

На правах рукописи

НАТАВАН САБИР КЫЗЫ ПОЛУХОВА

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ ПОЛИПЛОИДНОГО
РЯДА ШЕЛКОВИЦЫ (*MORUS* L.) И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ
К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ**

03.00.15– Генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии по биологии

БАКУ – 2012

Диссертационная работа выполнена в отделе “Физиологии растений”
Института Генетических Ресурсов НАН Азербайджана

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор **Э.М.АХУНДОВА**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
И. А.ШАХМУРАДОВ
кандидат биологических наук,
Г.Б.САДЫГОВ

Ведущая организация: **Азербайджанский
Научно-Исследовательский
Институт Земледелия, отдел физио-
логии растений и биотехнологии**

Защита состоится «_30_» __10__ 2012 г. в __ часов на заседании
Диссертационного совета D.01.061. при Институте Ботаники НАН
Азербайджана.

Адрес: AZ 1073, г.Баку, Бадамдарское шоссе,40

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Бота-
ники НАН Азербайджана.

Автореферат разослан: «___» _____ 2012 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета D.01.061
доктор биологических наук,
профессор

С.Д. ИБАДУЛЛАЕВА

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Шелковица является неотъемлемой частью природы и быта Азербайджана. Она составляет основу шелководства, широко используется в народной медицине. Кроме того, это прекрасное плодовое дерево, которое имеет более 400 декоративных форм. Шелковица - рекордсмен среди цветковых растений по уровню плоидности, благодаря чему она представляет интерес, как объект для изучения полиплоидии.

В настоящее время общепризнано, что полиплоидия является важнейшим фактором видообразования растений [Стеббинс, 1956; Зосимович, 1974; Чуксанова, 1977; Грант, 1984; Bennett, 2004, Brochant et al, 2004; Гриф, 2007]. Учитывая то, что большинство важнейших сельскохозяйственных культур растений имеют полиплоидную структуру гено типа (90%) становится понятным фундаментальное значение для науки и практики молекулярно-генетического изучения полиплоидии у растений.

Биологический эффект полиплоидии обусловлен ведущей ролью ядра и хромосом во внутриклеточном обмене веществ. Однако механизмы взаимосвязи между генетическим аппаратом и интенсивностью физиолого-биохимических процессов, протекающих в полиплоидных клетках, мало изучены.

Изучение растений, имеющих большое многообразие генетических форм в естественных условиях и предрасположенных к индуцированной полиплоидии, таких как шелковица, может внести ясность в понимание феномена полиплоидии, представляющей один из основных механизмов эволюции растений, а также играющей важнейшую роль в индивидуальном развитии организма.

В природе наряду с диплоидами ($2n=28$), триплоидами ($2n=42$), тетраплоидами ($2n=56$) и гексаплоидом ($2n=84$) существует 308-хромосомная шелковица, являющаяся 22-плоидом. Помимо этого, путем гибридизации и воздействием колхицина были экспериментально созданы промежуточные формы шелковицы [Абдуллаев, 1972; Джафаров, 1979].

Установление размера генома, активности биосинтеза ДНК и РНК как показателей интенсивности функционирования генома полиплоидных растений, анализ структуры тех областей генома, с которыми связаны проявления действия полиплоидии, являются необходимыми для понимания механизмов эволюционного происхождения и функционирования полиплоидных растений. При этом одной из основных задач является выявление порога, с которого начинается коррекция

размера генома и качественные преобразования генетического аппарата полиплоидной клетки.

Цель и задачи исследования. Основной целью настоящей работы является установление количественных и структурных изменений генома растений полиплоидного ряда шелковицы, определение плоидности с которого начинают действовать механизмы коррекции избыточного генетического материала и происходит компактизация хроматина, выявление ядерно-плазменных взаимоотношений в системе полиплоидной клетки, а также изучение физиолого-генетических особенностей полиплоидов шелковицы, определяющих их устойчивость к стрессовым факторам.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить количественные показатели ДНК на клетку и хромосому 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126, 168, 182, 196, 210, 238 и 308-хромосомной шелковицы;
2. Изучить структурное состояние ДНК по соотношению ДНК лабильного и стабильного хроматина;
3. Изучить ядерные и цитоплазматические генетические системы полиплоидов шелковицы и их взаимодействие;
4. Определить действие водного и солевого стресса на показатели РНК, ДНК и фракционного состава ДНК разнотипных сортов и форм шелковицы;
5. Изучить процессы перекисного окисления липидов полиплоидных растений при действии водного и солевого стресса;
6. Определить действие стрессовых факторов на содержание хлорофилла *a* и *b* у разнотипных сортов и форм шелковицы.

Научная новизна работы. Впервые выявлен полиплоидный уровень, с которого происходит элиминация излишнего генетического материала, названная «полиплоидным сбросом». Показано некротическое хромосомное увеличение содержания ДНК на клетку и снижение ДНК на хромосому в среднем звене полиплоидного ряда шелковицы, начиная с гексаплоида. Установлено, что, начиная с гексаплоидного уровня шелковицы, происходит изменение соотношения ДНК лабильного и стабильного хроматина. Стабилизация ДНК у среднеплоидных и высокоплоидных растений и возрастание доли компактного хроматина согласуется с предполагаемой ролью гетерохроматиновых участков хромосом в обеспечении быстрой адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды, что в свою очередь подтверждается более высокой устойчивостью полиплоидных сортов и форм шелковицы к действию водного и солевого стресса. Раскрыты закономерности установления ядерно-плазменных взаимоотношений в

системе полиплоидной клетки, а также детерминирующая роль ядра в регуляции уровня хлоропластной и митохондриальной ДНК полиплоидной клетки. Установлено, что под влиянием водного и солевого стресса в зависимости от уровня плоидности в разной степени и направленности происходят деструктивные изменения в нуклеиновых кислотах. Впервые выявлена специфика изменения перекисного окисления липидов (ПОЛ) у растений полиплоидного ряда шелковицы, а также под действием водного и солевого стресса в зависимости от степени плоидности. Установлено, что под действием экстремальных условий происходит снижение хлорофилла «а» и «b» и повышение интенсивности ПОЛ, зависимое от плоидности растений. В целом, представленные экспериментальные данные, об изменении содержания нуклеиновых кислот, соотношении фракций ДНК, и ядерно-плазменных взаимоотношений, определяемых по содержанию хлоропластной и митохондриальной ДНК, в зависимости от степени плоидности носят системный характер, составляют важное звено в механизмах адаптивной саморегуляции многих жизненно важных для растительного организма физиологических процессов в неблагоприятных условиях среды, в частности при действии засухи и засоления, и играют существенную роль в адаптации генома растений при полиплоидизации.

Практическая значимость работы. Полученные результаты являются существенными и создают предпосылки для теоретического обоснования рекомендаций, направленных на развитие экспериментальной полиплоидии и улучшение видового и сортового состава шелковицы. Наши исследования дают основание для использования высокоплоидных видов в селекции, с целью закрепления в генотипе их полезных свойств и более широких адаптивных возможностей.

Промежуточные звенья ($2n=6x=84$, $2n=7x=98$, $2n=8x=112$, $2n=9x=126$, $2n=14x=196$, $2n=15x=210$, $2n=17x=238$) полиплоидного ряда шелковицы были доставлены нами из Азербайджанского научно-исследовательского института шелководства и добавлены в коллекцию Института генетических ресурсов Азербайджана. Таким образом, нами был восстановлен полиплоидный ряд шелковицы, представляющий собой уникальный генофонд рода *Morus* L.

Апробация работы. Результаты настоящей работы доложены на конференции аспирантов НАН Азербайджана (Баку, 2006), на I Международной научной конференции «Биогенетические ресурсы» (Баку, 2006), на Республиканской научной конференции «Научные достижения в биологии» (Баку, 2006), VII Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования»

(Москва, 2007), на Международной конференции «Проблемы экологии, природы и общества», посвященной 100-летию юбилею акад. Г.Алиева (Баку, 2007), на Республиканской конференции «Проблемы экспериментальной биологии» (Баку, 2007), на научной конференции «Современные проблемы биологии», посвященной 85-летию юбилею Г.А.Алиева (Баку, 2008).

Публикации. Основные положения работы отражены в 16 опубликованных работах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 стр. компьютерного текста, состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка использованной литературы, содержит 19 таблиц, 15 рисунков. Список литературы включает 298 источников, из них 254 иностранных.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучались естественные полиплоидные формы и ценные сорта шелковицы ($2n=28$, $2n=42$, $2n=56$, $2n=308$), а также полученные на базе лучших перспективных и районированных сортов ценные полиплоидные формы шелковицы, являющиеся промежуточным звеном между низкоплоидными сортами и формами шелковицы и 22-плоидом Хар-гут. Эти формы получены при сочетании аллоплоидии, аутоплоидии и межвидовой гибридизации [Абдуллаев, 1970; Алекперова, 1971; Джафаров, 1976; Алиев, 1982]. При $x=14$ растения условно разделены на три группы: низкоплоидные $2x(2n=28)$, $3x(2n=42)$, $4x(2n=56)$; среднеплоидные $6x(2n=84)$, $7x(2n=98)$, $8x(2n=112)$, $9x(2n=126)$; высокоплоидные $12x(2n=168)$, $13x(2n=182)$, $14x(2n=196)$, $15(2n=210)$, $17x(2n=238)$, $22x(2n=308)$. Пробы были взяты у сортов и форм шелковицы, произрастающих на территории АЭБ Института генетических ресурсов Азербайджана и базы Фахралы Азербайджанского научно-исследовательского института шелководства.

Содержание лабильной, стабильной и остаточной ДНК определялось методом ступенчатого фракционного экстрагирования ДНК [Конарев, Алексеев, 1973]. Пересчет показателей относительного содержания ДНК, РНК и фракций ДНК на клетку проводился по методу Брауна с модификацией Н.В.Обручевой [1964]. Также были выделены митохондрии и хлоропласты, и определено содержание в них нуклеиновых кислот [Овчинникова, Яковлев, 1978]. Определение засухоустойчивости растений проводилось по проценту всхожести семян [Олейникова, Осипов, 1976] в растворе сахарозы (10,20,25 атм.). Для определения устойчивости растений к водному дефициту и засолению использовали методическое руководство «Диагностика устойчивости растений к

стрессовым воздействиям» [1988]. С целью определения устойчивости растений полиплоидного ряда шелковицы к водному дефициту использовали растворы сахарозы с различным осмотическим давлением (20,25,30,35 атм.). Для создания солевого стресса растения подвергали воздействию 0,4 М NaCl в течение 24 и 48 часов и 0,8 М NaCl в течение 24 часов. Интенсивность ПОЛ в листьях шелковицы оценивали по накоплению в тканях продукта окисления – малонового диальдегида (МДА), определяемого по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [Лукаткин, Голованова, 1988]. Обработку полученных результатов проводили стандартными статистическими методами [Рокицкий, 1974; Лакин, 1980].

3. КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОЧНОЙ ДНК И РНК И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДНК У СОРТОВ И ФОРМ ШЕЛКОВИЦЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ПЛОИДНОСТИ

3.1. Количество клеточной ДНК и РНК у различных по плоидности сортов и форм шелковицы.

В исследованиях, проведённых на разноплоидных сортах и формах шелковицы, было установлено несоответствие между содержанием клеточной ДНК и хромосомным набором у высокоплоидов [Ахундова, 1982]. Нами подтвердилась закономерность кратного хромосомному набору увеличения содержания ДНК в клетках низкоплоидов. Установлено, что содержание ДНК на клетку у триплоида в 1,5 раза, у тетраплоида в 2 раза выше по сравнению с диплоидами. У гексаплоида при трехкратном увеличении набора хромосом содержание ДНК на клетку по сравнению с диплоидом возрастает лишь в 2,4 раза. Подобная закономерность, т.е. некрatное хромосомному набору увеличение содержания ДНК на клетку (2,5-2,8 раза) наблюдалась у остальных представителей среднего звена полиплоидного ряда шелковицы (таб.1). В более значительной степени несоответствие плоидности содержания ДНК на клетку наблюдалось у высокоплоидов шелковицы. Так, содержание ДНК на клетку у додекаплоида (12х) против ожидаемого шестикратного увеличения повысилось лишь в 3,1, у тридекаплоида (13х) – 3,3, у тетрадекаплоида (14х) – 3,4 раза. Более существенное различие между содержанием клеточной ДНК и набором хромосом наблюдалось у гептадекаплоида (17х) (4,5 раза) и докозанплоида (22х) (5,6 раза). Из полученных данных следует, что кратное увеличение содержания ДНК на клетку происходит до определенного уровня плоидности, в данном случае этот уровень, тетраплоидный. Начиная с гексаплоидного уровня, подобная закономерность наруша-

ется.

Таблица 1.

Содержание ДНК в листьях полиплоидных сортов и форм шелковицы

Варианты	Плоидность, х	Число хромосом	ДНК		
			в 100 г сырого веса в мг	в одной клетке $г \cdot 10^{-12}$	на хромосому $г \cdot 10^{-14}$
Кинриу	2	28	12,41±0,3	0,564	2,0
Зариф-гут	2	28	11,75±0,4	0,547	1,95
Ханлар-гут	3	42	11,70±0,2	0,848	2,0
Тегеран-гут	4	56	14,78±0,6	1,089	1,95
Гексаплоид (4х × 8х)	6	84	19,20 ±0,9	1,343	1,59
Гептаплоид (12х × 4х)	7	98	10,76±0,5	1,330	1,36
Октоплоид (12х× 4х)	8	112	11,89±0,5	1,423	1,27
Эннеаплоид (12х× 6х)	9	126	11,79±0,3	1,68	1,33
Додекаплоид (22х×2х)	12	168	13,38±1,2	1,730	1,01
Тридекаплоид (22х×4х)	13	182	14,53±0,8	1,830	1,01
Тетрадекаплоид (22х×6х)	14	196	16,18±0,4	1,910	0,97
Пентадекаплоид (22х×8х)	15	210	17,78±0,7	2,07	0,99
Гептадекаплоид (22х×12х)	17	238	15,93±0,6	2,53	1,06
Докозанплоид Хар-гут	22	308	16,78±0,5	3,18	1,03

Таким образом, нами был установлен порог, с которого начинается коррекция генетического материала, названная впоследствии «полиплоидным сбросом». У среднеплоидов 3-4 кратное увеличение набора хромосом сопровождается увеличением содержания ДНК на клетку в 2,5-2,8 раза. У 22-плоидной шелковицы при 11-кратном увеличении числа хромосом наблюдается почти 5-кратное увеличение содержания ДНК на клетку. Полное соответствие между числом хромосом и содержанием ДНК на клетку наблюдается лишь у низкоплоидов, в среднем звене данная закономерность нарушается. У высокоплоидов

коррекция излишнего количества ДНК достигает более значительных размеров. Редукция геномного размера происходит у природных ауто- и аллоплоидов. У всех высокоплоидных форм шелковицы отмечается двукратное снижение содержания ДНК на хромосому по сравнению с диплоидами. Факты размельчения хромосом, начиная с гексаплоидного уровня плоидности, были отмечены при цитологическом исследовании полиплоидных форм шелковицы [Раджабли, 1966]. Наличие у представителей рода *Morus* L. мелких хромосом сопровождалось не просто умножением числа геномов в процессе полиплоидизации. Высокоплоиды рода *Morus* L. могли возникнуть только благодаря сочетанию процесса умножения генетического материала клетки с делетированием определенной его части.

Факт уменьшения количества ДНК на одну хромосому у высокоплоидных форм указывает на действие механизма оптимизации размера генома путем элиминации излишних количеств ДНК при сохранении большого числа хромосом. Этот механизм коррекции против избыточной генетической информации вступает в силу лишь в случае достижения клеткой соответствующего уровня плоидности.

3.2. Структурные особенности ДНК у различных по плоидности сортов и форм шелковицы.

В настоящее время эффект полиплоидии связывается не только с дозой генов. Полиплоидия создаёт возможность для широкой дивергенции генов, закрепляет генетическую гетерогенность и гетерозис [Blanc, Wolfe, 2004; Doyle et al., 2004].

Использование метода фракционного экстрагирования позволило разделить клеточную ДНК на следующие фракции: функционально активную слабосвязанную с гистонами ДНК лабильного хроматина; блокированную гистонами ДНК стабильного хроматина и остаточную или прочносвязанную.

Результаты проведенных исследований показали, что существует определенная зависимость между числом хромосом и соотношением ДНК лабильного и стабильного хроматина в клетках различных форм шелковицы: с увеличением плоидности клеточного ядра содержание ДНК лабильного хроматина относительно тотальной ДНК значительно уменьшается (рис.1). Например, у диплоида ДНК лабильного хроматина составляет 66,1% от общей ДНК, на долю ДНК стабильного хроматина приходится 27,5%. Аналогичная закономерность в соотношении фракций ДНК лабильного и стабильного хроматина сохраняется у триплоидных и тетраплоидных сортов шелковицы. У гексаплоидной формы содержание лабильной и стабильной ДНК почти вы-

равнивается, составляя соответственно 49,7 и 45,7% относительно тотальной ДНК. Однако, начиная с гептаплоидного уровня, распределение фракций ДНК носит совершенно иной характер.

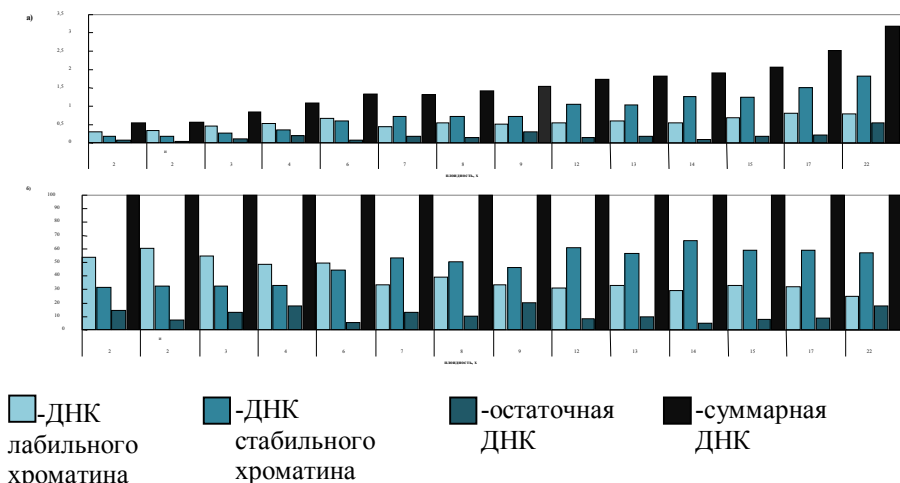


Рис. 1. Показатели фракционного состава ДНК в листьях полиплоидных сортов шелковицы: а) содержание фракций ДНК (на клетку $\text{г} \cdot 10^{-12}$), б) процент фракций от общей ДНК

У экспериментально полученных промежуточных форм шелковицы ($7x=98$; $8x=112$; $9x=126$; $12x=168$; $13x=182$; $14x=196$; $15x=210$; $17x=238$) содержание ДНК стабильного хроматина в среднем в 1,5 раза превышает содержание ДНК лабильного хроматина. У 22-плоидной шелковицы содержание ДНК лабильного хроматина на клетку составляет 4,21 мг%, стабильной ДНК- 9,63 мг%, что в расчете на тотальную ДНК составляет соответственно 25,1 и 57,4 %.

Используя в качестве показателей активности генома соотношение ДНК лабильного и стабильного хроматина, мы пришли к заключению, что у низкоплоидных форм шелковицы ДНК лабильного хроматина в среднем в 1,5-2 раза превосходит ДНК стабильного хроматина. Установленная в наших опытах закономерность компактизации генетической системы у 22-плоида, также выявляется у аллоплоидов шелковицы, в которых Хар-тут участвует, как материнская форма.

Из вышеизложенного следует, что с увеличением плоидности клеточного ядра соотношение ДНК лабильного и стабильного хроматина изменяется в пользу последней, что связано с увеличением доли компактного хроматина за счет частичной гетерохроматинизации

хромосом у высокоплоидных форм. Компактизация систем хранения информации является одним из основных принципов эволюции генома, как информационной системы.

Изучение фракционного состава ДНК диплоидных и полиплоидных растений указывает на то, что в процессе полиплоидизации происходят сложные перестройки в геноме, играющие существенную роль, как регуляционные системы диплоидной и полиплоидной клетки.

3.3. Генетические системы полиплоидов шелковицы и их взаимодействие

Хромосомные и цитоплазматические детерминанты представляют собой комплементарные генетические системы клетки, тесное взаимодействие которых между собой и с окружающей средой определяет внутреннюю организацию и динамику процессов жизнедеятельности. В ходе исследования установлено, что тетраплоиды, почти в 2 раза превосходят исходные формы по содержанию хлоропластной ДНК на клетку, а 22-плоид лишь в 4,5 раза (таб.2).

Таблица 2.

Содержание хлоропластной ДНК в листьях диплоидных и полиплоидных сортов и форм шелковицы

Сорт, форма	Плоидность, x	ДНК				РНК	
		на сухую массу хлоропластов в г·10 ⁻¹²	в одной клетке в г·10 ⁻¹²	число хлоропластов	в одном хлоропласте г·10 ⁻¹²	на сухую массу хлоропластов в г·10 ⁻¹²	в одной клетке в г·10 ⁻¹⁴
Кинриу	2	293,7±3,14	4,08	7,8	0,52	1717,3±25,29	23,86
	4	325,0±2,99	8,11	14,40	0,56	1910,5±13,36	47,7
Зариф-гут	2	301,5±4,75	4,12	7,8	0,53	1886,0±28,95	25,8
	4	356,8±3,55	7,79	14,40	0,54	2208,0±26,55	48,5
Хар-гут х Зариф-гут (2х)	12	548,3±3,89	11,7	21,26	0,56	2645,0±13,27	55,3
Хар-гут х Зариф-гут (4х)	13	518,0±6,33	12,18			2584,7±34,9	60,7
Хар-гут	22	585,7±5,14	18,5	28,30	0,66	2959,0±17,09	93,3

Согласно полученным нами данным содержание ДНК в одном хлоропласте у диплоидной и полиплоидной формы шелковицы находится на одинаковом уровне. У 22-плоида отмечается лишь небольшое

повышение содержания хлоропластной ДНК в одном хлоропласте.

Аналогичная закономерность установлена при изучении содержания митохондриальной ДНК в листьях разноплоидных сортов и форм шелковицы. 22-плоид по содержанию мДНК превосходит диплоиды в 3,5 раза, РНК – 4,2 раза; у 12-плоида ДНК выше в 2,6 раза, РНК – 3,3 раза, у 13-плоида соответственно - 2,7 и 3,3 раза. Таким образом, было установлено, что количество митохондриальной и хлоропластной ДНК у высокоплоидов не увеличивается соответственно уровню плоидности и в данном случае как в отношении ядерной ДНК действует механизм коррекции.

Суммируя результаты проведенных исследований, можно констатировать следующее: развитие и функциональная активность клеточных органелл контролируется тесной кооперацией дискретных генетических систем ядра и цитоплазмы. Двуетельный генетический контроль биогенеза митохондрий и хлоропластов обуславливает интеграцию их функциональной деятельности в процессах метаболизма и дифференцировки клетки и организма.

4. ДЕЙСТВИЕ ВОДНОГО И СОЛЕВОГО СТРЕССА НА СОДЕРЖАНИЕ РНК, ДНК И ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ ДНК РАЗНОПЛОИДНЫХ СОРТОВ И ФОРМ ШЕЛКОВИЦЫ.

4.1. Действие водного дефицита на всхожесть семян (2х, 4х, 22х)

С целью исследования особенностей действия водного дефицита на всхожесть семян были заложены опыты на диплоидном, тетраплоидном и 22-плоидном сортах шелковицы. Водный стресс создавался при выращивании семян в растворе сахарозы разной концентрации. Было установлено, что семена 22-плоида почти не изменяли всхожести при действии раствора 10, 20 и 25 атмосфер. Концентрация 25 атмосфер снижала процент всхожести у 22-плоида лишь на 10%. Значительно снижался процент всхожести семян при тех же условиях у тетраплоида: на 20% при действии 10 атм., 27% – при 20 атм. и 30% при 25 атм. В аналогичных условиях самый низкий процент всхожести оказался у диплоида, соответственно 70, 64 и 60%. Таким образом, первый эксперимент, поставленный с целью определения условий создающих стресс у различных по плоидности сортов способствовал выявлению различий в устойчивости к водному стрессу и помог выявить условия, при которых возможно было более детально изучить генетические и физиологические особенности адаптации полиплоидов к экстремальным

условиям среды.

4.2. Действие водного дефицита и солевого стресса на показатели РНК и ДНК и фракционный состав ДНК у разноплоидных сортов и форм шелковицы

Под действием водного и солевого стресса обнаруживаются изменения в содержании и фракционном составе у растений, занимающих верхний (22х) и нижний(2х) предел плоидности и у гибрида, полученного при их скрещивании (12х).

Независимо от степени плоидности стрессовые факторы оказывают угнетающее действие на содержание нуклеиновых кислот растений. Во всех вариантах опыта наблюдалась строгая корреляция между изменением показателей РНК и лабильной ДНК, Однако степень изменения показателей РНК и ДНК, а также отдельных фракций ДНК в зависимости от степени плоидности различна и проявляет специфический характер. У диплоида под действием водного и солевого стресса в снижении тотальной ДНК более существенную роль сыграла ДНК стабильного хроматина. У 12-плоида при водном стрессе снижение тотальной ДНК произошло за счет обеих фракций ДНК. Под действием солевого стресса у 12-плоида также как и у диплоида ДНК стабильного хроматина снизилась более существенно по сравнению с ДНК лабильного хроматина. У 22-плоида в снижении тотальной ДНК принимали одинаковое участие ДНК лабильного и стабильного хроматина.

Тенденция к снижению содержания РНК и ДНК, а также фракций ДНК при действии водного и солевого стресса в зависимости от уровня плоидности сопровождается, во-первых, неодинаковой степенью этих изменений, а во-вторых, спецификой изменений происходящих в структурном состоянии ДНК.

В целом, изменения содержания ДНК и РНК и фракций ДНК носят сопряженный характер и составляют основное звено в механизмах адаптивной саморегуляции многих важных для растительного организма физиологических процессов в неблагоприятных условиях среды.

4.3.Изучение процессов перекисного окисления липидов полиплоидных растений при действии водного и солевого стресса

В условиях, когда отсутствуют видимые признаки повреждения растительных тканей, определение скорости перекисного окисления липидов (по содержанию промежуточного продукта ПОЛ - малонового диальдегида) позволяет судить о состоянии мембран, что дает воз-

возможность использовать предлагаемый метод при ранней диагностике состояния компонентов растительных сообществ. Установленная в эксперименте обратная корреляция между степенью пloidности и уровнем МДА в листьях представляет несомненный интерес (таб.3.).

Таблица 3.

Влияние водного стресса на содержание МДА в листьях полиплоидных растений.

Сорта и формы	Пloidность, х	Число хромосом	МДА, мкмоль/г	
			Контроль	Сахароза (30 атм)
Кинриу	2	28	7,98±0,02	8,44±0,33
Ханлар-гут	3	42	4,75±0,21	5,24±0,32
AzT 58-5	4	56	4,01±0,10	6,04±0,29
Хар-гут х Зариф-гут (2х)	12	168	3,07±0,32	11,52±0,22
Хар-гут х Зариф-гут (4х)	13	182	3,8±0,26	4,08±0,11
Хар-гут	22	308	2,86±0,22	3,77±0,21

Опираясь на результаты многочисленных исследований, а также полученные нами данные можно утверждать, что низкое содержание МДА у высокоплоидов является показателем их устойчивости. Нами было изучено действие водного и солевого стресса на процессы ПОЛ у полиплоидных растений. При воздействии сахарозой (30 атм.) наблюдается увеличение содержания МДА в листьях диплоидных и полиплоидных растений, наиболее значительное у 12-плоида.

Под воздействием 0,4 М NaCl почти у всех растений наблюдалось снижение содержания МДА по сравнению с контролем, причем наиболее значительное у низкоплоидов (таб.4). У 22-плоида содержание МДА осталось на уровне контроля, в листьях 12-плоидного гибрида содержание МДА повысилось в 1,5 раза.

При увеличении времени экспозиции содержание МДА в листьях диплоида почти не изменилось, у 12-плоида и 22-плоида значительно снизилось. Воздействие 0,8 М NaCl на растения способствовало значительному повышению содержания МДА. У диплоида содержание МДА достигло уровня контроля, у 12-плоида повысилось в 1,8 раза, у 22-плоида на 30% по сравнению с контролем. Менее интенсивное накопление МДА у 22-плоида указывает на его большую устойчивость к солевому стрессу.

Таблица 4.

**Влияние солевого стресса на содержание МДА
в листьях полиплоидных растений**

Сорта и формы	Плоидность	Число хромосом	МДА, мкмоль/г			
			Контроль	0,4 М NaCl 24 ч.	0,4 М NaCl 48 ч.	0,8 М NaCl 24 ч.
Кинриу	2	28	7,98±0,02	3,08±0,11	2,97±0,07	7,27±0,42
Ханлар-гут	3	42	4,75±0,21	2,20±0,08		
Азт 58-35	4	56	4,00±0,7	3,67±0,26		
Хар-гут х Зариф-гут (2х)	12	168	3,07±0,32	4,61±0,35	2,65±0,17	5,25±0,15
Хар-гут х Зариф-гут (4х)	13	182	3,8±0,26	3,14±0,11		
Хар-гут	22	308	2,86±0,22	2,99±0,13	1,69±0,23	3,73±0,11

На основании полученных данных можно констатировать, что изменение уровня накопления МДА зависит от плоидности растений, от концентрации солей и времени их воздействия.

**4.4. Влияние водного и солевого стресса на содержание
хлорофилла "а" и "b" в листьях разноплоидных
сортов и форм шелковицы.**

В ряде работ, выполненных на растениях, установлено, что накопление зеленых пигментов является защитной реакцией в стрессовых ситуациях. Мы исследовали влияние водного и солевого стресса на диплоидные и полиплоидные растения шелковицы с целью установления различного характера и степени накопления зеленого пигмента, а также определения устойчивости полиплоидных растений.

Согласно полученным данным степень изменения хлорофилла под действием водного стресса у растений полиплоидного ряда носит различный характер. Значительное снижение содержания суммарного хлорофилла отмечается у тетраплоида (13%) и у 12-плоида (29%). Использование растворов с различным осмотическим давлением (20, 25, 30, 35 атм.), давало возможность выявить уровень устойчивости полиплоидных растений. У диплоида при стрессе в 20-30 атм. отмечалось накопление хлорофилла, при 35 атм. суммарное содержание хлорофилла в листьях незначительно снизилось (7,7%). Наименьшая изменчивость по данному признаку проявилась у 22-плоида. Так, при действии стресса от 20 до 35 атм., содержание хлорофилла в листьях изменилось в пределах 82,8-96,3%, т.е. всего на 13%, у тетраплоида

этот признак варьировал в пределах 62-91,6%, т.е. 30%, у 12-плоида – 67,6-88,5%-21%.

Изучение действия солевого стресса также выявило различный характер и степень изменений хлорофилла “a” и “b” в зависимости от уровня плоидности. У диплоида как и при водном дефиците солевой стресс способствовал повышению суммарного содержания хлорофилла. У триплоида под действием солевого стресса содержание хлорофилла почти не изменилось. Наиболее эффективное действие солевой стресс оказал на тетраплоид и 12-плоид, что выразилось в снижении суммарного хлорофилла соответственно на 12% и 30%. 13-плоид и 22-плоид по данному показателю оказались более устойчивыми к действию солевого стресса. Полученные результаты позволяют выделить наименее устойчивые формы, в частности, тетраплоид и 12-плоид. Необходимо отметить, что 12-плоидный гибрид по всем изучаемым показателям оказался слабоустойчивым, а также он характеризуется слабыми ростовыми процессами годичных побегов и листьев, и более коротким сроком вегетации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выявлен полиплоидный уровень, с которого происходит элиминация излишнего генетического материала, названная «полиплоидным сбросом». Показано некротное хромосомному набору увеличение содержания ДНК на клетку и снижение ДНК на хромосому в среднем звене полиплоидного ряда шелковицы, начиная с гексаплоида. У 22-плоида при одиннадцатикратном увеличении числа хромосом содержание ДНК на клетку возрастает в 5 раз. 12-, 13-, 14-плоидные гибриды по содержанию ДНК на клетку занимают промежуточное положение между 22-плоидом и низкоплоидами.

2. Установлено, что, начиная с гексаплоидного уровня шелковицы, происходит изменение соотношения ДНК лабильного и стабильного хроматина. У низкоплоидов содержание ДНК лабильного хроматина превалирует над ДНК стабильного хроматина. Компактизация определенной части ДНК отмечается, начиная со среднего звена полиплоидного ряда. У гексаплоида соотношение лабильной и стабильной фракций ДНК уравнивается. Начиная с гептаплоида, по мере возрастания степени плоидности наблюдается стабилизация ДНК. У высокоплоидов соотношение фракций ДНК изменяется в пользу стабильной фракции ДНК.

3. Установлена положительная корреляционная зависимость

между ядерной, хлоропластной и митохондриальной ДНК у низкоплоидов. У высокоплоидов отмечается некратное хромосомному набору возрастание показателей хлоропластной и митохондриальной ДНК, что свидетельствует о кооперации дискретных генетических систем ядра и цитоплазмы.

4. Изучение количественных показателей ДНК на клетку и хромосому, и анализ структурного состояния ДНК позволил установить особенности генома шелковицы предрасполагающие к полиплоидизации: малый размер генома, наличие механизма коррекции против избыточной генетической информации, компактизация определённой части хроматина.

5. Воздействие на растения полиплоидного ряда шелковицы водного и солевого стрессов приводит к значительным изменениям генетической системы, в частности, содержания РНК, ДНК и фракционного состава ДНК. Характер и степень этих изменений отражают генотипические особенности растений, связанные с их уровнем плоидности.

6. Впервые выявлены особенности изменения перекисного окисления липидов у растений полиплоидного ряда шелковицы. Установлена отрицательная корреляция между содержанием малонового диальдегида и уровнем плоидности. Изучение действия водного и солевого стресса на содержание малонового диальдегида и суммарного хлорофилла выявило относительно устойчивые сорта и формы шелковицы. Установлена общая тенденция возрастания устойчивости растений с увеличением уровня плоидности. Проявление наименьшей устойчивости к солевому стрессу тетраплоида и 12-плоида, по-видимому, объясняется несбалансированностью их генетической системы.

СПИСОК ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **N.S. Kələntərova** Müxtəlif ploidli tut (*Morus* L.) bitkilərinin quraqlığa davamlılıq dərəcəsinin diaqnostikası / Azərbaycan MEA aspirantlarının elmi konfransının materialları. Bakı, 2005, s.108-109
2. **Калантарова Н.С.** Генетические особенности высокоплоидных гибридов шелковицы / Azərbaycan MEA aspirantlarının elmi konfransının materialları. Bakı, 2006, s.302-307
3. **N.S. Kələntərova** Poliploid tut sort və formalarında DNT-nin struktur vəziyyəti / "Biomüxtəlifliyin genetik entiyatları" mövzusunda I beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı, ICARDA, 2006, s. 197
4. **E.M. Axundova, N.S. Kələntərova, S.C. Salayeva** Müxtəlif ploidli tut sort və formalarının quraqlığa davamlılığının DNT-nin struktur vəziyyətindən asılılığı / "Biomüxtəlifliyin genetik entiyatları" mövzusunda I beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı, ICARDA, 2006, s. 198-199
5. **E.M. Axundova, N.S. Kələntərova, Ş.U. Hacıyeva, G.İ. Əlizadə** Müxtəlif ploidli tut bitkilərinin quraqlıq stressinə qarşı davamlılığı / "Biologiyada elmi nailiyyətlər" mövzusunda respublika elmi konfransının materialları. Bakı, BDU, 2006, s.71-72
6. **E.M.Axundova, N.S. Kələntərova, Ş.U. Hacıyeva, G.İ. Əlizadə** *Morus* L. cinsində ploidlik səviyyəsinin artması ilə əlaqədar DNT fraksiyalarının dəyişilməsi / "Tətbiqi biologiyanın problemləri" mövzusunda respublika elmi konfransının materialları. Bakı, BDU, 2007, s.94-95
7. **АхундоваЭ.М., Калантарова Н.С., Гаджиева Ш.У.** Действие водного стресса на содержание РНК и ДНК и фракционный состав ДНК / Akademik Həsən Əliyevin 100 illik yubileyinə həsr olunmuş "Ekologiya: təbiət və cəmiyyət problemləri" mövzusunda beynəlxalq elmi konfransın materialları. Bakı, BDU, 2007, s.261
8. **Ахундова Э.М., Калантарова Н.С.** Структурное состояние ДНК у высокоплоидов шелковицы / "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования" III Международный симпозиум. Москва, 2007, с.25-28
9. **Ахундова Э.М., Калантарова Н.С.** Элиминация генетического материала в процессе полиплоидизации рода *Morus* L. // Bakı Universitetinin xəbərləri. Bakı, 2007, №4, s.68-73

10. **Калантарова Н.С.** Изучение процессов перекисного окисления липидов у полиплоидных растений при действии водного стресса. // *Azərbaycan Aqrar Elmi*. Bakı, 2008, №3, s.135-136
11. **Калантарова Н.С.** Изучение процессов перекисного окисления липидов у полиплоидных растений при действии солевого стресса // *Azərbaycan Aqrar Elmi*. Bakı, 2008, №8-9, s.144-146
12. **Ахундова Э.М., Калантарова Н.С.** Генетические системы у полиплоидов шелковицы и их взаимодействие. // *Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası Botanika İnstitutunun elmi əsərləri*. Bakı, 2008, XXVIII cild, s. 281-284
13. **Калантарова Н.С.** Структурное состояние ДНК в листьях аутотетраплоидов шелковицы / "Biologiyanın müasir problemləri" mövzusunda respublika elmi konfransının materialları. Bakı, BDU, 2008, s.85
14. **Ахундова Э.М., Калантарова Н.С.** Внеядерные геномы полиплоидов шелковицы / "Biologiyanın müasir problemləri" mövzusunda respublika elmi konfransının materialları. Bakı, BDU, 2008, s.86
15. **Полухова Н.С.** Действие водного и солевого стрессов на перекисное окисление липидов полиплоидной шелковицы // *Вестник Российской Академии Сельскохозяйственных наук*. Москва, 2011, №4, с.43-45
16. **Полухова Н.С., Ахундова Э.М.** Элиминация генетического материала в полиплоидном ряду рода *Morus* L. // *AMEA-nın Xəbərləri (biologiya elmləri)*. Bakı, Elm, 2012, cild 67, № 1, s.112-121

**TUT (*MORUS* L.) BITKISİNİN POLİPLOİD SİRASI
GENOMLARININ XÜSUSİYYƏTLƏRİ VƏ ONLARIN STRES
AMİLLƏRƏ DAVAMLILIĞI**

XÜLASƏ

Poliploidiya ali bitkilərin təkamülündə mühüm rolu olan əsas mexanizmlərdəndir. Mədəni bitkilərin 90%-nin poliploid strukturlu genotipə malik olması, poliploidyanın molekulyar-genetik səviyyədə öyrənilməsinin elm və praktika üçün fundamental əhəmiyyət kəsb etdiyini sübut edir.

Morus cinsinin spontan və eksperimental yolla yaranmış poliploid formalarının öyrənilməsi, poliploidiya fenomeninin əsas xüsusiyyətlərini aşkar edir və bitkilərin kariotipik təkamülündə mühüm rol oynayan genom mutasiyalarının əsas mexanizmlərini aydınlaşdırır.

Dissertasiya işində ilk dəfə olaraq yalnız aşağı ploidlərdə hüceyrədə DNT-nin miqdarının ploidlilik səviyyəsinə uyğun şəkildə artması, heksaploidlərdən başlayaraq isə bu qanunauyğunluğun pozulması aşkar olunmuşdur. Orta ploidlilik bitkilərdə bir hüceyrədə DNT-nin miqdarının, nəzəri gözləndiyi kimi, 3- 4.5 dəfə deyil, 2.4-2.8 dəfə artması müşahidə olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, heksaploid səviyyəsindən başlayaraq, labil xromatin DNT-nin stabil xromatin DNT-nə nisbətində dəyişiklik baş verir. Orta ploidlilik və yüksək ploidlilik bitkilərdə DNT-nin stabilləşməsi və kompakt xromatinin payının artması, xromosomun heteroxromatin hissələrinin ətraf mühitin dəyişkən şəraitinə tez bir zamanda adaptasiya olunması ilə uzlaşır və öz növbəsində tutun poliploid sort və formalarının su və duz streslərinə qarşı daha yüksək davamlılığı ilə təsdiq olunur.

İlk dəfə olaraq, *Morus* cinsinin poliploid sırasında xloroplast və mitoxondri DNT-nin hüceyrədəki miqdarı təyin olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, aşağı ploidlərdə xloroplast və mitoxondri DNT-si ploidlilik səviyyəsinə münasib artır, yüksək ploidliliklərdə isə bu qanunauyğunluq qeyd olunmamışdır. Xloroplast və mitoxondri DNT-si ilə nüvə DNT-nin miqdarı arasında müsbət korrelyasiya müəyyən olunmuşdur.

Quraqlıq və duzluluq streslərinin təsirindən poliploid bitkilərdə DNT və RNT-nin miqdarında, DNT-nin quruluşunda dəyişikliklər baş verir. Genetik sistemdə baş verən dəyişikliklərin istiqaməti və dərəcəsi bitkilərin genotipik xüsusiyyətlərindən, xüsusilə ploidlilik səviyyəsindən asılıdır. 22-ploidə isə

stres təsirə qarşı onun yüksək davamlılığını izah edən əhəmiyyətsiz dəyişikliklər baş vermişdir.

Tədqiqat zamanı müxtəlif ploidli bitkilərdə duzluluq və quraqlıq streslərinə qarşı davamlılıqla yarpaqlarda malon dealdehidinin miqdarı arasında mənfi korrelyasiya müşahidə edilmişdir.

Tədqiqat işində quraqlıq və duzluluq streslərinin təsirindən xlorofil “a” və “b”-nin miqdarında baş verən dəyişikliklər araşdırılmışdır. Müxtəlif dərəcədə (20, 25, 30, 35 atm. saxaroza məhlulu) quraqlıq streslərinin yaradılması poliploid bitkilərdə adaptivlik səviyyəsinin təyininə imkan yaradır. Xlorofil “a” və “b”-nin miqdarının tədqiqi davamlı sort və formaların müəyyən edilməsinə əsas verir.

Molekulyar-genetik analizin tətbiqi müxtəlif ploidli bitkilərin genomunun quruluş-funksional xüsusiyyətlərini və poliploid hüceyrələrin genetik aparatında baş verən dəyişiklikləri müəyyən etməklə onların fizioloji və biokimyəvi adaptasiya proseslərinin mexanizmlərini aşkar etməyə imkan verir.

Alınan nəzəri nəticələr sübut edir ki, eksperimental poliploidyanın inkişafı tut bitkisinin növ və sortlarının yaxşılaşdırılması üçün zəmin yarada bilər. Dissertasiya işində təqdim olunan nəticələr optimal ploidlik səviyyəsinin təyində və yüksək ploidli tut bitkisinin faydalı xüsusiyyətlərinin praktikada istifadəsində olduqca əhəmiyyətlidir. Bunlar mədəni bitkilərdə eksperimental poliploidiya üsullarının tətbiq dairəsini xeyli genişləndirir.

**FEATURES OF GENOME POLIPILOID SERIES OF MULBERRY
(*MORUS* L.) PLANT AND THEIR STRESS FACTORS
RESISTANCE.**

SUMMARY

Polyploidy - is one of the main mechanisms in the evolution of higher plants. Given that the majority of crops have 90% polyploidy structure of genotype and study of polyploidy in molecular-genetic level has fundamental importance for the study and practice of science.

Studying of *Morus* genus having the big variety of genetic forms in natural conditions and predisposed to induced polyploidy, clears up understanding of a phenomenon of polyploidy and shines the basic mechanisms of genome mutations playing the important role in karyotype of plants.

Increase of quantity of cellular DNA according to a level of ploidy occurs only at lowploidy, since hexaploids has been revealed and infringement of this regularity has been established in our work for the first time. The increase of DNA quantity in one cell not in 3-4,5, and in 2,5-2,8 times has been revealed at middleploids. Changes in structure of DNA are observed since hexaploids. So at lowploids the labile chromatin DNA prevails above stable chromatin DNA, at hexaploids the quantity of stable and labile fractions is equalized, since heptaploid in structure of DNA is observed the stabilization of DNA inherent to highploids.

Middle and highploidy DNA stabilization and compact chromatin increasing share of crops, the environment variable components chromosome heterochromatin to comply with the conditions as soon as possible and, in turn, keep polyploidy adapted varieties and forms resistant to drought and salt stresses are confirmed.

The quantity of chloroplast and mitochondrial DNA in plant cells of polyploids of some genus of *Morus* has been determined for the first time. It was defined that the low level of ploidy of chloroplast DNA and mitochondria is affordable, but this pattern was not recorded in highploidy. Positive correlation dependence between chloroplasts, mitochondrial and nuclear DNA has been observed.

Changes in quantity of DNA and RNA and in structure of DNA at polyploidy plants occurred under action of drought and salt stress. Directivity and a degree of changes occurring in genetic system depend in genotypic

features of plants, in particular on ploidy of levels. The minor alterations at 22-ploid which have occurred under stress action is possible to explain by its high stability.

Negative correlation between maintenance of MDA in leaves while drought and salt stresses resistance has been established at heteroploidy plants through investigation.

Changes occurring in quantity of “a” and ” b” chlorophyll under action of drought and salt stresses have been revealed during the research. Level of adaptation at polyploidy plants allows revealing creation of drought stress of various concentrations. Studying of quantity of “a” and ” b” chlorophyll enables to reveal steady of varieties and forms.

Application of a molecular-genetic analysis allows to define the mechanisms of the physiological and biochemical adaptation processes by observing the changes occurred in the genetic device and structural functional features of polyploidy cell of varieties and forms of mulberry. Obtained theoretical data show that the development of experimental polyploidy gives opportunity to improve the varieties and forms of mulberry plants.

The presented results are very important for definition of an optimum level of ploidy and applications of useful features of highploidy plants of a mulberry in practice. All this considerably expands a scope of methods of experimental polyploidy of crops.

**AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
BOTANİKA İNSTİTUTU**

Əlyazması hüququnda

NATAVAN SABIR QIZI POLUXOVA

**TUT (*MORUS* L.) BITKISİNİN POLİPLOİD SİRASI
GENOMLARININ XÜSUSİYYƏTLƏRİ VƏ ONLARIN STRES
AMİLLƏRƏ DAVAMLILIĞI”**

03.00.15- Genetika

Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın

A V T O R E F E R A T I

BAKİ – 2012