

РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

УДК 581.331.1 + 575.224.234:

СПЕЦИФИКА СТРУКТУРНЫХ АНОМАЛИЙ ЗАРОДЫШЕВЫХ МЕШКОВ У ГАПЛОИДОВ И МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ТАБАКА

Н.Х. Еналеева

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Один из подходов к исследованию закономерностей, лежащих в основе генетической регуляции развития женского гаметофита у растений заключается в исследовании гаметофитных мутантов – форм с наследственными изменениями в проявлении признаков микро- и/или мегагаметофита. Известны три группы мутаций – генные, хромосомные и геномные (Гершензон, 1983, 1991), каждая из которых характеризуется специфическим спектром нарушений в структурно-функциональной организации мегагаметофита (Еналеева, Тырнов, 2000).

К группе геномных мутаций относятся генетические изменения, выражающиеся в кратном умножении или уменьшении целых хромосомных наборов. В последнем случае речь идет о гаплоидах – особях растений с редуцированным гаметическим числом хромосом. Наличие одинарного набора хромосом вследствие отсутствия конъюгации на стадии профазы I мейоза ведет к значительным нарушениям на последующих мейотических стадиях и формированию спор с недостающими хромосомами. Как правило, такие мегаспоры не способны к дальнейшему развитию, однако иногда из них формируются 3М аномального строения. В связи с этим гаплоидные растения представляют собой уникальный материал, позволяющий выявлять специфику мегагаметогенеза при нехватке генетической информации.

Сходные нарушения мейоза наблюдаются у межвидовых гибридов – аллодиплоидов (Гуляев, Мальченко, 1983). Вследствие негомологичности хромосом родительских форм и отсутствия по этой причине конъюгации на стадии профазы I формируются споры с несбалансированным хромосомным набором, неспособные к нормальному гаметофитогенезу. Учитывая это, аллодиплоиды, так же как и гаплоиды, могут быть использованы в качестве объектов для исследования закономерностей мегагаметофитогенеза при хромосомном дисбалансе в инициальной клетке 3М.

Имеющиеся к настоящему времени литературные данные по эмбриологии гаплоидов (Webber, 1933; Звержанская, 1974; Звержанская, Шишкинская, 1974; Еналеева, Душаева, 1975) и межвидовых гибридов (Лиферова, 1978, 1984; Пахомова, 1973, 1978; Горбуненко, 1991; Молхова, 1972 и др.) основаны на анализе единичных 3М, поэтому сделать заключение о диапазоне варьирования мегагаметогенеза и существовании тенденции (либо ее отсутствии) к

формированию ЗМ определенного типа у этих групп растений не представляется возможным.

Использование экспресс-метода, основанного на приготовлении клеточной суспензии, позволяет проводить массовый анализ ЗМ у видов с tenuinucellатыми семяпочками, что открывает перспективы для получения на обширном материале новой информации об особенностях мегагаметофитогенеза у гаплоидов и межвидовых гибридов.

В настоящей работе представлены результаты исследования гаплоидов *Nicotiana tabacum L.*, полученных разными способами из генетически неоднородного материала, и гибридов *N. tabacum L x N. sylvestris Speng et Comes*.

Материал и методы

В качестве материала использовали:

- МГ-32 - матроклинный гаплоид – член двойни, выявленной при проращивании семян линии БГ-32;

- АГ-145 - андроклинный гаплоид, полученный в культуре изолированных пыльников растения сорта Дюбек 44 а.в.; пыльники в стерильных условиях изолировали на стадии микроспоры и культивировали на среде МС с добавлением агар-агара, 2% сахарозы, ИУК (0,1 мг/л) и кинетина (0,2 мг/л);

- АГ2-141 - гаплоид второго андроклинового цикла, полученный в результате культивирования пыльников реституционного диплоида, который в свою очередь был получен на основе культуры изолированных пыльников линии БГ-141; условия культивирования те же, что и в предыдущем варианте.

Для получения межвидовых гибридов предварительно кастрированные цветки растения линии БГ-6 вручную опыляли пылью растения *N. sylvestris*. Из завязавшихся семян на следующий год выращены растения, три из которых использованы для анализа.

Растения произрастали в открытом грунте на экспериментальном участке. Завязи фиксировали ацетоалкоголем (1:3) на 3-4 сутки после распускания цветков.

Препараты для изучения ЗМ готовились с применением метода ферментативной мацерации семяпочек до клеточной суспензии (Еналеева и др., 1972). Количественный учет семяпочек с ЗМ проводился на препаратах просветленных семяпочек (Негг, 1971) с помощью микроскопа Zetopan с фазово-контрастным устройством. Морфологический анализ ЗМ проводился методом светлого поля в проходящем свете при увеличении 10х63. Рисунки выполнены с использованием рисовального аппарата РА-4.

При анализе результатов и изготовлении графических иллюстраций использовали программу Excel для Windows.

Результаты

Подсчет семяпочек, в которых произошло развитие ЗМ, показал, что частота этих событий для гаплоидов МГ-32, АГ-145 и АГ2-141 составляет 12%, 5% и 13%. В большинстве семяпочек обнаружены дегенерирующие остатки ме-

гаспор. Частоты развивающихся ЗМ в семяпочках трех межвидовых гибридов составили 78%, 80% и 82%.

Спектры аномальных ЗМ гаплоидов. У трех гаплоидов идентифицировано 104, 61 и 63 структур, из них большинство – 66, 43 и 49 оказались ЗМ аномального строения. Согласно ранее принятой классификации (Еналеева, 2001), в основу которой положено число ядер и наличие либо отсутствие цитокинеза, аномальные ЗМ распределились на 6 основных групп: (1) с числом ядер <8 ценоцитные; (2) с числом ядер <8 клеточные; (3) с числом ядер =8 ценоцитные; (4) с числом ядер =8 клеточные; (5) с числом ядер >8 ценоцитные; (6) с числом ядер >8 клеточные. Наряду с ЗМ у всех трех гаплоидов обнаружены «клеточные комплексы» - образования из нескольких клеток. Количественные соотношения структур каждой группы у исследованных растений представлены в таблице 1.

Значительную часть аномальных ЗМ составили ценоцитные образования – 66,7, 61,1 и 66,7%. Ядра одного и того же ЗМ могли быть одинаковыми, либо значительно варьирующими по размеру, форме и числу ядрышек (Рис. 1 с, и). В некоторых ЗМ ядра сформированы в результате нескольких аномальных митозов, о чем свидетельствует их неправильная форма, множество ядрышек и видимые фрагменты ядерных оболочек (Рис. 1 в-д, т). Согласно приведенным в таблице 2 данным, наиболее многочисленную группу составили двуядерные ЗМ.

Клеточные ЗМ встречались с частотами 26,4, 20,4 и 15,0%; за небольшим исключением, это были ЗМ с уменьшенным, по сравнению с нормой, числом ядер и клеток (Табл. 1.). Двуклеточные ЗМ содержали небольшую одноядерную клетку, расположенную у одного из полюсов и крупную «центральную» клетку с одним, двумя или тремя ядрами. Условно эти типы обозначены как 1(1)0 (Рис. 2 г); 1(2)0 (Рис. 2 б) и 1(3)0^{*)}. Трехклеточные ЗМ представлены типами 2(1)0 и 2(2)0 (Рис. 2 г), четырехклеточные ЗМ были биполярными типа 2(1)1 (Рис. 2 и) или монополярными типа 3(1)0 (Рис. 2 ж). 5-7-яерные ЗМ варьировали по числу, морфологии клеток и их локализации (Рис. 2 д, з, к, м). В одном случае ЗМ содержал 11 ядер (Рис. 2 и). Частоты встречаемости клеточных ЗМ разной структурной организации представлены в таблице 4.

«Клеточные комплексы» состояли из нескольких клеток увеличенного (по сравнению с обычными нупеллярными клетками) размера, при этом число клеток могло достигать 7 (Рис. 3 е). Клетки были одноядерными или с разным числом ядер, одинакового или разного размера (Рис. 3).

Спектры аномальных ЗМ межвидовых гибридов. У трех гибридных растений идентифицировано 98, 93 и 94 структур, из них 89, 87 и 90 оказались ЗМ аномального строения. Основная их часть - 84,7, 85,9 и 86,2% представлена ценоцитными ЗМ, преимущественно с уменьшенным числом ядер (Табл. 1, 2).

*) первая цифра означает число клеток на одном из полюсов; вторая, заключенная в скобки, - число ядер в «центральной» клетке; третья – число клеток на другом полюсе.

Таблица 1. Результаты анализа 3М гаплоидов и гибридов *Nicotiana tabacum* L. x *N. sylvestris* Spreng et Comes.

Вариант	Всего структуртур	Всего 3М		Аномальных 3М с числом ядер:						Многоклеточных ком-плексов	
		аномальных	нормальных	< 8		= 8		> 8		клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн. плексов
				клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн.	клеточн. ценоцитн.		
Гаплоид 5.32	104	66	6	17	45	0	1	1	2	32	
Гаплоид Д-44	61	43	11	10	33	0	0	0	0	7	
Гаплоид БГ-5	64	49	11	8	39	1	0	0	1	4	
N.t x N.s. #1	98	89	9	4	83	1	0	1	0	0	
N.t. x N.s. #2	93	87	5	8	77	0	2	0	0	1	
N.t. x N.s. #3	94	90	4	9	80	0	1	1	0	0	

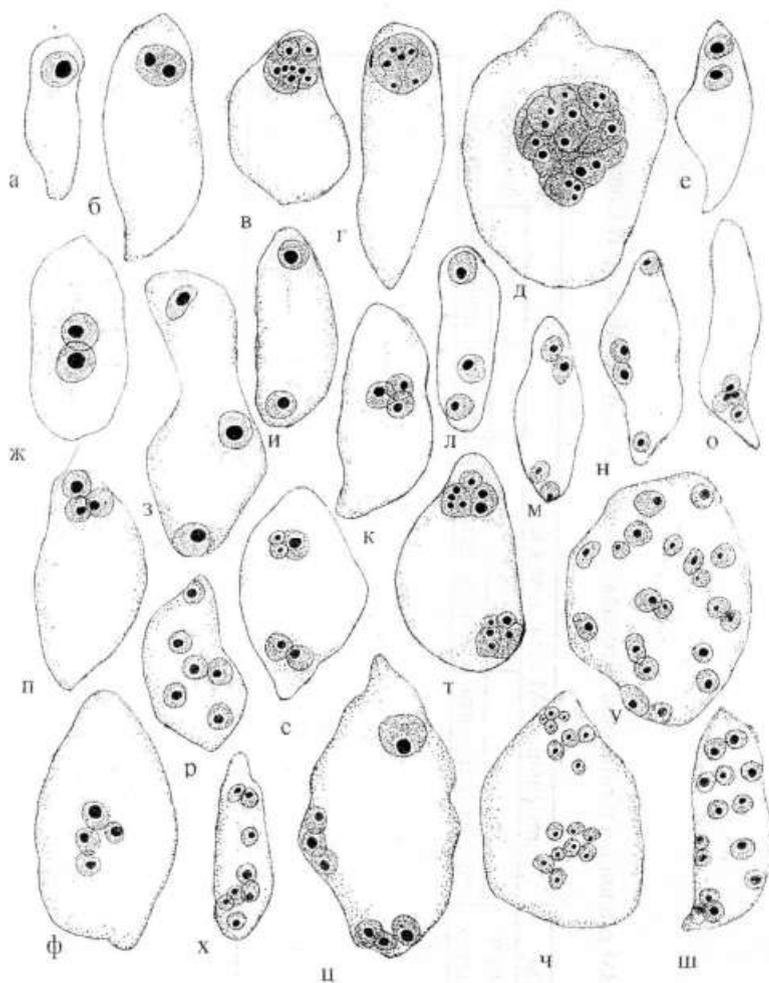


Рис. 1. Аномальные зародышевые мешки ценотитной структуры гаплоидов и межвидовых гибридов табака: а-т, ф, ц – с числом ядер < 8 ; б-д, т – с ядрами, образованными в результате аномальных митозов; х – с числом ядер $= 8$; ч – 16-ядерный 3М; ш – с 14 ядрами; у – с 20 ядрами.

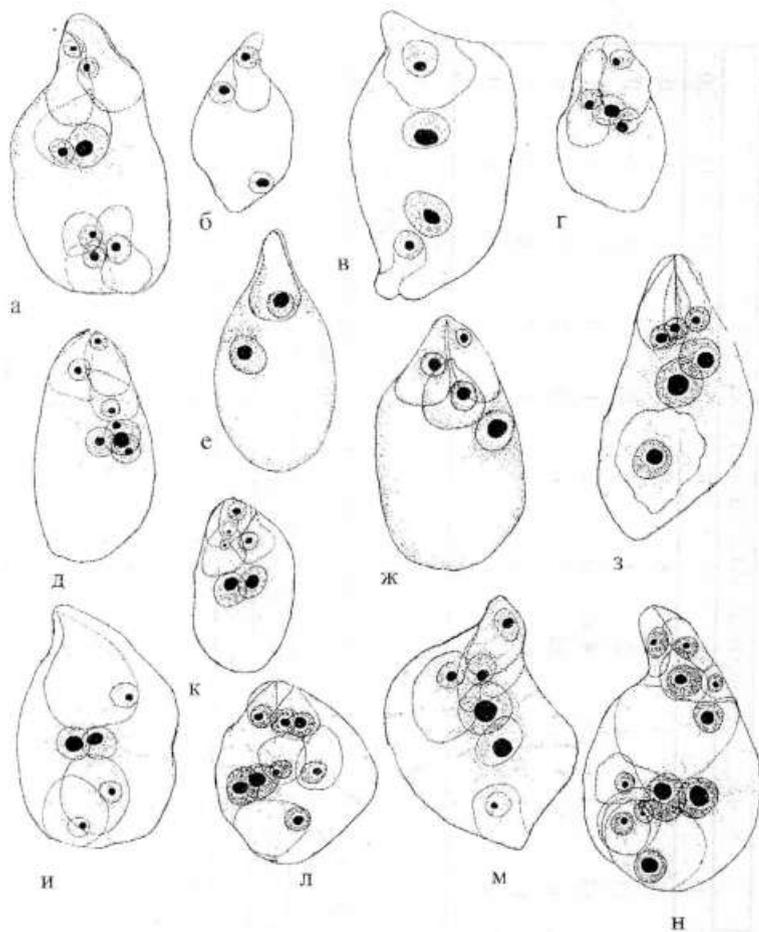


Рис. 2. Клеточные зародышевые мешки гаплоидов и межвидовых гибридов табака: а – нормального строения; б-м – с числом ядер <8; н – 11-ядерный.

Таблица 2. Распределение аномальных ценоцитных ЗМ по числу ядер у гаплоидов и межвидовых гибридов табака

Генотип	Общее число (%) ценоцитных ЗМ	Число ценоцитных ЗМ с числом ядер:												
		1	2	3	4	5	6	7	8	14	16	20		
Гаплоид 5.32	48 (66,7)	6	21	1	9	6	0	2	1	1	1	0	0	0
Гаплоид Д-44	33 (61,1)	11	13	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Гаплоид БГ-5	40 (66,7)	13	14	5	4	0	2	1	0	0	0	0	1	0
N.t x N.s. #1	83 (84,7)	9	37	10	24	3	0	0	0	0	0	0	0	0
N.t. x N.s. #2	79 (85,9)	17	31	9	17	1	1	1	1	2	0	0	0	0
N.t. x N.s. #3	81 (86,2)	6	40	10	18	1	3	2	1	0	0	0	0	0

Таблица 3. Распределение аномальных клеточных ЗМ по числу ядер у гаплоидов и межвидовых гибридов табака

Генотип	Общее число (%) клеточных ЗМ	Число клеточных ЗМ с числом ядер:											
		2	3	4	5	6	7	8	10				
Гаплоид 5.32	19 (26,4)	5	2	5	2	3	1	0	1	0	0	0	0
Гаплоид Д-44	11 (20,4)	3	2	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Гаплоид БГ-5	9 (15,0)	0	2	3	3	0	0	1	0	0	0	0	0
N.t x N.s. #1	6 (6,1)	1	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
N.t. x N.s. #2	8 (8,7)	0	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N.t. x N.s. #3	9 (9,2)	2	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

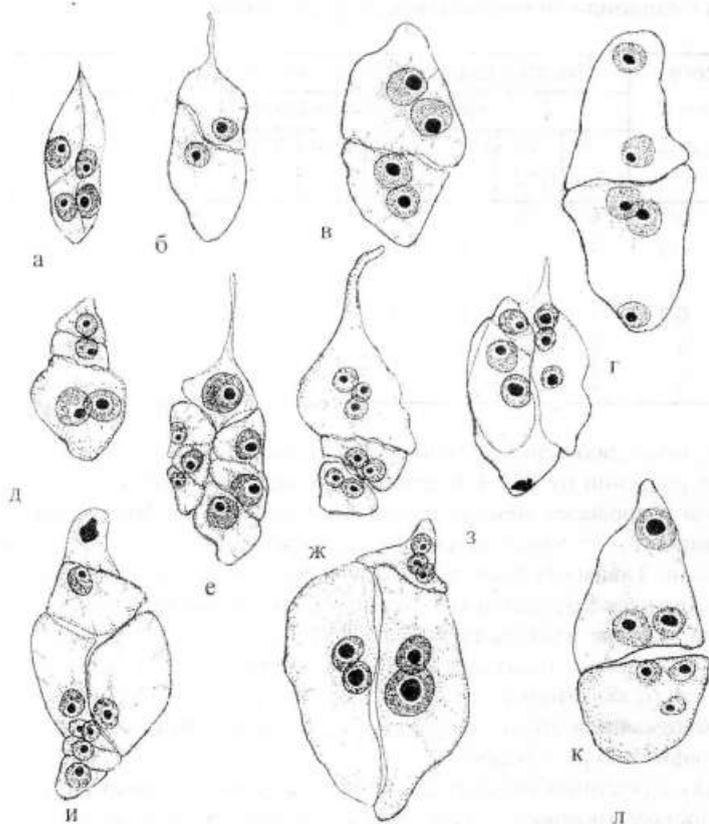


Рис. 3. «Клеточные комплексы», выделенные из семян гаплоидов табака: а, д, ж, з, к – трехклеточные; б-г, л – двухклеточные; е – семиклеточный; и – шестиклеточный.

Клеточные ЗМ встречались с частотами 6,1, 8,7 и 9,6%; в основном это были двухклеточные ЗМ типа 1(1)0 или 1(2)0 (Табл. 4). Один ЗМ оказался одиннадцатиядерным, и в одном случае обнаружен «клеточный комплекс».

Обсуждение

Результаты анализа ЗМ трех гаплоидов разного происхождения дают представление о фенотипическом эффекте в женской генеративной сфере ге-

Таблица 4. Частоты встречаемости клеточных ЗМ разных типов структурной организации у гаплоидов и межвидовых гибридов табака

Вариант	Всего клеточных ЗМ	Число клеточных ЗМ с числом ядер:								
		2 - 4 с распределением ядер:						5-7	8	10
		1(1)0	1(1)1	1(3)0	2(1)0	2(1)1	3(1)0			
1(2)0	1(2)1		2(2)0							
Гаплоид 5.32	19	6	0	3	1	1	1	6	0	1
Гаплоид Д-44	11	3	2	0	3	0	1	2	0	0
Гаплоид БГ-5	9	1	1	0	0	2	5	0	0	0
N.t x N.s. #1	6	4	0	0	0	0	0	0	1	1
N.t. x N.s. #2	8	5	2	1	0	0	0	0	0	0
N.t. x N.s. #3	9	5	1	0	1	0	1	1	0	0

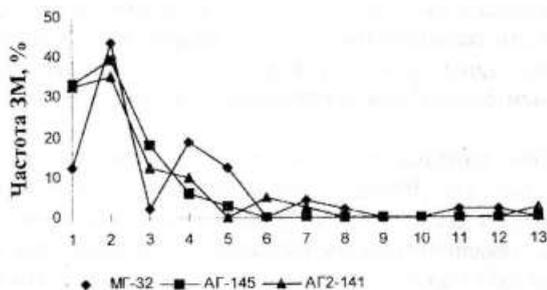
номной мутации, проявляющейся в уменьшении вдвое числа хромосом в соматических клетках растений ($n=24$). Как известно, вследствие унивалентного состояния хромосом в профазе I мейоза, нарушается процесс их сегрегации и в результате формируются споры, а затем – материнская клетка ЗМ с недостающими хромосомами. Таким образом, у гаплоидов на фоне геномной мутации в спорофите проявляются хромосомные мутации – анеуплоидия на этапе мегаспорофитогенеза. Низкая частота семян (5-13%), с развивающимися ЗМ свидетельствует о том, что программа мегаспорофитогенеза в большинстве случаев “не запускается”. Это означает, что для ее запуска в МКЗМ должна содержаться необходимая для этого информация, следовательно, данный процесс имеет гаметофитную регуляцию.

Если в силу случайных обстоятельств формируется инициальная клетка ЗМ с полным набором хромосом, такие факты известны из литературы (Звержанская, Шишкинская, 1974), это ведет к нормальному мегаспорофитогенезу и образованию типичного ЗМ. В случае неполной информации в геноме материнской клетки ЗМ программа дальнейшего развития реализуется неполностью, и в итоге формируется ЗМ аномальной структуры.

Как можно видеть из рисунка 4, самыми многочисленными у всех трех гаплоидов являются 1-2-ядерные ЗМ. Следующей по частоте является группа 3-4-ядерных ЗМ, а ЗМ с большим числом ядер встречаются редко. Клеточные ЗМ у гаплоидов составляют менее 20%. Их распределение (данные по 3 гаплоидам суммированы) в зависимости от числа ядер представлено на рисунке 5. Очевидно, что в большинстве случаев - это 4-ядерные ЗМ, реже встречаются 2-, 3- и 5-ядерные (в равных количествах), ЗМ с большим числом ядер - единичны.

Одно из наиболее интересных цитологических явлений, зарегистрированных нами у гаплоидов, заключается в формировании с высокой частотой «клеточных комплексов». По всей вероятности, в основе этого феномена лежит

Гаплоиды



Гибриды

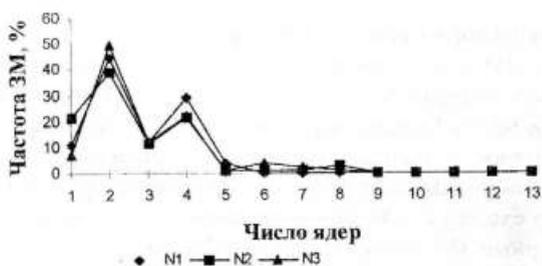


Рис. 4. Распределение ценотических 3М *N. tabacum* и гибридов *N. tabacum* x *N. sylvestris* по числу ядер.

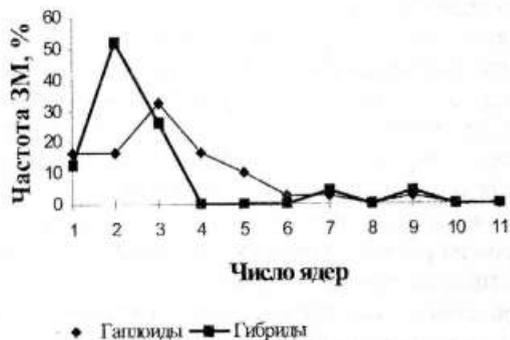


Рис. 5. Распределение клеточных 3М *N. tabacum* и гибридов *N. tabacum* x *N. sylvestris* по числу ядер.

разрастание нескольких клеток нуцеллуса, аналогично образованию многоклеточного археспория, но его развитие блокируется на ранних стадиях. То, что этот реликтовый признак чаще проявляется именно у гаплоидов, возможно, объясняется гемизиготным состоянием генетических систем, контролирующих данный признак.

Поскольку в геноме аллодиплоида *N. tabacum* содержится геном *N. sylvestris* (Костов, 1930, цит. по: Лобашев, 1969), принципиальное отличие 36-хромосомных гибридов от 24-хромосомных гаплоидов заключается в наличии у гибридов 12 хромосом, обеспечивающих возможность конъюгации в мейозе (по крайней мере частичной) половины имеющихся хромосом. Это означает, что в унивалентном состоянии у этих форм преимущественно должны находиться лишь 12 хромосом *N. tomentosiformis*. Следовательно, хромосомный дисбаланс в МКЗМ гибридов должен проявляться в основном в отношении этой группы хромосом.

Результаты цитологического изучения гибридов *N. tabacum* x *N. sylvestris* показали, что развитие ЗМ у них происходило в 78-82% семян, то есть, почти в 20 раз чаще чем у гаплоидов, хотя уровень аномалий у формирующихся ЗМ тот же самый - 90,8-95,7% (у гаплоидов - 82-94,2%). Спектры аномальных ЗМ у гибридов и гаплоидов в значительной степени совпадают. Отличие состоит в большей доле ценоцитных малоядерных ЗМ у гибридов. Распределение этих ЗМ по числу ядер сходно с таковым у гаплоидов. Самыми высокочастотными являются двуядерные ЗМ, затем в порядке убывания следуют: четырехъядерные, одно- и трехъядерные (почти равновероятно). Пяти-восьмиядерные ЗМ встречаются в единичных случаях, а ЗМ с числом ядер более 8 отсутствуют. Клеточные ЗМ, так же как у гаплоидов - преимущественно с двумя и четырьмя ядрами. Образования типа «клеточных комплексов» для гибридов не характерны (зарегистрирован всего один случай), что свидетельствует в пользу высказанного предположения о роли гемизиготности в индукции данного явления.

В целом, можно заключить, что у гаплоидов *Nicotiana tabacum* и гибридов *N. tabacum* x *N. sylvestris* преимущественно формируются ценоцитные ЗМ с уменьшенным числом ядер. Это означает, что осуществление начальных этапов - разрастание мегаспоры и деление ядра с образованием двуядерного ЗМ происходит сравнительно легко, но затем в большинстве случаев развитие блокируется. По-видимому, для осуществления нескольких митотических циклов и цитокинеза требуется одновременное присутствие в геноме материнской клетки ЗМ генетических факторов из разных хромосом, а у гаплоидов и аллодиплоидов такое сочетание достигается в редких случаях.

Таким образом, представленные данные дают достаточно полное представление о диапазоне структурного разнообразия ЗМ у двух групп растений с геномными мутациями, вызывающими формирование инициальной клетки ЗМ с дефицитом генетической информации. Полученная картина позволяет констатировать существование у этих групп растений четко выраженной тенденции к образованию ЗМ определенных цитологических типов.

ЛИТЕРАТУРА

- Гершензон С.М. Основы современной генетики. - Киев: Наукова думка.- 1983.- 558 с.
- Гершензон С.М. Мутации. - Киев: Наукова думка. 1991.- 111 с.
- Горбуненко О.Б. Развитие семязачатка и зародышевого мешка гибрида *Juglans sieboldina* x *J. regia* // Ботан. исслед., 1991.- №9.- С. 81-87.
- Гуляев Г.В., Мальченко В.В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции, семеноводству и семеноведению. - М.: Россельхозиздат., 1983.- С. 9-10.
- Еналеева Н.Х., Душаева Н.А. Изучение женского гаметофита у андрогинных гаплоидов табака. // Вопросы ботаники и генетики. - Саратов.- Изд-во Саратов. ун-та, 1975. - Вып. 3. - С. 42-43.
- Еналеева Н.Х., Тырнов В.С. Гаметофитные мутации // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3 / Под ред. Т. Б. Батыгиной. СПб: Мир и семья, 2000.- С. 378-384.
- Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Хохлов С.С. Выделение зародышевых мешков покрытосеменных растений путем мацерации тканей // Цитология и генетика. -1972.- №5. - С. 439-441
- Звержанская Л.С. Мегаспорогенез и развитие зародышевого мешка у гаплоидов кукурузы линии ВГ-10.// Апомиксис и цитоэмбриология растений. Вып. 2. Изд-во Саратовского ун-та.- 1971. - С. 84-94.
- Звержанская Л.С., Шишкинская Н.А. Мейоз и формирование мужского и женского гаметофитов у гаплоидов// Гаплоидия у покрытосеменных растений. Часть II. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та.- 1974.- С.7-42.
- Лиферова В.В. Развитие женского гаметофита у смородинно-крыжовниковых гибридов первого и второго поколений// Проблемы гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенезаю Тез. VII Всес. симп. по эмбриол. растений. Ч. 1. Киев: Наукова думка.- 1978.- С. 33-36.
- Лиферова В.В. Отклонения в развитии женского гаметоита у смородинно-крыжовникового гибрида первого поколения// Морфофункциональные аспекты развития женских генеративных структур семенных растений. Телави.- 1984.- С. 34-35.
- Лобашев М.Е. Генетика.Л.: Изд-во Ленинградского ун-та.-1969. - С. 516-517.
- Молдова Е. Проучване на мъжки и женски гаметофити при пшенично-ръжени хибриди// Отдалена хибридизация на растенията. София.- 1972.- С. 67-74.
- Пахомова Н.П. Особенности развития женского гаметофита у некоторых отдаленных гибридов в роде *Ribes*// Половой процесс и эмбриогенез растений.- М.- 1973.- С. 174-175.
- Пахомова Н.П. Особенности развития женского гаметофита у межвидовых гибридов плодовых и ягодных культур// Проблемы гаметогенеза, оплодотворения и эмбриогенезаю Тез. VII Всес. симп. по эмбриол. растений. Ч. 3 Киев: Наукова думка.- 1978.- С. 66-67.

Herr J. M., Jr. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. Vol. 58, N 8. P. 785-790.

Webber I.M. Cytological features of *Nicotiana glutinosa* haploids// Journ Agric. Research.- 1933.- 47, N 11.- P. 845-867.

УДК 581.3 + 581.4:

ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМ ТАБАКА С РАННИМ ЗАЦВЕТЕНИЕМ

А.Ю. Колесова, С.Ю. Белашов, Н.Х. Еналеева

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Табак является одним из наиболее удобных объектов для проведения экспериментальных исследований по эмбриологии и генетике растений. Наличие значительного количества семян в завязи, обильное цветение и успешно применяемые методы экспресс-анализа, основанные на ферментативной мацерации и просветлении семян, позволяют проводить массовый анализ зрелых зародышевых мешков (ЗМ) и наблюдать их развитие. Кроме того, для табака разработаны методы культивирования изолированных завязей и семян в условиях *in vitro*, что дает возможность для проведения опытов по воздействию физических и химических факторов на развитие женского гаметофита.

У большинства сортов и линий *Nicotiana tabacum* L. жизненный цикл составляет 4-5 месяцев, и их массовое цветение обычно начинается через 2 месяца после высадки рассады в открытый грунт, что ограничивает время проведения экспериментов при выращивании растений в поле. В связи с этим представляют интерес формы табака с укороченным жизненным циклом, в частности, недавно выделенные в Исследовательском центре табака университета Северной Каролины (США) формы RF (*rapid flowering*). Согласно приведенному описанию (McDaniel, 1999), их жизненный цикл составляет около 11 недель, и цветение начинается в среднем через 53-55 дней после посева семян (при выращивании растений в оранжерее). Взрослые растения характеризуются небольшими размерами, что облегчает их содержание в оранжерее и расширяет возможности проведения экспериментальных работ с этой культурой.

Цель настоящей работы заключалась в изучении морфологических и цитозембриологических особенностей RF-форм в условиях Саратова и оценки перспектив их использования в качестве модельных объектов для эмбриогенетических исследований.

Материал и методы

Объектом изучения служили две формы табака RF1 и RF3, семена которых были любезно предоставлены профессором Verne Sisson университета Северной Каролины (США). Для сравнения была использована гомозиготная линия БГ-6, полученная в отделе генетики и цитологии Ботанического сада СГУ. Исследовалось по 5 растений каждого генотипа.