК в спермиях инбредных линий, неясны и требуют изучения. Однако из полученных в работе данных вытекает необходимость исследования кинетики изменения окраски в зависимости от сроков гидролиза в каждом конкретном случае.

Согласно имеющимся литературным данным физические изменения ДНК комплекса могут вызвать изменения реактивности связывающих краситель сайтов: альдегидов, фосфатов, аминогрупп (Garcia, 1971). В частности, такими изменениями могут быть: конденсация хроматина, какие-то конформационные изменения ДНК хромосом, наличие или отсутствие ряда ядерных белков (Ringertz, 1969; Garcia, 1971). Установлено влияние на фельгеновское окрашивание кислоторастворимых ядерных белков и показано, что наиболее вероятными этапами гистохимических процедур, на которых осуществляется такое влияние, будут гидролиз и Шифф-окрашивание (Noeshe, 1971; Ringertz, 1969; Gledhill, 1970). В связи с этим в дальнейшем нам представляется необходимым установление конкретных причин цитохимических и цитофотометрических особенностей, полученных на данном материале с помощью более адекватных методов.

Выводы

Методом двухволновой цитофотометрии с окраской по Фельгену и определением оптимального времени гидролиза в отдельности для каждой из исследованных форм установлено:

1. Спермии инбредных линий редиса ЛС-337/24, ЛС-337/25, ЛС-43/51, F₁ межлинейного гетерозисного гибрида и сорта Сакса имеют одинаковое количество ДНК.

2. Показатель оптической плотности, характеризующий содержание ДНК, в спермиях линий, гибрида и сорта меняется в зависимости от продолжительности гидролиза. Для каждой из этих форм отмечен свой оптимум времени гидролиза (для линий 60—75 мин, — гибрида и сорта 90 мин), что указывает на измененное состояние ДНК в их спермиях.

3. Под влиянием инбридинга сорт Сакса дифференцировался на линии, характеризующиеся различными морфофизиологическими признаками и разным состоянием ДНК спермиев.

4. Отмечена связь между степенью жизнеспособности исследованных форм и временем гидролиза, при котором проявляется максимальная интенсивность окраски спермиев, характеризующая состояние молекул ДНК.

5. По площади спермиев между растениями линий, гибрида и сорта различий не обнаружено.

Авторы выражают глубокую благодарность руководителю лаборатории цитологии БиНИИ ЛГУ старшему научному сотруднику А. К. Дондуа и сотрудникам этой лаборатории за предоставленную возможность выполнения данной работы и консультации.

Summary

DNA content in the sperms of inbred lines of radish, variety "Sachs" and their interlinear hybrids has been studied by means double-wave cytophotometric method with elementary determination of optimum time for hydrolysis for each of the forms under study.

The comparison of the obtained data did not reveal any difference in DNA content in the sperms of the studied forms. But different optimum time for hydrolysis, indicating different state of DNA in their sperms, has been noted.

ЛИТЕРАТУРА

- Бродский В. Я. Трофика клетки. М., 1966, 385 с.
- Гарсиа А. и Иорно Р. Возможные источники ошибок в двухволновой цитофотометрии. — В кн.: Введение в количественную цитохимию. М., 1969, с. 178—195.
- Данилина А. Н., Лусс Е. В., Бутенко Р. Г. Особенности дедифференциации специализированных клеток моркови и характеристика нарастания каллуса. — «Физиология растений», 1965, т. 12, № 3, с. 469—477.
- Дейч А. Цитофотометрия нуклеиновых кислот. — В кн.: Введение в количественную цитохимию, М., 1969, с. 265—288.
- Дженсен У. Ботаническая гистохимия. М., 1965, 374 с.
- Маханец И. А. и Лысюк Л. П. О двух типах спермиев у диплоидной и тетраплоидной ржи и количественном цитофотометрическом исследовании ДНК у них. — «Цитология и генетика», 1967, т. 1, № 3, с. 51—55.
- Мендельсон М. Абсорбционная цитофотометрия: сравнение различных методов исследования структурированных объектов и двухволновой метод. — В кн.: Введение в количественную цитохимию. М., 1969, с. 167—177.
- Нарбут С. И. Генетическая коллекция инбредных линий редиса. — «Генетика», 1966, № 5, с. 89—100.
- Нарбут С. И. Генетическая опухоль редиса, полученная при инбридинге. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1967, № 15, с. 144—145.
- Нарбут С. И., Максук Н. А., Смирнов А. Ф. Об изменении содержания ДНК в спермиях инбредных линий и гибрида редиса. — Тез. докл. V Всесоюз. совещ. по эмбриологии растений. Кишинев, 1971.
- Полякова Т. Ф., Нарбут С. И. Исследование мейоза, количества пыльцы и семенной продуктивности у высокоинбредных линий редиса. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1967, вып. 3, с. 165—176.
- Полякова Т. Ф., Нарбут С. И., Налимов О. П. О содержании ДНК и основных белков в спермиях растений инбредных линий редиса. — «Цитология и генетика», 1971, № 2, с. 161—169.
- Birge W., Anklessaria G. a. Tibbets F. D. Differential response of DNA of fresh and stored bovine spermatozoa to Feulgen (HCL) hydrolysis. — Trans. Illinois state acad. sci., 1961, vol. 54, No 1/2, p. 117.
- Bohm N. a. Sandritter W. Feulgen hydrolysis of normal cells and mouse ascites tumor cells. — J. cell. biol., 1966, vol. 28, No 1, p. 1.
- De Lamater E. A new cytological basis for bacterial genetics. C.S.H.S., 1951, No 16, p. 381.
- Ely I. O. a. Ross M. H. Nucleic acids and the Feulgen reaction. — Anat. res., 1949, vol. 104, No 1, p. 103.
- Feulgen R. u. Rossenbeck H. Mikrochemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elective Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. — Z. Physiol. Chem., 1924, p. 135.
- Garcia A. M. Stoichiometry of dye binding versus degree of chromatin coiling. — In: Introduction to quantitative cytochemistry. Vol. II. London, 1971, p. 153—171.
- Gledhill B. L. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoon maturation and male infertility. — In: Introduction to quantitative cytochemistry. Vol. II, ed. C. D. Wied, Behr. Acad. Press, 1970, p. 125—155.
- Muntzing A., Akdik S. Cytological disturbances in the first inbred generation of rye. — Hereditas, 1948, No 34, p. 485—509.
- Noeshe K. Discrepancies between cytophotometric values and deoxyribonucleic acid content. — J. histochem. and cytochem., 1971, vol. 19, No 3, p. 169—174.
- Phyllip S., Woods R. D. Chromatographic study of hydrographic of hydrolysis in the Feulgen nuclear reaction. — J. biophys. biochem. cytol., 1957, vol. 3, No 1, p. 71.
- Ringertz N. R. Cytochemical properties of nuclear proteins and DNP-complexes in relation to nuclear function. Handbook of molecular cytology. Amsterdam, 1969.
- Roels H. Interferometric study of the cell nuclei of the adrenal medulla in different experimental conditions. — Exptl. cell. res., 1963a, vol. 30, No 2, p. 437.

- Roels H. The effect of some pituitary hormones on volume and DNA-content of cell nuclei of the adrenal cortex in hypophysectomized castrated rats. — Exptl. cell. res., 1963b, vol. 31, No 3, p. 407.
- Salisbury G. W. a. Baker F. N. Effects of hydrolysis time, age of stain, and freezing of the cells on the Feulgen-DNA content of bovine spermatozoa. — J. dairy sci., 1962, vol. 45, No 5, p. 673.
- Salisbury G. W., Ladge I. R. a. Baker F. N. Effects of age of strain hydrolysis time, and freezing of the cells on the Feulgen-DNA content of bovine spermatozoa. — J. dairy sci., 1969, vol. 47, No 2, p. 165.
- Sandritter W., Yobst L., Rogow K. u. Rosseimann. Zur Kinetik der Feulgen-reaktion bei verlangerter Hydrolysezeit. — Histochemie, 1965, vol. 4, No 5, p. 420.

ИЗУЧЕНИЕ МЕЙОЗА У ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РЕДИСА (*RAPHANUS SATIVUS* VAR. *RADICOLA* PERS.)

Т. С. Фадеева, Н. Дайял

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Важнейшее биологическое значение мейоза заключено в способности хромосом конъюгировать, поэтому одной из основных задач цитогенетики является изучение процесса конъюгации и его генетического контроля. Но функциональная регуляция мейотических процессов трудно доступна для экспериментальных исследований, поэтому для изучения генетической регуляции мейоза большое значение имеет изучение aberrантных мейозов и генетически детерминированных отклонений в ходе мейоза (мутаций).

В этом плане интересны работы по изучению характера конъюгации хромосом у растений разных видов и в популяциях одного вида.

В популяциях перекрестноопыляющихся растений характер конъюгации хромосом, и именно частота хиазм, имеет для данной популяции определенные пределы варьирования и может рассматриваться как адаптивный признак, обеспечивающий оптимальный уровень рекомбинаций. Это свойство в популяции, вероятно, поддерживается гетерозиготностью, поскольку принудительное самоопыление растений нормальной гетерозиготной популяции приводит к возникновению несбалансированной генетической системы: в инбредированной популяции снижается фертильность растений, их мощность и т. д. (Darwin, 1876; Jones, 1939; Müntzing, 1945; Fisher, 1949; Sybenga, 1958; Нарбут, 1961; Fröst, 1963, и др.).

Дарлингтон и Мазер (Darlington a. Mather, 1949) высказали предположение, что возникновение несбалансированной генетической системы служит причиной нарушений и в мейозе у инбредных линий по сравнению с исходной аллогамной популяцией. Как одно из нарушений мейоза у инбредных поколений показано снижение числа хиазм; впервые это изучено на ржи Ламмом (Lamm, 1936), Кахидзе (1939), Мюнтцингом и Акдик (Müntzing a. Akdik, 1948), Ризом (Rees, 1955) и др. Это обнаружено на кукурузе (Jones, 1939; Clark, 1942; Zecević, 1960, 1961), на еже сборной (Myers, 1948; Jones, 1967, 1968 и др.).

В исследованиях показаны понижение частоты хиазм у инбредных поколений и уменьшение степени прокрашиваемости хромосом, что, возможно, связано с качественными или количественными изменениями ДНК хромосом. Обнаружено также образование большего числа палочковидных бивалентов, формирование мостов с фрагментами и без фрагментов и другие аномалии мейоза у инбредных линий.

На основании этих данных можно предположить наличие структурных различий (по некоторым хромосомам) между инбредными ли-