

УДК 634.11/13:631.527.5

## ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА У ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ *PYRUS* × *MALUS* И *RIBES* × *GROSSULARIA*

© М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, С.А. Брюхина

*Ключевые слова:* микроспорогенез; мужской гаметофит; межродовые гибриды; *Pyrus*; *Malus*; *Ribes*; *Grossularia*.

Установлены аномалии при формировании мужского гаметофита у груше-яблоневого и смородино-крыжовникового гибридов, приводящие к неравномерному распределению генетического материала среди полюсов деления мейоцитов и нарушению хромосомного баланса в клетках пыльцы. Вместе с тем происходит образование части морфологически выполненных пыльцевых зерен, позволяющие использовать изучаемые гибриды в дальнейшей селекционной работе в качестве опылителей.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из центральных проблем современного садоводства является создание высокоадаптивных сортов плодовых и ягодных культур с комплексом хозяйственно-ценных признаков. С этой целью использование метода отдаленной гибридизации позволяет с наибольшей эффективностью получить у растений комплекс разносторонних изменений признаков и свойств [1–3].

Характерной особенностью отдаленных гибридов плодовых и ягодных культур является их пониженная фертильность, проявляющаяся в зависимости от конкретного генотипа в широкой степени – от полностью стерильных до частично фертильных форм [4–7].

Для разработки более эффективных методов преодоления этого негативного явления необходимо знать особенности формирования генеративных органов, опыления, оплодотворения и другие процессы. В связи с этим в настоящей работе исследован процесс микроспорогенеза межродовых гибридов с целью получения данных о возможности использования их в качестве исходных родительских форм в дальнейшей селекционной работе.

Изучение мейоза у отдаленных амфигаплоидных и амфидиплоидных гибридов имеет большое научно-практическое значение. Исследование процесса конъюгации хромосом в первом делении мейоза служит одним из наиболее эффективных методов установления филогенетических взаимоотношений между видами, послужившими для гибридов родительскими формами [8]. Путем такого геномного анализа удастся выяснить наличие частично родственных (гомеологичных) хромосом у генетически отдаленных исходных видов, относящихся к разным видам или даже родам. Практическое значение цитологического анализа хромосомных мейотических ассоциаций у гибридов важно тем, что такое исследование позволяет установить сбалансированность генотипов данных гибридов при образовании половых клеток и возможность дальнейшего использования изучаемых форм в селекционном процессе.

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Исследовали цитологические особенности отдаленного груше-яблоневого гибрида 01 (*Pyrus communis* L. × *Malus domestica* Mill.) селекции С.Ф. Черненко и смородино-крыжовникового амфидиплоида СКГ № 5–4 (*Ribes nigrum* L. × *Grossularia reclinata* Mill.) селекции Э. Кип.

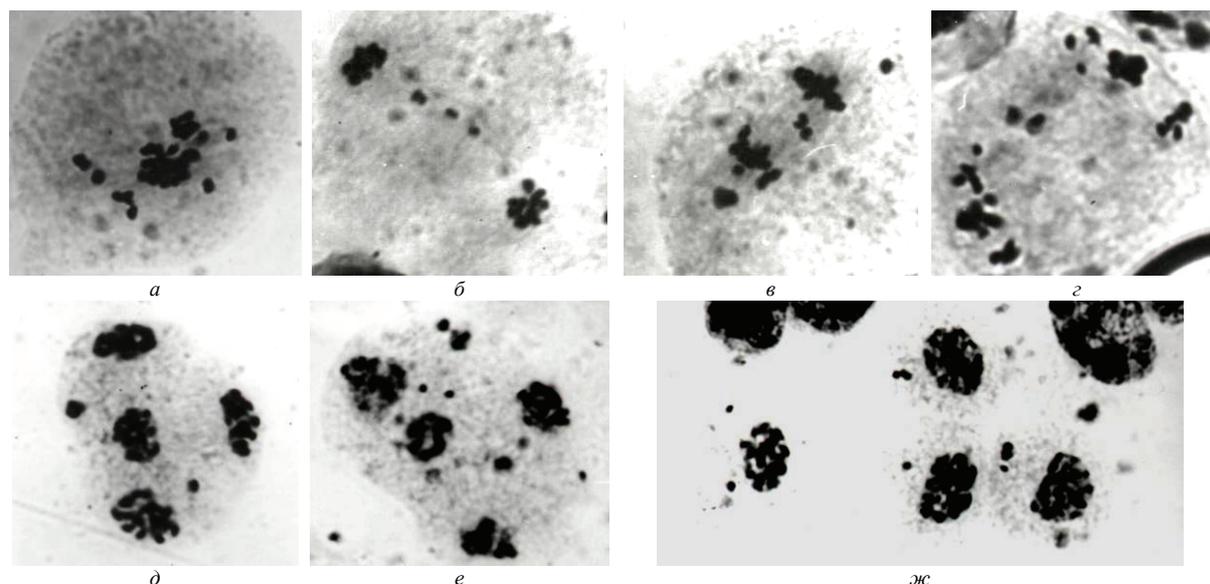
Бутоны из естественных условий весной фиксировали темпорально в фиксаторе Карнуа. Протекание мейоза изучали на давленных ацетогематоксилиновых препаратах пыльников [9]. Препараты просматривали под микроскопом Carl Zeiss Jenamed, фотографирование осуществляли цифровой камерой DCM-500 с программным обеспечением Scope Photo. Статистическую обработку данных проводили в программной среде Microsoft Excel.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате цитологического изучения груше-яблоневого гибрида 01 был зафиксирован ряд нарушений в процессе мейотического деления (рис. 1).

На самых ранних этапах конденсации хромосом в профазе I, а именно зигонеме, хроматиновые нити гомологичных хромосом соединяются попарно. Однако в данный период они сильно переплетаются, что крайне затрудняет изучение степени их гомологичности. Для наблюдения возможных аномалий конъюгации хромосом оптимален период диакинеза, когда становится заметны нарушения. На этапе диакинеза у части хромосом нарушена конъюгация друг с другом вследствие генетических различий геномов яблони и груши, что приводит к образованию унивалентов. В среднем их количество на клетку составляет  $2,4 \pm 0,6$  шт., тогда как бивалентов –  $15,5 \pm 1,2$  шт.

В анафазе первого деления отмечены нарушения синхронности расхождения хромосом к полюсам, выражающиеся в их преждевременном забегании ( $62,1 \pm 5,6$  % от общего количества нарушений на данной стадии) и отставании ( $25,2 \pm 3,0$  %). Чаще всего



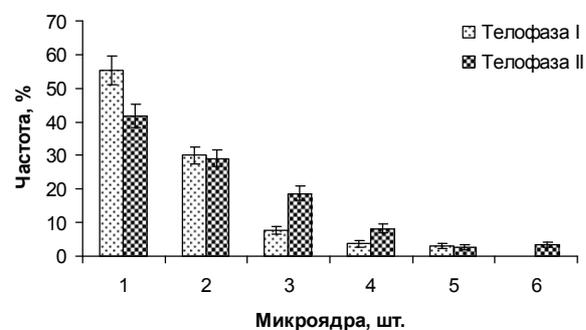
**Рис. 1.** Нарушения в мейозе у груше-яблоневого гибрида 01: *a* – выбросы хромосом в метафазе I; *b* – отставание хромосом в анафазе I; *c* – отставание и выбросы хромосом в анафазе I; *d* – отставание и выбросы хромосом в анафазе II; *e* – образование микроядер в телофазе II; *ж* – формирование гипоклеток; *жс* – микронуклеусы в микроспорах

насчитывали 2–3 хромосомы с нарушением анафазного движения. Характерной особенностью AI у груше-яблоневого гибрида 01 является образование хромосомных мостов ( $16,3 \pm 1,7\%$ ).

В результате большого количества отставаний, забеганий и выбросов хромосом в цитоплазму на стадиях MI и AI в телофазе первого деления как следствие наблюдали образование микроядер, содержащих разное количество хромосом (до 4 шт.), в большинстве случаев 1–2 шт. Количество микронуклеусов на этой стадии варьировало от 1 до 5 (рис. 2).

Гомеотипное деление, как и гетеротипное, у груше-яблоневого гибрида 01 протекает с нарушениями. В метафазе II расхождение хроматид происходит так же неравномерно, как и в эквационном делении, в результате чего их количество в каждой группе различается.

Анафаза второго деления характеризуется выбросами за пределы веретена деления значительного количества хроматид ( $30,9 \pm 2,4\%$ ), наличием хромосомных мостов ( $5,8 \pm 0,9\%$ ) и нерасхождением хроматид с экваториальной плоскости ( $6,4 \pm 1,0\%$ ).



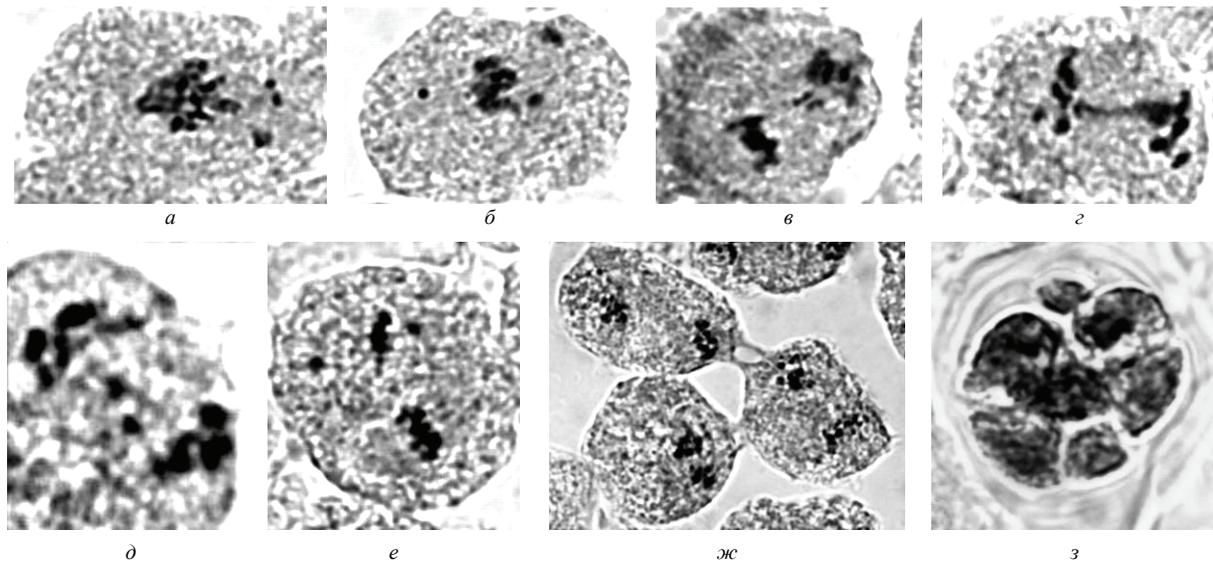
**Рис. 2.** Формирование микроядер у груше-яблоневого гибрида 01 в телофазе первого и второго деления мейоза

На стадии телофазы II кроме нормального формирования четырех групп хромосом отмечены отдельные хромосомы в цитоплазме в количестве 1–2 шт. и группы хромосом, к завершению стадии III образующие микронуклеусы, количество которых может достигать до 6 (рис. 2).

Исследование тетрадогенеза у груше-яблоневого гибрида 01 показало, что, несмотря на многочисленные аномалии на различных стадиях мейотического деления, формируется часть тетрад с полноценными ядрами одинакового размера ( $21,3 \pm 2,0\%$  от общего количества). Тем не менее тетрады с нуклеусами разного объема преобладают, составляя  $36,1 \pm 3,7\%$ . Образование полиад – обычное явление для форм с большим количеством микроядер в III, однако у данного гибрида обнаружено всего  $2,9 \pm 0,4\%$  пентад и  $1,6 \pm 0,3\%$  гексад, что можно объяснить лизисом большинства генетически несбалансированных материнских клеток микроспор на ранней стадии тетрадогенеза. Характерной особенностью данного гибрида является формирование диад ( $3,6 \pm 0,4\%$ ) и триад ( $13,3 \pm 1,5\%$ ), это предполагает потенциальную возможность образования гибридом нередуцированных гамет (рис. 5а, 5б), что в дальнейшем и было подтверждено при исследовании размеров сформированных пыльцевых зерен.

Изучение процесса микроспорогенеза у отдаленного амфидиплоидного гибрида СКГ № 5–4 ( $2n = 4x = 32$ ) показало наличие на всех стадиях мейоза клеток с различными аномалиями, возрастающими в эквационном делении. Из наиболее частых отклонений от нормы у данной формы отмечены нарушения темпов расхождения хромосом в анафазе I и II, образование микроядер в телофазе I и II, цитомиксис на всех стадиях (рис. 2).

В метафазе первого деления отмечено небольшое число нарушений ( $14,9 \pm 2,9\%$ ), из которых преобладают выбросы унивалентов ( $71,4 \pm 3,7\%$  от общего числа отклонений).



**Рис. 3.** Нарушения в мейозе у смородино-крыжовникового гибрида СКГ № 5–4: *a* – выбросы хромосом в метафазе I; *б* – забегание и выбросы хромосом в анафазе I; *в* – отставание хромосом в анафазе I; *г* – хромосомный мост в поздней анафазе I; *д* – образование микроядер в телофазе I; *е* – выбросы хромосом в анафазе II; *ж* – цитомиксис между несколькими мейоцитами; *з* – формирование полиады

В анафазе I основными аномалиями являются преждевременное забегание и выбросы хромосом, составляющие  $75,4 \pm 2,1$  % от общего числа нарушений на данной стадии, а также отставание хромосом ( $14,1 \pm 1,7$  %). Отмечены также хромосомные мосты ( $4,2 \pm 0,9$  %) и картины цитомиксиса ( $2,8 \pm 0,8$  %).

В телофазе I, завершающей редуционный этап мейотического деления, у части клеток зафиксированы выбросы хромосомы в цитоплазму ( $35,2 \pm 2,3$  %), что приводит к образованию микроядер (рис. 4). На данной стадии  $2,7 \pm 0,8$  % нарушений составляет цитомиксис.

В метафазе II основным отклонением являются выбросы хроматид за пределы экваториальной пластинки ( $78,6 \pm 3,1$  %).

В анафазе второго деления отмечено забегание и выброс хроматид ( $52,4 \pm 3,8$  %), отставшие и неразшедшие к полюсам хроматиды составляют  $9,5 \pm 2,2$  %.

Выбросы хроматид в цитоплазму зафиксированы в телофазе II на уровне  $42,8 \pm 3,3$  %, причем большая часть из них образует 1–2 микроядра (рис. 4).

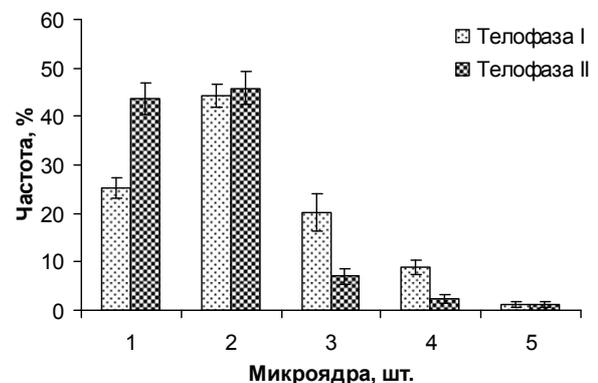
Специфическим нарушением, отмеченным у смородино-крыжовникового амфидиплоида СКГ № 5–4 на всех стадиях мейоза, являются картины множественного цитомиксиса между несколькими мейоцитами одновременно, который значительно возрастает в эквационном делении – с  $2,8 \pm 0,8$  % в анафазе I до  $32,3 \pm 3,6$  % в анафазе II.

На стадии тетрадогенеза среди аномалий преобладают гексады и пентады, что коррелирует с более частым образованием 1–2 микроядер в телофазе I и II. Диады, триады и полиады встречаются значительно реже, как крайние варианты нарушений тетрадогенеза, что согласуется с общебиологическим законом нормального распределения.

Указанные нарушения в совокупности приводят к формированию аномальных тетрад и как следствие – к образованию морфологически неоднородной пыльцы (рис. 5б).

Анализ вариационных кривых диаметра пыльцевых зерен отражает выявленную морфологическую неоднородность образовавшейся пыльцы, возникшей из гипер- и гипомейоцитов, являющихся результатом нарушений в ходе микроспорогенеза на различных стадиях.

Как видно на рис. 6а, кривая стерильной пыльцы груше-яблоневое гибрида 01 смещена влево по отношению к фертильной, что вызвано наличием мелких, морфологически невыполненных пыльцевых зерен, образовавшихся из гипоклеток. Кривая окрашенной ацетокармином пыльцы имеет полимодальный характер. Из общей совокупности выделяется размерная группа пыльцевых зерен, диаметр которой варьирует от 45 до 52 мкм, при среднем значении признака для всей фертильной пыльцы  $32,4 \pm 1,0$  мкм. Это позволяет считать ее диплоидной ( $2n$ ), учитывая соотношение средних размеров пыльцы двух пиков кривой как 1:1,8. Общее количество нередуцированной пыльцы составляет 11,4 %, что близко к суммарному количеству диад и триад в тетрадогенезе.



**Рис. 4.** Формирование микроядер у смородино-крыжовникового гибрида СКГ № 5–4 в телофазе первого и второго деления мейоза

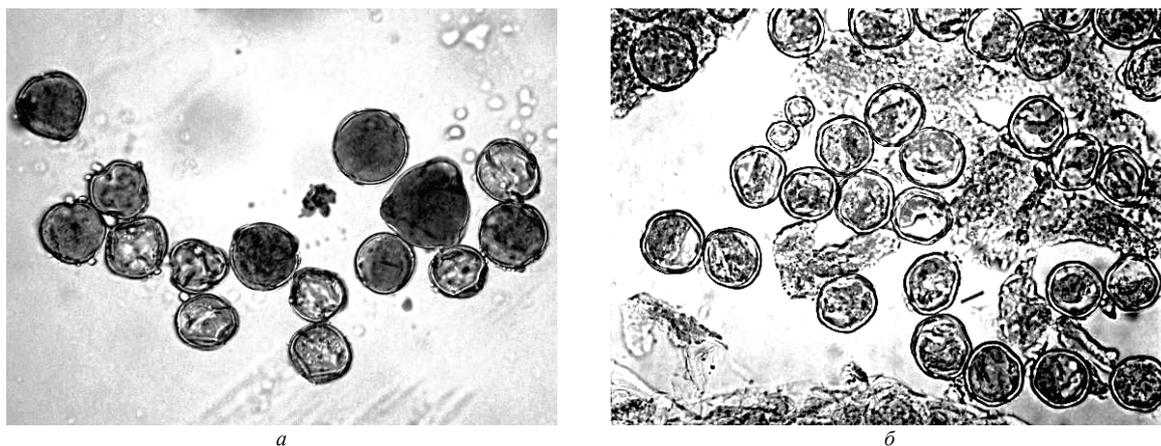


Рис. 5. Пыльца груше-яблоневого гибрида 01 (а) и смородино-крыжовникового гибрида СКГ № 5-4 (б), окрашенная ацетокармином

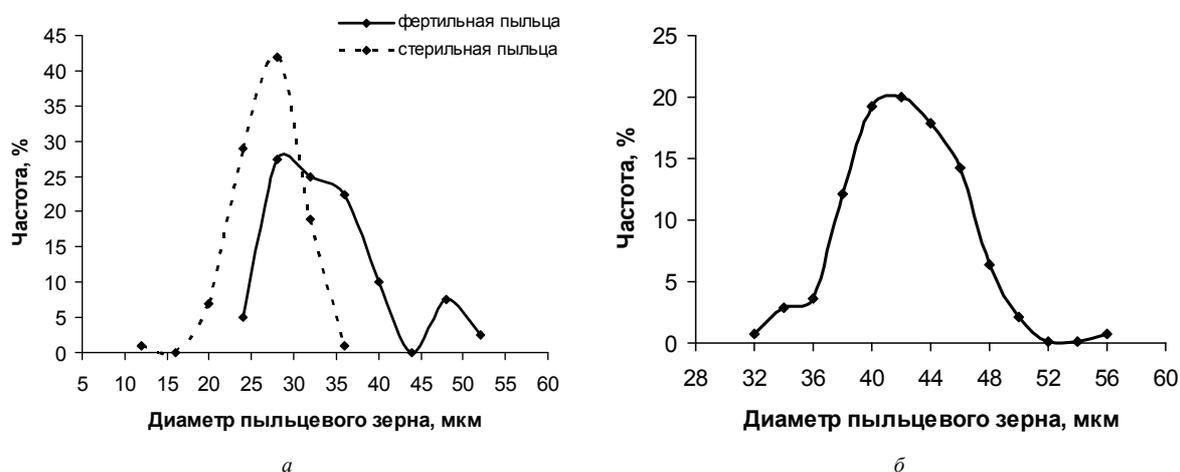


Рис. 6. Варьирование размеров пыльцы груше-яблоневого гибрида 01 (а) и смородино-крыжовникового гибрида СКГ № 5-4 (б)

Диапазон варьирования диаметра пыльцевых зерен у смородино-крыжовникового гибрида СКГ № 5-4 составляет от 32 до 56 мкм при среднем диаметре  $41,4 \pm 0,3$  мкм (рис. 6б).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные цитологические исследования позволили установить ряд отклонений при формировании мужского гаметофита у груше-яблоневого гибрида 01 и смородино-крыжовникового амфидиплоида СКГ № 5-4. В качестве основной предпосылки аномалий мейоза следует отметить нарушение нормальной конъюгации хромосом, выражающейся в образовании части унивалентов вместо полного набора бивалентов в норме.

При наличии в процессе мейоза отдельных специфических отклонений тем не менее четко прослеживается общий характер аномалий у изучаемых межродовых гибридов *Pyrus* × *Malus* и *Ribes* × *Grossularia*. У данных форм отмечены нарушения нормальной темпа расхождения хромосом в анафазе I и II, выбросы хромосом за пределы веретена деления, образование микроядер в телофазе I и II, в совокупности при-

водящие к неравномерному распределению генетического материала среди полюсов деления мейоцитов и нарушению хромосомного баланса в клетках пыльцы. В результате образуются гаметы, число хромосом которых не соответствует гаплоидному набору хромосом для данных форм.

Вместе с тем, кроме аномальных спор, происходит и формирование части нормальных тетрад, дающих начало полноценным пыльцевым зернам, что позволяет использовать данные генотипы в дальнейшей селекционной работе.

Ценной особенностью груше-яблоневого гибрида 01 является его способность к формированию более 10 % нередуцированной пыльцы из числа морфологически выполненной, что может значительно способствовать получению ценных полиплоидных генотипов семечковых плодовых культур при условии научно-обоснованного подбора материнской формы и участия данной формы в качестве опылителя при гибридизации.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Харитонова Е.Н. Цитологические исследования косточковых // Труды ЦГЛ им. И.В. Мичурина. 1971. Т. 12. С. 188-204.

2. Руденко И.С. Отдаленная гибридизация и полиплоидия у плодовых растений. Кишинев, 1978. 378 с.
3. Дубровский М.Л. Морфологическая характеристика диплоидных и автотетраплоидных форм растений смородины американской и смородины красной // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. Серия Технические науки. 2008. Т. 2. № 1 (11). С. 186-190.
4. Чувашина Н.П. Цитогенетика и селекция отдаленных гибридов и полиплоидов смородины. Л.: Наука, 1980. 120 с.
5. Пахомова Н.П. Микроспорогенез межродового гибрида *M. baccata* Borkh. × *P. communis* // Труды ЦГЛ им. И.В. Мичурина. 1971. Т. 12. С. 210-221.
6. Жуков О.С., Харитонова Е.Н. Селекция вишни. М.: Агропромиздат, 1988. 141 с.
7. Папихин Р.В., Яндовка Л.Ф. Особенности процесса микроспорогенеза отдаленных гибридов семечковых и косточковых плодовых растений // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. Тамбов, 2009. Т. 14. Вып. 3. С. 559-561.
8. Цитология и генетика мейоза / отв. ред. В.В. Хвостова, Ю.Ф. Богданов. М.: Наука, 1975. 432 с.
9. Топильская Л.А., Лучникова С.В., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины // Бюллетень ЦГЛ. Мичуринск, 1975. Вып. 22. С. 58-61.

Поступила в редакцию 26 ноября 2010 г.

Dubrovskiy M.L., Papikhin R.V., Bryukhina S.A. Citological peculiarities of formation of male gametophyte of remote hybrids *Pyrus* × *Malus* and *Ribes* × *Grossularia*

Anomalies during formation of male gametophyte of *Pyrus* × *Malus* and *Ribes* × *Grossularia* hybrids, resulting to unequal distribution of a genetic material among poles of division in meiocytes and to disturbance of chromosomal balance in cells of pollen, are established. At the same time there is a formation of part of morphological pollen grains, allowing to this hybrids in the further selection work as a pollinators.

*Key words:* microsporogenesis; male gametophyte; intergenetic hybrids; *Pyrus*; *Malus*; *Ribes*; *Grossularia*.