

РИТМЫ СУТОЧНОЙ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ЗОЛОТИСТОЙ ФАСОЛИ *VIGNA RADIATA* (L.) R. WILCZEK

© А. К. Буторина,¹ До Ньы Туен²

¹ Кафедра генетики, селекции и теории эволюции Воронежского государственного университета, Россия, и

² Кафедра генетики Тхайнгуенского университета, Тхайнгуен, Вьетнам;

¹ электронный адрес: bsgen185@main.vsu.ru

Изучена суточная митотическая активность (МА) у местного вьетнамского сорта *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. Установлено 5 пиков кривой суточной МА. Максимальное значение митотического индекса наблюдалось в 16 ч (5.93 %), другие пики приходились на 2 (5.58 %), 8 (4.70 %), 12 (4.60 %) и 22 (4.60 %) ч. Учитывая то, что продолжительность митотического цикла у вигны составляет порядка 10 ч, можно предположить, что в пределах каждого цикла имеются 2 пика митотической активности. Это может быть связано с присутствием в популяции меристематических клеток двух субпопуляций, различающихся по времени вступления в митоз и с примерно равной продолжительностью клеточного цикла.

Ключевые слова: суточная митотическая активность, *Vigna radiata*, многовершинная кривая, митотический индекс, две субпопуляции клеток.

Золотистая фасоль, или маш *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, — широко культивируется во многих странах Америки, Азии, Африки и некоторых странах Европы и Средней Азии на поливе.

Во Вьетнаме маш служит одним из основных продуктов питания населения, а потому рассматривается как важнейшая сельскохозяйственная культура, с которой ведется селекционная работа. Это требует тщательного изучения имеющегося селекционного материала по разным признакам, в том числе по цитологическим показателям митоза, на основании которых можно судить о степени стабильности генома у полученных в ходе селекционной работы сортов этой культуры.

Начальным этапом для изучения митоза является определение суточной митотической активности (МА) как важной цитологической характеристики вида, которая проявляется в виде периодических подъемов и спадов клеточных делений, т. е. обладает определенной ритмичностью.

Проблема изучения ритмичности биологических процессов у растений, и в частности суточной митотической активности, давно привлекает внимание ученых. Результаты выполненных многими авторами исследований по ритмам клеточных делений меристемы были обобщены в двух обстоятельных обзорах (Гриф, Мачс, 1994; Grif et al., 2002). Этими обзорами были охвачены данные по 170 видам из 93 родов, представляющих 38 семейств растений.

Повышенный интерес ученых к данной проблеме можно объяснить с научной точки зрения, поскольку до сих пор не решен вопрос о видоспецифичности данного признака и всех механизмах, определяющих ритмы митотической активности. С практической точки зрения это

важно для установления пиков МА как оптимальных сроков фиксации материала для изучения цитологии митоза и определения митотического индекса (МИ), являющегося показателем интенсивности ростовых процессов, по которому можно вести отбор, в частности при селекции на быстроту роста (Цитленок и др., 1978; Козак, 2004). У вигны это имеет особое значение при выращивании ее как сидеральной культуры.

Хотя в целом по цитогенетике *V. radiata* и других видов этого рода выполнено много исследований, в том числе и с использованием молекулярных методов (Sen, Bhowal, 1960; Joseph, Bouwkamp, 1978; Zheng et al., 1991, 1993, 1994; Galasso et al., 1992, 1995, 1996, 1997; Verona et al., Guerra et al., 1996; Mercadoruaro, Delgado-Salinas, 1998), о митотическом цикле у видов этого рода, в частности у *V. radiata*, известны мало. Так, согласно полученным данным (Brulfert, 1985; Germani et al., 1987), продолжительность клеточного цикла у *V. radiata* в клетках проростков семян при оптимальной температуре их проращивания (26 °С) составляет примерно 10 ч, а сам митоз занимает около 1 ч. Данные о суточной МА у *V. radiata* в условиях типичных для него мест обитания, к которым относится, например, Вьетнам, нам неизвестны. Поэтому целью наших исследований явилось изучение эндогенных ритмов МА на примере одного из местных сортов *V. radiata*, выращиваемых во Вьетнаме. Определение именно эндогенных ритмов МА нам представляется особенно важным, в связи с тем что этот признак может быть использован в качестве контроля для оценки особенностей экзогенных ритмов, которые будут определяться спецификой воздействия факторов внешней и внутренней среды на разных стадиях онтогенеза.

Материал и методика

Материалом для исследований явились корешки проростков семян культивируемого во Вьетнаме сорта *Vigna radiata* № 1176. Сорт возделывался в провинции Тхайнгун на северо-западе Вьетнама. Почвенно-климатические условия района выращивания данного сорта таковы: тип почвы — краснозем, среднегодовая температура 22 °С, относительная влажность воздуха 84 %. Исследуемый сорт местной селекции, продуктивность средняя (18 ц/га), высота растения 60—70 см, стебель слабоветвящийся (2 ветки), плоды темно-серого цвета, семена крупные, общее содержание белка 24 %. Сорт устойчив к условиям окружающей среды, хорошо переносит затопление.

Семена данного сорта урожая 2005 г. проращивали в чашке Петри на влажной фильтровальной бумаге при 26 °С. При этом мы учитывали то обстоятельство, что 26 °С — это оптимальная температура для прорастания семян вигны (Brulfert, 1985). Отклонения же от этого значения температуры способны привести к изменениям митотического цикла — его длительности и периодов (Гриф, Иванов, 1975).

Проростки с корешками, достигшими длины 0.5—1.0 см, фиксировали темпорально с интервалом в 2 ч (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 и 22 ч) в спиртово-уксусной смеси (3 части 96%-ного спирта + 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение 1 сут, а затем хранили зафиксированный материал в холодильнике. Готовили постоянно-давленные микропрепараты, для чего предварительно проводили мацерацию тканей корешков для их лучшего раздавливания путем предобработки 18%-ной HCl в течение 10 мин. После этого корешки промывали в нескольких сменах 45%-ной уксусной кислоты и выдерживали в ее последней порции 20 мин при 60 °С. Окраску проводили ацетогематоксилином, оставляя корешки в тигле с красителем на ночь. Для последующего осветления цитоплазмы клеток проводили их дифференцировку, выдерживая корешки до 10—15 мин в растворе хлоралгидрата. Затем кончик корешка раздавливали на предметном стекле в капле смеси Гойера путем легкого надавливания поверх покровного стекла, добиваясь равномерного распределения клеток на препарате.

Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа Laboval 4 (Karl Zeiss, Jena) при увели-

чении 40 × 10 × 2.5. Микрофотосъемку проводили при увеличении 100 × 10 × 2.5 на микроскопе Orthoplan Leitz с использованием цифровой камеры DFC -280. При изучении митоза по каждому сроку фиксации использовали 3—4 корешка и в целом по каждому варианту анализировали от 2500 до 5000 клеток. МИ определяли в процентах по формуле.

$$\text{МИ} = \frac{\text{число делящихся клеток}}{\text{общее число учтенных клеток}} \cdot 100 \%$$

Семена вигны характеризовались 100%-ной всхожестью и высокой энергией прорастания. Проращивание семян вигны проводили в темноте, чтобы избежать влияния световых ритмов, способных влиять на структуру ритмов МА (Гриф, Мачс, 1996).

Первые проростки появлялись уже через 12 ч после замачивания, а митозы наблюдались в корешках длиной 0.5—1.0 см.

Результаты и обсуждение

Митоз у сорта № 1176 *Vigna radiata* изучали на микропрепаратах по каждому сроку фиксации. Прежде всего нами было подтверждено установленное ранее еще Г. Д. Карпеченко (1925) число хромосом в соматических клетках вигны ($2n = 22$). Типичная метафазная пластинка вигны представлена на рис. 1, т. е. показано, что данный сорт является диплоидным. Митоз у него протекает по классической схеме. Число нарушений митоза не превышало 0.5 %, наблюдались типичные нарушения для митотического деления клеток: опережающее движение хромосом в метафазе, отставания и мосты в анафазе и телофазе.

Преобладающим же типом цитологических нарушений, которые, однако, учитывались отдельно, было присутствие остаточного ядрышка на всех стадиях митоза при высокой степени конденсации хромосом. Картины нормального митоза и наблюдавшихся типов нарушений представлены на рис. 2.

Остаточное ядрышко было представлено в виде соединенного с хромосомами или свободно лежащего в ци-

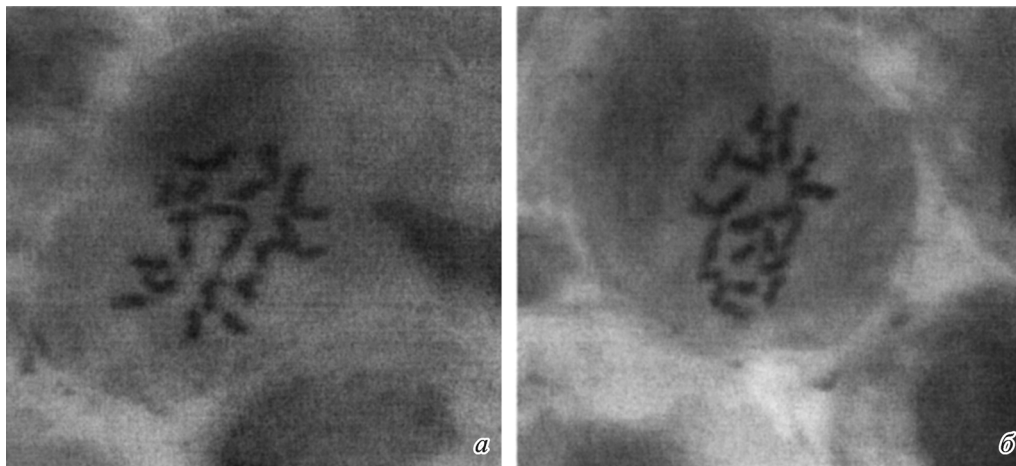


Рис. 1. Варианты (а, б) метафазной пластинки в клетке корневой меристемы у *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek ($2n=22$).

Увел. 100×10×2.5.

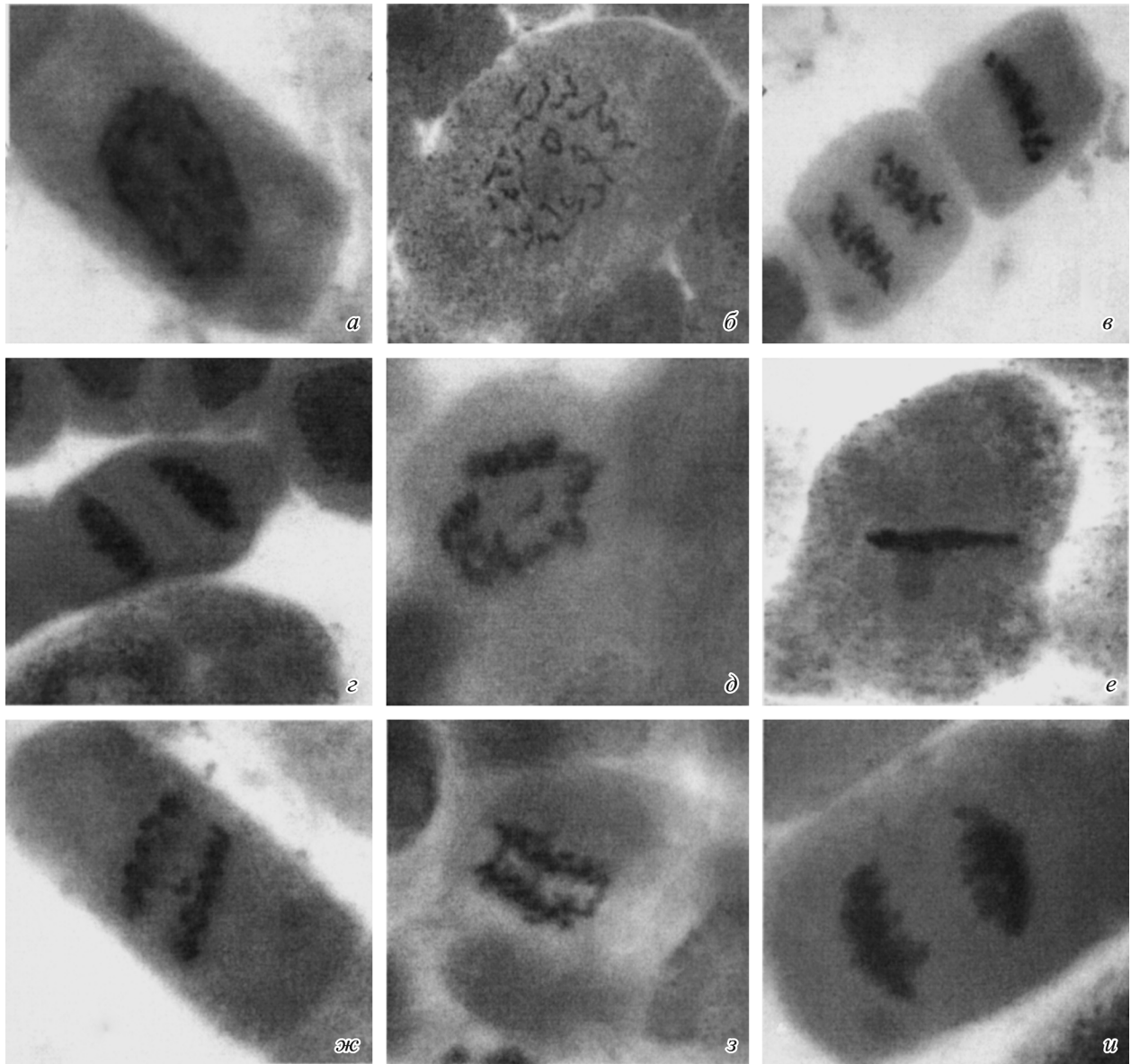


Рис. 2. Митоз в норме и с нарушениями в клетках меристемы корешков проростков у *Vigna radiate* (L.) R. Wilczek. *a* — профаза; *б* — прометафаза; *в* — метафаза (клетка *сверху*), анафаза (клетка *снизу*); *г* — телофаза с намекающимся фрагмопластом; *д* — отставание хромосомы в метакинезе при выстраивании в метафазную платику и образование центромерного кольца; *е* — метафазная платика (вид сбоку) с остаточным ядрышком; *ж*, *з* — мосты в анафазе; *и* — поздняя анафаза с остаточным ядрышком.
Увел. $100 \times 10 \times 2.5$.

топлазме округлого или овального светлоокрашенного тельца. В норме, как известно, ядрышко исчезает в конце профазы, так как синтез РНК на этом этапе прохождения митоза приостанавливается. Однако в поздней телофазе при деконденсации хромосом ядрышко появляется вновь. Присутствие же ядрышка в метафазе, анафазе и ранней телофазе митоза следует рассматривать скорее как проявление не генетической, а эпигенетической изменчивости, поскольку изменения самого генетического материала при этом не происходит, но наблюдаемый пупфинг конденсированных хромосом в метафазе—телофазе митоза является цитологическим проявлением активности генов рибосомальных цистронов, обычно ингибированной на этих стадиях. Механизм такого феномена связан с нарушением взаимодействия ДНК—белок в районах ядрышковых организаторов под действием экстремальных фак-

торов, например ионизирующей радиации, как было установлено Таршис и Уманским (1971). А наши предыдущие исследования показали, что остаточные ядрышки способны сохраняться в ряду клеточных делений (Butorina et al., 1997).

Расчет МИ проводили для каждого проростка в каждый срок фиксации, а затем определяли среднее значение МИ по всем точкам фиксации. Полученные результаты были обработаны статистически в программе Windows Microsoft Office Excel 2003 и составлен график (рис. 3), на котором видно, что распределение пиков митотической активности имеет многовершинный характер при максимуме делений в 16 ч (МИ = 5.93) и абсолютном минимуме в 4 ч. Близкий к максимуму пик митотической активности отмечен также в 2 ч (МИ = 5.58) и примерно одинаковые средние по значениям МИ пики в 24, 8, 12 и 22 ч (4.5, 4.7,

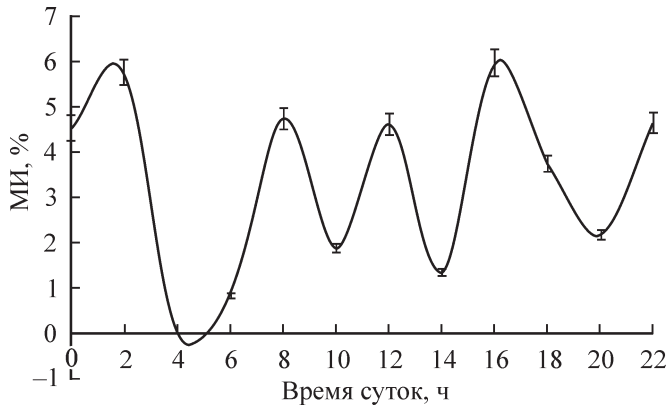


Рис. 3. Особенности распределения пиков митотической активности по часам в течение суток у культурного сорта *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek.

4.6 и 4.6 соответственно). Доверительные интервалы значений МИ в точках фиксации, рассчитанные с вероятностью 5% ($P < 0.05$), позволяют судить о достоверности различий между соседними значениями МИ. Наблюдающаяся пятивершинная кривая распределения пиков митотической активности у *V. radiata* связана, на наш взгляд, с биологическими особенностями вида и условиями его произрастания (в теплом и влажном климате). С учетом того, что продолжительность клеточного цикла у вигны составляет примерно 10 ч, можно предположить, что в пределах каждого цикла имеются 2 максимума (или пика) митотической активности, а в пределах суток их будет 5. 2 максимума в пределах каждого цикла связаны, по-видимому, с присутствием в меристеме корешков проростков у вигны двух субпопуляций клеток с разной продолжительностью цикла МА. Известно, что все биологические ритмы, в том числе ритмы МА, проявляются как непрерывный колебательный процесс. Быстрая смена циклов МА у вигны, на наш взгляд, может быть связана с тем, что у тропических растений, произрастающих в условиях теплого и влажного климата, все физиолого-биохимические процессы происходят ускоренно, поскольку с увеличением температуры скорости ферментативных реакций возрастают (Алехина и др., 2005). Соответственно в этих условиях ускоряются все биологические ритмы, в том числе и ритмы МА. Тесная связь ритмов МА с физиологическими ритмами отмечалась еще Благовещенским (1966). У растений же континентального климата, например у сосны обыкновенной, все такие процессы происходят медленнее, поэтому у сосны мы наблюдали лишь 1 пик суточной МА (в 9 ч утра по зимнему времени) и только иногда 2-й (Буторина и др., 2001).

Поскольку эндогенные ритмы МА в меристемах корешков проростков семян при оптимальной температуре их прорастания и в отсутствие освещения отражают только особенности десинхронизации делений в первых митозах после выхода клеток из состояния покоя, такие ритмы, на наш взгляд, следует рассматривать как видоспецифические (или по крайней мере как сортоспецифические) признаки. Поэтому мы разделяем точку зрения Фурсова с соавторами (1975) о генетической обусловленности данного признака.

Сравнивая эндогенные ритмы МА с экзогенными у растений тех же видов, можно будет наблюдать ответные реакции организмов на воздействия внутренних факторов среды (например, динамики ферментов и физиологически

активных веществ при смене этапов онтогенеза; Благовещенский, 1966) или внешних (температуры; Гриф, Иванов, 1975; освещения; Гриф, Мачс, 1996а; влажности и др.). Такие реакции по существу служат отражением механизмов адаптации организмов к различным факторам среды, проявляющихся на клеточном уровне и направленных на поддержание гомеостаза клеточных систем.

Установленная нами многовершинность кривой суточной МА у *V. radiata* находится, по-видимому, в тесной увязке с особенностями биохимической регуляции роста и развития растений этого вида. То, что подобное явление характерно для всех видов растений, отмечалось ранее Трояном с соавторами (1975).

Для большинства растений температурный оптимум для процессов вегетации находится в пределах 20–35 °С (Жученко, 1988). За его пределами растения испытывают температурный стресс. Тропическим растениям в типичной для них среде обитания обычно не приходится его испытывать. Поэтому в условиях температурного оптимума и повышенной влажности у них сокращается продолжительность физиологических, биохимических и соответственно митотических ритмов.

Список литературы

- Алехина Н. Д., Байнокин Ю. В., Гавриленко В. Д., Жигалова Т. В., Мейчик Н. Р., Носов А. М., Полесская О. Г., Харитонашвили Е. В., Чуб В. В. 2005. Физиология растений: учебник для студентов вузов. М.: Изд. центр «Академия». 640 с.
- Благовещенский А. В. 1966. Биохимическая эволюция цветковых растений. М.: Наука. 327 с.
- Буторина А. К., Калаев В. Н., Миронов А. Н., Смородинова В. А., Мазурова И. Э., Дорошев С. А., Сенькевич Е. В. 2001. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной. Экология. 31 (3): 216–220.
- Гриф В. Г., Иванов В. Б. 1975. Временные параметры митотического цикла у цветковых растений. Цитология. 17 (6): 694–717.
- Гриф В. Г., Мачс Э. М. 1994. Ритмы митотической активности и клеточные циклы в меристемах растений. Цитология. 36 (11): 1069–1985.
- Гриф В. Г., Мачс Э. М. 1996. Влияние ритма освещенности на митотический цикл в корневой меристеме растений. Цитология. 38 (7): 718–725.
- Жученко А. А. 1988. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). Кишинев: Штиинца. 767 с.
- Карпеченко Г. Д. 1925. О хромосомах видов фасоли. Тр. по прикл. бот., генет. и селекц. 14 (2): 143–148.
- Козак М. Ф. 2004. Ритмы митоза у представителей рода *Glucine* L. Цитология и генетика. 6: 7–12.
- Таршиш М. А., Уманский С. Р. 1971. Радиация и живая клетка. М.: Атомиздат. 97 с.
- Троян В. М., Яворская В. К., Стасевская И. П., Калинин Ф. Л., Ильченко Л. Н. 1975. Естественная синхронизация начальных периодов митотического цикла при прорастании семян гороха. Физиол. биохим. культ. раст. 7 (4): 372–376.
- Фурсов В. Н., Конопя С. П., Дружков А. А. 1975. Зависимость митотической активности меристемы конуса нарастания корешков проростков хлопчатника от времени суток. Цитология. 17 (4): 414–419.
- Цитленок С. И., Бондарь Л. М., Колоденков П. В. 1978. Зависимость высоты растений от митотической активности и динамики некоторых веществ. Цитология и генетика. 12 (3): 221–224.
- Bulfert A. 1985. Le meristeme racinaire, model pour le etude du cycle cellulaire et de ses controles. Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot. 132: 35–47.
- Butorina A. K., Kosichenko N. E., Isakov Y. N., Pozhidaeva I. M. 1997. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear

power plant accident on the cytogenetic behaviour and anatomy of trees. In: Cytogenetic studies of forest trees and shrub species. Zagreb: Croatian forests. INC. 211—239.

Galasso I., Harrison G. E., Pignone D., Brandes A., Heslop-Harrison J. S. 1997. The distribution and organization of TY 1 — copia-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea) and its relatives. Ann. Bot. 80 : 327—333.

Galasso I., Pignone D., Perrino P. 1992. Cytotaxonomic studies in *Vigna*. 1. General technique and *Vigna unguiculata* C-banding. Caryologia. 45 : 155—161.

Galasso I., Saponetti L., Alternaria S., Pignone D. 1996. Cytotaxonomic studies in *Vigna*. 3. Chromosomal distribution and reacting properties of the heterochromatin in five wilds species of the section *Vigna*. Cariologia. 49 : 311—319.

Galasso I., Schmidt T., Pignone D., Heslop-Harrison J. S. 1995. The molecular cytogenetic of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18 S—5.8 S—25 S rRNA genes, 5 S rRNA genes, telomere-like sequence, and family of centromeric repetitive DNA sequences. Theor. Appl. Genet. 91 : 928—935.

Germani E., Clain E., Florin B., Benbadis M. C. 1987. Cycle cellulaire dans le meristeme de la racine seminale de *Vigna radiata*. Bull. Soc. Bot. Franc. 134 : 133—144.

Grif V. G., Ivanov V. B., Machs E. M. 2002. Cell cycle and its parameters in flowering plants. Цитология. 44 (10) : 936—979.

Guerra M., Kenton A., Bennett M. D. 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. Ann. Bot. 78 : 157—161.

Joseph L. S., Bouwkamp J. C. 1978. Karyomorphology of several species of *Phaseolus* and *Vigna*. Cytologia. 43 : 595—600.

Mercadoruaro P., Delgado-Salinas A. 1998. Karyotype studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae, Phaseolinae). Amer. J. Bot. 85 : 1—9.

Sen N. K., Bhowal Y. G. 1960. Cytotaxonomy studies on *Vigna*. Cytologia. 25 : 195—207.

Verona G., Galasso I., Pignone D. 1995. Retrospects and perspectives of cytogenetical studies in *Vigna*. Biologisches. Zentralblatt. 114 : 231—241.

Zheng J. Y., Irifune K., Hirai K., Nakata M., Tanaka R., Morikawa H. 1994. *In situ* hybridization to metaphase chromosomes in six species of *Phaseolus* and *Vigna* using ribosomal DNA as the probe. J. Plant Res. 107 : 365—369.

Zheng J. Y., Nakata M., Irifune K., Tanaka R., Morikawa H. 1993. Fluorescent banding pattern analysis of 8 Taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. Theor. Appl. Genet. 87 : 38—43.

Zheng J. Y., Nakata M., Uchiyama H., Morikawa H., Tanaka R. 1991. Giemsa C-banding patterns in several species in *Phaseolus* L. and *Vigna savi*, Fabaceae. Cytologia. 56 : 459—466.

Поступила 23 V 2007

THE RHYTHMS OF DAILY MITOTIC ACTIVITY IN *VIGNA RADIATA* (L.) R. WILCZEK

A. K. Butorina,¹ Do Nhu Tien²

¹ Department of Genetics, Breeding, and Theory of Evolution, Voronezh State University, Voronezh,

² Thai Nguyen University, Thai Nguyen, Vietnam;

¹ e-mail: bsgen185@main.vsu.ru

The daily mitotic activity (MA) in *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. has been studied using local cultivar for Vietnam № I 176. It has been shown that the curve of mitotic activity has five peaks. Maximum mitotic index (MI) was observed at 04:00 (5.93 %) and the other peaks were at 02:00 (5.58 %), 08:00 (4.70 %), 12:00 (4.60 %) and at 22:00 (4.60 %). If we took into account that duration of the mitotic cycle in *Vigna radiata* makes up ten hours, we can propose that there are two peaks of MA within each cycle. It may be due to the presence of two meristematic cell subpopulations which enter mitosis at different time and have nearly equal duration of the cell cycle.

Key words: daily mitotic activity, *Vigna radiata*, mitotic index, cell subpopulations.