

УДК 631.524:635.64

МЕЙОЗ У ГАПЛОИДОВ ТОМАТА КАК ВОЗМОЖНЫЙ ИНДУКТОР ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

С. В. ИВАНОВА

(Кафедра генетики)

Приводятся результаты изучения гаплоидных растений томата. Показана относительная генетическая стабильность вегетативной и генеративной систем. Рассмотрены аномалии мейоза и предложены возможные механизмы генотипической изменчивости, индуцируемой этими особенностями мейоза.

Явление гаплоидии относится к геномным мутациям и представляет собой уменьшение числа хромосом вдвое по отношению к уровню плоидности исходной формы. Первое гаплоидное растение экспериментально получено у *Datura stramonium* в 1922 г. К настоящему времени гаплоидия описана почти у всех культурных растений. Гаплоиды получены у 200 видов. К числу главных причин все возрастающего интереса к этому явлению можно отнести возможность ускорения селекционного процесса и расширение спектра доступной для отбора генотипической изменчивости. Посколь-

ку у гаплоидов, полученных из диплоидных форм, все гены находятся в одной дозе (гемизиготное состояние), в фенотипе проявляются и рецессивные аллели. Это дает возможность селекционеру оценить и отобрать искомые рекомбинантные генотипы и сравнительно быстро, путем колхицинирования, перевести их в гомозиготное диплоидное состояние. В этом отношении особенно перспективен метод культуры пыльцевых зерен, так как мужской гаметофит представлен тысячами (пшеница, рожь) и десятками тысяч (томаты) пыльцевых гаплоидов, в которых имеются самые разные

комбинации генов, многие из которых (особенно рекомбинантного типа) элиминируют на этапах оплодотворения, сингамии, эмбриогенеза, прорастания семян.

В последние годы достигнуты значительные успехи в селекции риса, ячменя, табака, картофеля и других культур благодаря использованию именно метода гаплоидии. Благодаря этому методу создана гибридная рожь, у которой получение инцухт-линий практически невозможно из-за самонесовместимости. Использование *ig*-генов (*indeterminate gametophyte*) у кукурузы обеспечивает сокращение сроков получения стерильных аналогов с 6-8 до 2 лет [4].

С помощью гаплоидии ставятся и решаются также проблемы генетического анализа, замещения и добавления хромосом, получения аллоплазматических гибридов и другие задачи теоретического плана [3].

В чистом виде гаплоиды используются довольно редко, главным образом в цветоводстве и у декоративных кустарников, так как из-за стерильности у них удлиняется период цветения.

В течение ряда лет в лаборатории рекомбиногенеза при кафедре генетики МСХА изучали гаплоиды томата сорта Микадо, любезно предо-

ставленные проф. В. С. Тырновым (Саратов, Госуниверситет). Проведено всестороннее морфометрическое исследование вегетативной и генеративной сферы, сделано заключение, что доза генов не сказывается на проявлении качественных признаков (габитусе куста, маркерных признаках: форме листа, окраске плода и др.), но в значительной мере определяет количественные (число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, размеры листьев, количество компонентов цветка, пыльцевых зерен в цветке и др.)

При вегетативном размножении (инога у гаплоидов нет) не проявилось мутантных форм, т. е. генетически эти растения оказались стабильными.

Исследования мейоза у гаплоидов позволили выявить особенности, связанные с одинарным набором хромосом, которые дают основание рассматривать этот процесс как возможный индуктор генотипической изменчивости.

Методика

Гаплоидные растения томата и контрольные (сорт Микадо) выращивали в сосудах с землей (6 л) в теплице, зимой, при искусственном досвечивании и обогреве калорифером, который позволял

поддерживать температуру 18°C. Мейоз изучали при микроспорогенезе, для чего фиксировали в фиксаторе Кларка молодые бутоны размером не более 3 мм, длина пыльников в которых была около 1,5 мм. Использовали методику Грати [2] с окраской ацетокармином (с некоторыми нашими модификациями) и методику расплывания клеток в гипотоническом растворе (spreading) с окраской по Гимза [6]. Анализ материала и фотографирование проводили на микроскопах PZO (Польша) и Axiolab (Германия).

Результаты

При анализе мейоза можно было ожидать, что половинный набор хромосом окажет влияние на порядок чередования фаз, так как в гемизиготном состоянии находятся и гены, контролирующие этот процесс. Но поскольку томат — самоопылитель, гаплоиды и диплоиды различаются в основном дозой гена, а аллели (состояние гена) у них должны быть одинаковые. По-видимому, это и обеспечило гаплоидам внешне нормальный ход мейоза со всеми, характерными для двудольных фазами: первое деление заканчивается кариокинезом, без деления цитоплазмы, клеточная пере-

годка возникает в конце II деления при образовании тетрады микроспор тетраэдрического типа (рис. 1). Такой мейоз называется симультанным (одновременный) в отличие от сукцессивного (последовательный) у однодольных. Одна из функций мейоза — это уменьшение (редукция) генетического материала гамет в 2 раза, что в дальнейшем при половом процессе обеспечивает восстановление постоянного характерного для вида числа хромосом. У гаплоидов микроспороциты, вступающие в мейоз, уже несут половинный набор хромосом, поэтому, естественно, качественная сторона этого процесса не может быть идентичной для диплоидных растений. Отсюда возникают аномалии, сопровождающие мейоз у гаплоидов. В метафазе I у большинства-клеток хромосомы находятся в унивалентном состоянии, их насчитывается 12 (рис. 2, 3). Однако встречаются MI с унивалентами и бивалентами. Частота встречаемости составляет доли процента, число бивалентов — от 2 до 6 (рис. 4, 5). Причем биваленты образуются в результате соединения хромосом бок о бок (side to side) и конец в конец (end to end). Тандемная ориентация хромосом в MI, вероятно, является следствием того, что в профазе I

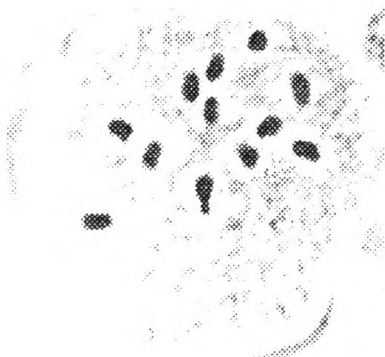
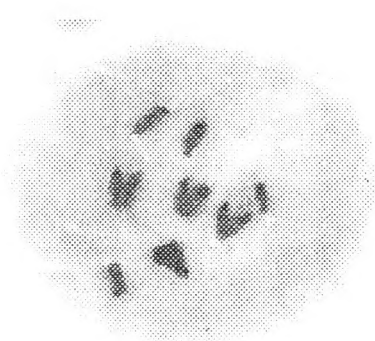
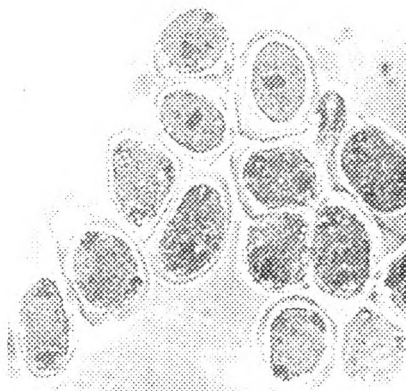


Рис. 1. Различные фазы первого и второго деления мейоза у гаплоидов (MI, AI, TI, TII).

Рис. 2 MI у диплоида (12 бивалентов).

Рис. 3 MI у гаплоида (12 унивалентов).

Рис. 4 MI у гаплоида (4 бивалента + 4 унивалента).

Рис. 5 MI у гаплоида (6 бивалентов).

у гаплоидов хромосомы располагаются не типично для этой фазы мейоза (в виде букета или сжатия в клубок «синезис»), а аналогично профазе митоза, где все они соединены теломерными участками (конец в конце). Иногда тандем состоит из 3~4 хромосом. Такое явление в литературе не описано.

Вторичные ассоциации (спаривание негомологичных хромосом) отмечены у гаплоидов и других культур (в том числе у пшеницы однозернянки (*T. monosocum*), где всего 7 хромосом [5]. Из этого следует, что спаривание хромосом является основой редукции в процессе мейоза, но качественную сторону распределения генетического материала обеспечивает спаривание только гомологов. Поскольку хромосомы, образующие ассоциации у гаплоидов, негомологичные, при их контакте возможны реципрокные транслокации, нерципрокные рекомбинации на хромосомном уровне. Кроме того, в процессе разрыва-воссоединения хроматид возможны абберрации типа делеций, инверсий, дупликаций, а также изменения на геномном уровне (конверсия генов, изменения структуры генов в результате SOS-репарации). Эти процессы в мейозе протекают на хроматидном уровне, что может привести к по-

тере хроматидами их идентичности.

Возникновение транслокаций в потомстве гаплоидов отмечено у пшеницы, сорго, хлопчатника, кукурузы. Происхождение их, по мнению Сирса, вероятнее всего связано с кроссинговером между гомологичными сегментами некоторых негомологичных хромосом [7].

Доктор Вебер (Университет Хоэнхайм, Германия, устное сообщение в МСХА. 2000 г.) показал наличие во всех хромосомах кукурузы одинаковых повторяющихся последовательностей ДНК. Возможно, это объясняет спаривание негомологичных хромосом у гаплоидов.

Контакт негомологичных хромосом изучен под световым и электронным микроскопом у *rh*-мутантов пшеницы и мей-мутантов ржи и, по предложению Дженкинса и Окумуса, обнаруживших его у лука, назван термином «индискриминантный» синаписис [1].

Таким образом, профазу I можно рассматривать как первый этап мейотической индукции гаплоидами генотипической изменчивости. В MI — AI происходит окончательное оформление хромосомных перестроек, связанных с индискриминантным синаписисом, формированием складок (fold-backs): это делеции, дупли-

кации, транслокации, возможно, и точковые мутации. Поскольку сестринские хроматиды теряют свою идентичность, это может повлечь за собой разнокачественность гамет даже без редукционного деления. А такие случаи наблюдаются довольно часто. До 25% микроспор возникает при отсутствии редукционного деления. Все хромосомы таких микроспороцитов делятся уже в первом делении на хроматиды, т. е. митотически. Образуются диады микроспор (у 2п томатов их нет) с нормальным числом хромосом — 12 (рис. 6, 7). Впоследствии из них формируются большей частью фертильные пыльцевые зерна, хорошо окрашивающиеся ацетокармином (фертильность пыльцевых зерен у гаплоидов от 0 до 25%, вероятно, за счет диад, так как теоретически она равна $5 \cdot 10^{-05}$). Некоторые микроспороциты до конца мейоза не вступают в деление, по-видимому, из них формируются монады с реституционными ядрами (рис. 8, 9).

В AI также начинает формироваться изменчивость, связанная с числом хромосом, их конкретным набором, дихроматидной и монохроматидной структурой. Распределение 12 хромосом происходит неравномерно, наблюдаются ассоциации от 12-0 до 6-6.

Больше всего клеток AI имели распределение 5-7 хромосом. Хромосомный набор у этих групп в качественном отношении, вероятно, различный. У некоторых хромосом деление на хроматиды наблюдалось уже в первом делении, иногда это происходило вблизи полюса, так что обе хроматиды, по-видимому, могли попасть в одно ядро. На рис. 10 показано совмещение AI и MI. Возможно, это приведет к трехполюсному делению, что подтверждается наличием триад (рис. 11, 13) и 6 хромосомных ассоциаций (рис. 12). Триады могут возникнуть и в том случае, если во втором делении на хроматиды делится только одно ядро. Использование спринг-метода (распластывание клеток в гипотоническом растворе) позволяет подсчитать число хромосом (хроматид) в AI и TII, что при обычной методике (давленные ацетокарминовые препараты) не удается (рис. 14).

Второе деление мейоза обычно называют эквационным. Но у гаплоидов оно не приводит к образованию тетрады микроспор с одинаковым числом хромосом, так как исходные ядра (TI) неодинаковые в силу неравномерного распределения хромосом в анафазе I. И даже в тех клетках, где 12 хромосом разошлись поровну (6-6),

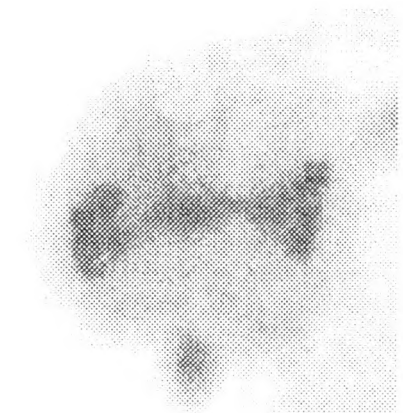
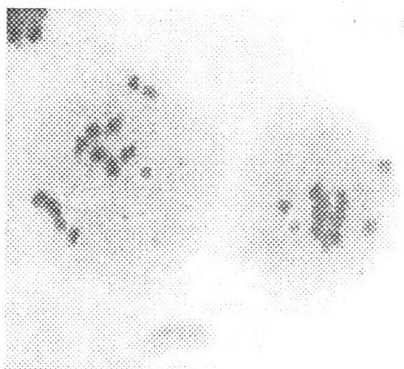
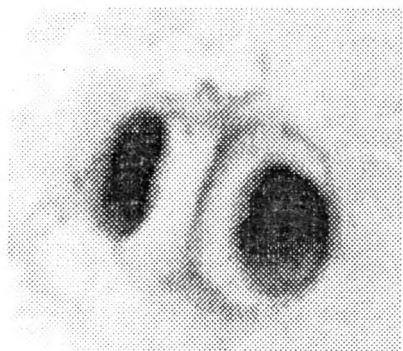
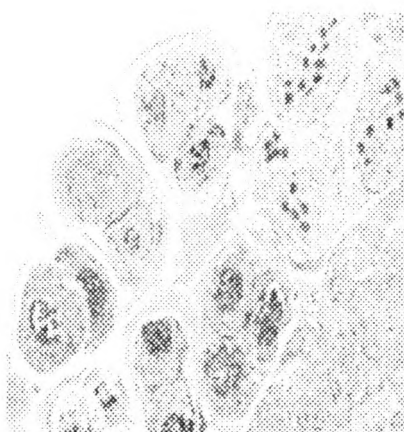


Рис. 6. Деление на хроматиды в первом делении мейоза.

Рис. 7. Диада микроспор.

Рис. 8. Мост в TII.

Рис. 9. Монады с 12 хромосомами (наряду с диадами, триадами и тетрадами).

Рис. 10. Совмещение MI и AI.

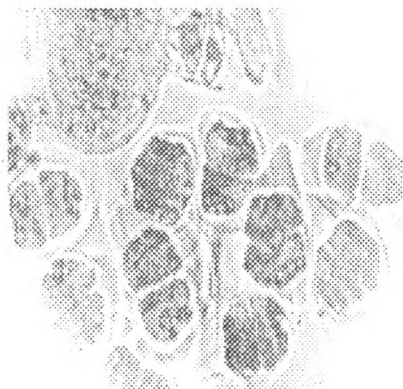
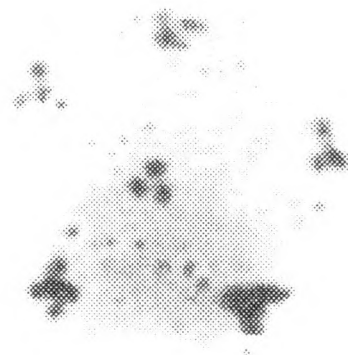
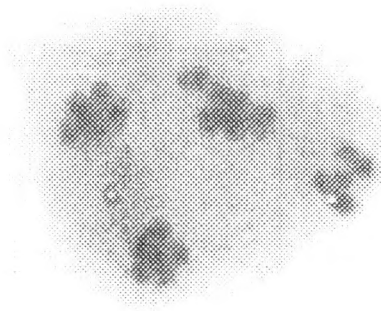
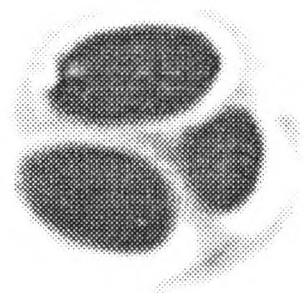


Рис. 11. Триада микроспор.

Рис. 12. 6 ассоциаций хроматид — результат трехполюсного деления в AI.

Рис. 13. Диада, триада, тетрада микроспор.

Рис. 14. AI (4 ассоциации по 6 хроматид).

Рис. 15. Массовое образование диад.

из-за негомологичности хромосом тетрады содержали разные наборы хромосом в микроспороцитах. Такие микроспоры и при одинаковых размерах не должны быть жизнеспособными, поскольку в них содержится неполный набор генов.

На стадии тетрад наиболее крупные микроспоры отмечены в монадах (15,4 мкм), затем в диадах (15,0), далее идут тетрады (12,2) и триады (10,1).

Анализ содержания ДНК в микроспороцитах на разных этапах мейоза, проведенный Г. И. Карловым (кафедра биотехнологии МСХА), подтвердил неравномерное распределение хромосом в большинстве материнских клеток, за исключением тех, в которых отсутствует редукционное деление и происходит разделение на хроматиды по типу митоза. Но рекомбинация здесь не исключена, так как вследствие индискриминантного синапсиса в профазе возможен обмен между негомологичными хромосомами. Дополнительный синтез ДНК в процессе мейоза у гаплоидов не происходит.

Реализацию генотипической изменчивости, индуцируемой мейозом гаплоидов томата, мы пытаемся осуществить через андрогенез. Работа ведется с культурой пыльников. Получены каллусы и единичные регенеранты.

По-видимому, аналогично мейоз протекает и в макро-спороцитах. Поэтому должна возникать и разнокачественность макроспор и женских гамет — яйцеклеток. Это положение мы решили проверить путем скрещивания гаплоида Микадо с 9 многомаркерными диплоидными линиями. Были использованы регрессивные мутации, локализованные в разных хромосомах, так что по проявлению маркерных признаков у гибридов F₁ можно было иметь представление о хромосомном составе яйцеклетки гаплоидного томата. Опылено около 500 цветков гаплоидов, получено 137 семян, многие из них оказались не-всхожими, некоторые растения погибли в период вегетации. Одно растение, полученное от скрещивания с мутантным образцом с геном г (желтая окраска плода), дало желтые плоды (у исходного сорта Микадо плоды красные), что свидетельствует об отсутствии доминантного аллеля R в материнской гамете. У томатов моносомики (2n-1) жизнеспособны только по хромосомам 5, 11 и 12. Ген г локализован в коротком плече в 3-й хромосоме. По данным Рика и Куша, моносомики по 3-й хромосоме стерильны. Но в опытах этих ученых третичный моносомик гапло 3S · 11Z фертилен [8].

Вероятно, у нас тоже получился такой моносомик в результате транслокации между 11-й и 3-й хромосомами у гаплоида. Но это можно было проверить только в мейозе по образованию тривалента, чего мы не сделали, так как желтый плод был обнаружен уже после мейоза, а пасынки получить у стареющего растения нам не удалось.

Заключение

Обобщение наших и экспериментальных данных других исследователей позволяет прийти к выводу, что соматические клетки вегетирующих растений гаплоидов *in vivo* практически не дают мутаций. В то же время мейоз у гаплоидов в силу значительных аномалий, вызванных отсутствием гомологов, вполне может индуцировать генотипическую изменчивость. При этом, на наш взгляд, здесь возможны два механизма индукции такой изменчивости. Первый, наиболее значимый по вероятности образования фертильных гамет — это спаривание негомологов в профазе I, образование складок при синапсисе для себя [1], что может повлечь возникновение транслокаций, делеций, дупликаций, точковых мутаций, особенно при SOS-репарации. Если за этим последует деление каждой хромосомы на

хроматиды при отсутствии редукции числа хромосом, то образующиеся в результате такого мейоза диады дадут фертильные пыльцевые зерна с 1n хромосом (конечно, если при этом не возникнет летальных мутаций).

На баже индискриминантного синапсиса, а также самостоятельно может работать второй механизм рекомбинации. Он заключается в редукции числа хромосом в AI с комбинацией негомологов от 1-11 до 6-6. Такие разнокачественные ассоциации хромосом во втором делении мейоза дадут в основном стерильные микроспоры, так как не содержат полного набора генов. Что касается женского гаметофита, то яйцеклетки могут быть фертильными в анеуплоидном состоянии.

Таким образом, гаплоидию можно рассматривать как нетрадиционный источник комбинационной и мутационной изменчивости, индуцируемой мейозом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданов Ю. Ф., Гришин Т. М., Коломиец О. Л. и др. Цитогенетические закономерности синапсиса мейотических хромосом у животных и растений. — Генетика, 1996, т. 32, № 11, с. 1474-1493. — 2. Грати В. Г., Грати М. Г. Анализ пахитенных

хромосом у трех видов томатов. — Цитология, 1980, т. 27, № 8, с. 933-939. — 3. *Нитцис В., Венцель Г.* Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос. 1980. — 4. *Тырнов В. С.* Гаплоидия у растений. Научное и прикладное значение. М.: Наука. 1998. — 5. *Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В. и др.* Гаплоидия и

селекция. М.: Наука, 1976. — 6. *Busch W., Herrmann R. C., Houßen A. a. o.* — Plant Molecular Biology Reporter, vol. 14, p. 2. 1996. — 7. *Okamoto M., Sears B.* Genet, and Cytol, 1962, vol. 4, № 1, p. 24-30. — 8. *Rick C. M., Khush G. S.* Chromosome Manipulations and Plant Genetics. Univ. of California, 1966.

*Статья поступила
9 января 2001 г.*

SUMMARY

Analysis of meiosis in tomato haploids allowed to reveal serious anomalies of this process connected with single chromosome set. These are cases of coupling nonhomologues (indiscriminant synapsis), restricting meiosis by only one «equational» division reductional division with formation of chromosome conglomeration from 11-1 to 6-6, three-pole division and so on. These variations resulted in high sterility of pollen and its evident difference in quality. Detailed examination of these phenomena allowed to propose hypotheses about the mechanism of possible induction of genotypical variability by haploids (by coupling homologs in prophase I and formation of restitution nuclei, as well as by forming gametes with different number of chromosomes).