

формами, величина генной миграции и её корреляция с различиями по эко-морфологическими признакам, связанным с трофической специализацией.

Розглядаються механізми симпатричного формоутворення в реліктових популяціях арктичних гольців *Salvelinus* Забайкалля. За допомогою аналізу мікросателітної ДНК оцінюються час генетичної дивергенції між симпатричними формами, величина генної міграції та її кореляція з различіями по еко-морфологічним ознакам, пов'язаним з трофічною спеціалізацією.

Mechanisms of sympatric speciation in relict populations of Transbaikalian Arctic charrs (genus *Salvelinus*) are considered. Analysis of microsatellite DNA helped to estimate the time of genetic divergence between sympatric forms, the size of gene migration and its correlation with differences in eco-morphological traits connected with trophic specialization.

**КАШИН А.С.<sup>1</sup>, ЦВЕТОВА М.И.<sup>2</sup>, ДЕМОЧКО Ю.А.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского  
Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, e-mail: kashinas@sgu.ru,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока РАСХН  
Россия, 410010 Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: ravichaf@mail.ru

## **ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ И ПРОБЛЕМА ДЕТЕРМИНАЦИИ ГАМЕТОФИТНОГО АПОМИКСИСА**

У большинства изученных видов, как растений, так и животных, в ходе онтогенеза происходит полиплоидизация соматических клеток в процессе их дифференциации. Однако видовое число хромосом сохраняется неизменным в клетках зародышевого пути, что и обеспечивает генетическую стабильность вида [1].

Исключением преимущественно являются растения, являющиеся продуктом гибридизации и/или полиплоидии, у которых геномная изменчивость затрагивает не только дифференцирующиеся соматические клетки, но и апикальные меристемы. Гибридизация и полиплоидия нарушают хромосомный баланс. Это вызывает, - как одно из следствий, особенно в первых поколениях, - миксоплоидию и анеуплоидию. Известно, что значительная часть миксоплоидных форм – гибриды [2]. При этом спонтанная гибридизация и полиплоидия – явления, значительно распространенные среди высших растений [3, 4]. Считается, что эволюция растений осуществляется в значительной степени путем изменения уровней ploidy [5, 6] и гибридогенеза [7]. Считается, что от 50-60 [8] до 70% [9, 10] видов покрытосеменных имеют аллополиплоидную природу. При этом и амфиплоидия, и аллоплоидия у растений в природе осуществляется преимущественно с участием либо гаметофитного апомиксиса, либо апомейоза, как элемента всё того же апомиксиса [11].

Известно, что реализация гаметофитного апомиксиса зачастую сопровождается хромосомной нестабильностью [12-15] и ещё целым рядом явлений, которые обычно сопровождают полиплоидию и отдалённую гибридизацию: стерильность мужской генеративной сферы [13, 16, 17], сложный характер полиморфизма, во многом аналогичный расщеплению сложных гибридов [18] и т.п. Очевидна и тесная корреляция между полиплоидией, гибридогенезом и апомиксисом [11, 18, 19].

Принципиально важно понять характер отношений между всеми этими явлениями и установить причинно-следственные связи между ними, остающимися до сегодняшнего дня достаточно неопределёнными. В данной работе на примере растений *Pilosella officinarum* F. Schultz et Sch. Bip. и ряда других видов *Asteraceae* проанализи-

рованы степень и характер геномной изменчивости при гаметофитном апомиксисе и возможные причинно-следственные отношения между этими явлениями.

### **Материалы и методы**

Микроспорогенез изучали у растений двух популяций *Pilosella officinarum* ( $x=9$ ). Соцветия фиксировали ацетоалкоголем (1:3) и хранили в 75% спирте при  $t=6-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , окрашивали 2% ацетокармином после обработки 4% раствором железо-аммонийных квасцов при  $t=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут. Давленные препараты готовили в смеси 70% хлорал-гидрата и 45% уксусной кислоты, подкрашенной ацетокармином.

Кариотипическую изменчивость вегетирующих в популяциях растений и в потомстве тех же растений выявляли путём подсчёта числа хромосом в клетках корневых меристем или меристем надземных побегов на «давленных» препаратах. Материал фиксировали в ацетоалкоголе, окрашивали 4% ацетогематоксилином с предварительной обработкой 8-оксихинолином или бромнафталином [20].

### **Результаты и обсуждение**

В обеих популяциях *P. officinarum* в разные годы растений встречались растения 2-х типов: 1) с гермафродитными цветками; 2) с женскими цветками, у которых вместо пыльников присутствовали стаминодии. Количество последних в разные годы варьировало в интервале 41.17–100.00 %. В большинстве случаев у одного растения все цветки либо были гермафродитными, либо имели пестик и стаминодии. Лишь в единичных растениях в стаминодиях присутствовали участки генеративной ткани, содержащие микроспороциты на разных стадиях мейоза, либо пыльцевые зёрна, значительно варьирующие по форме и размеру.

У растений с гермафродитными цветками наблюдали значительные нарушения процессов микроспорогенеза. В диакинезе часть клеток наряду с бивалентами содержала неспаренные хромосомы, что явилось следствием нарушений конъюгации. Как в первом, так и во втором делениях мейоза, в метафазе часть хромосом не включалась в метафазную пластинку, а в ана-телофазе наблюдались многочисленные нарушения расхождения хромосом, в результате чего продукты деления (диады или микроспоры) содержали аномальное число ядер и/или микроядра. В некоторых цветках при эквационном делении часть материнских клеток микроспор (до 17,3%) содержала отдельные хроматиновые структуры, вытянутые от метафазной пластинки к полюсу веретена деления. Скорее всего, они возникли при хромосомных перестройках, в результате которых центромера оказалась на конце, а соответствующая хромосома начала движение к полюсу деления раньше других.

Наряду с аномалиями в расхождении хромосом во многих мейоцитах наблюдались аномалии в ориентации веретёна деления и заложении фрагмопласта. В некоторых цветках до 10% мейоцитов во втором делении мейоза содержали не перпендикулярно, а параллельно расположенные веретена деления. При этом имело место образование тетрад не тетраэдрической, а иной, не свойственной для *Asteraceae*, конфигурации. В некоторых мейоцитах в конце мейоза II был нарушен цитокинез или же фрагмопласт не формировался, в результате чего образовывались многоядерные монады или совершенно аномальные продукты микроспорогенеза. Спектр нарушений мейоза у изученных растений совпадал, но частота значительно варьировала как между растениями, так и в разных цветках одного растения. Частота иных (мосты, фрагментация хромосом и другие) аномалий была на уровне 0,1–4,0%, что не превышает естественного мутационного фона. У всех изученных растений часть клеток на разных стадиях микроспорогенеза дегенерировала, что вело к формированию стерильных пыльцевых зёрен (до 50-60 %).

В микроспорогенезе очень редко встречались явления, которые вели бы к существенному варьированию уровня пloidности пыльцы. Число отмеченных монад, имеющих реституционное ядро, после мейоза I составляло менее 1 % от числа возникших диад. Многочисленные отставания хромосом в ана-телофазах первого и второго делений, вероятнее всего, приводили к образованию анеуплоидии, но не сказывались на

уровне пloidности. В случаях, когда в ядрах микроспор было возможно подсчитать число хромосом, оно было близко гаплоидному числу хромосом. В цветках, в которых формировалась морфологически нормальная пыльца, пыльцевые зёрна имели очень близкие размеры, что также свидетельствовало об отсутствии варьирования уровня пloidности среди них.

При анализе потомства индивидуальных растений, полученного как при свободном цветении, так и при беспыльцевом режиме, в исследуемых популяциях выявлены, кроме ди- и триплоидов, ещё и тетра-, пента-, гекса- и гептаплоиды (Кашин, 2006). Отсутствие в пыльниках исследованных растений пыльцевых зёрен, пloidностью выше  $1x$ , указывают на то, что в цветках преимущественно в случае возможности формирования диплоидной спорогенной ткани в пыльниках, хотя и с большим процентом нарушений, но протекает мейоз и формируется пыльца. В иных случаях, вероятно, вместо пыльников формируются стаминодии с абсолютным или почти полным отсутствием спорогенной ткани. Цветки тех единичных растений, в стаминодиях которых отмечены участки генеративной ткани, содержали пыльцу, значительно варьирующую по форме и размеру, что обычно указывает на разную пloidность. Это является дополнительным свидетельством в пользу того, что растения с цветками, несущие вместо пыльников стаминодии, полиплоидны.

Таким образом, в популяциях *P. officinarum* микрогаметофит является относительно стабильным элементом системы размножения. Он несёт гаплоидный набор хромосом и формируется только у растений с диплоидной спорогенной тканью. Большое число аномалий при его формировании указывает на то, что даже такие растения имеют несбалансированный геном и большой процент анеуплоидов. Нормальное течение мейоза у них затруднено. При оплодотворении такой пыльцой уровень пloidности у потомков по отношению к родительским растениям мог увеличиваться лишь на  $1x$ . Однако отмечены многочисленные случаи того, что уровень пloidности потомков по отношению к вегетирующим в популяциях растениям возрастал более чем на  $1x$  (Кашин, 2006).

В ходе исследования показано, что для растений популяций, как апоспоровых (различные виды *Pilosella*, включая и указанные выше популяции *P. officinarum*), так и диплоспоровых (виды *Taraxacum* и *Chondrilla*) автономных апомиктов, свойственны явления анеу- и миксоплоидии. При этом в пределах одного апекса обнаружены клетки до 3-4 разных уровней пloidности, зачастую ещё и с числом хромосом, не кратным основному числу. Выявлено, что число лишних или недостающих хромосом при анеуплоидии даже в пределах одного апекса также существенно варьирует. Степень распространения анеу- и миксоплоидов столь высока (до 30 – 65 % от числа исследованных растений или их потомков), что нет оснований говорить о спонтанном, нерегулярном их возникновении. Подобное ранее было обнаружено лишь у некоторых псевдогамных апомиктов *Rosaea* (Мирошниченко, 1978), но, вероятно, свойственно большинству апомиктов. Скорее, речь идёт о закономерном сопровождении явлениями анеу- и миксоплоидии гаметофитного апомиксиса и о геномной нестабильности апомиктов, проявляющейся не только на уровне генеративных структур и протекающих в них процессов выбора пути репродукции (мейоз – апомейоз, зиготия – апозиготия), но и на уровне соматических клеток и самого хода митоза. Миксоплоидия, обнаруживаемая с высокой частотой в клетках апикальных меристем, указывает, в частности, на то, что у апомиктов уже в генезисе клеток зародышевого пути наблюдается неустойчивость протекания клеточного цикла, что приводит к реализации с высокой частотой, наряду с собственно митозом, редукционного митоза, реституционного митоза, эндомитоза и т.п.

Известная тесная корреляция между гаметофитным апомиксисом, гибридогенезом и полиплоидией может объяснить высокую долю анеу- и миксоплоидов у апомиктов. Однако и в этом случае остаётся открытым вопрос о том, эта корреляция является причиной или следствием реализации гаметофитного апомиксиса у растений.

Нестабильность генома в соматических клетках меристем, являющаяся результатом разбалансированного течения клеточного цикла, означает, что и при переходе к цветению, т.е. при трансформации апекса в генеративный, эта разбалансированность сохраняется. Поэтому причиной перехода растений к гаметофитному апомиксису может быть несбалансированность генома и нарушения нормального течения клеточного цикла, которые, в свою очередь, являются следствием полиплоидии или гибридогенеза. Часть из нарушений нормального течения клеточного цикла (не только при митозе, но и при мейозе) и провоцирует реализацию апомейоза (апоспории или диплоспории) и партеногенез. При этом имеет место рассогласованность действия факторов регуляции клеточного цикла, нарушение градиентов их активности вдоль продольной оси семязачатка и т.п.. При реализации диплоспории, например, нарушения в регуляции клеточного цикла в соответствующих клетках приводят либо к реализации вместо мейоза митоза (Tetrahymena-тип), либо к нарушениям аналогичным тем, что имеют место при реституционном митозе (Antennaria-тип), либо к нормальному его течению, но с предшествующим эндомитозом в клетке-предшественнице материнской клетки мегаспор (*Allium nutans*-тип). При апоспории факторы регуляции клеточного цикла «срабатывают не в том месте» и приводят к пролиферативной активности по пути мегагаметофитогенеза «не той клетки». При реализации партеногенеза эти нарушения в регуляции клеточного цикла приводят к пролиферативной активности яйцеклетки или других клеток мегагаметофита без оплодотворения.

Исходя из этого, механизмы реализации гаметофитного апомиксиса следует искать на уровне механизмов эпигенетической регуляции клеточного цикла, а варьирование частоты миксоплоидии и анеуплоидии у растений одних и тех же популяций по годам указывает на зависимость явления от факторов внешней среды, опосредованных изменениями на уровне всё тех же физиолого-биохимических механизмов регуляции.

Полученные результаты не только подтверждают заключение о том, что гаметофитный апомиксис является неустойчивой системой семенного размножения (Кашин, 2006), но и показывают, что эта неустойчивость охватывает не только стадии выбора пути семенной репродукции, но и все циклы и формы репродукции клеток в онтогенезе растений.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проекты 05-04-49001, 08-04-00319).

#### Литература

1. Кунах В.А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Киев. - 2005. - 730 с.
2. Чугункова Т.В., Шевцов И.А. Цитогенетика сахарной свёклы. - Киев. - 1992. - 176 с.
3. Ramsey Ju., Schemske D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants // Ann. Rev. Ecol. Syst. - 1998. - vol. 29, N 1. - P. 467-501.
4. Otto S. P., Whitton J. Polyploid incidence and evolution // Annu. Rev. Genet. - 2000. - vol. 34. - P. 401-437.
5. Зосимович В.П. Полиплоидия и её значение в эволюции и селекции покрытосеменных растений // Экспериментальная полиплоидия у культурных растений. - Киев. - 1974. - С. 5-12.
6. Soltis D.E., Soltis P.S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution // Trends Ecol. Evol. - 1999. - vol. 14, N 9. - P. 348-352.
7. Цвелёв Н.Н. О значении гибридизации в эволюции высших растений // Эмбриология цветковых растений (терминологии и концепции). – Санкт-Петербург. - 2000. - Т. 3. - С. 137-141.
8. Стеббинс Д.Л., Айала Ф.Х. Эволюция дарвинизма // В мире науки. - 1985. - № 9. - С. 13-39.
9. Averett J.E. Polyploidy in Plant taxa: Summary // Polyploidy in Plant, biological relevance. - New York. - 1980. - P. 269—273.

10. *Готшлак В.* Полиплоидия в эволюции высших растений // Современные достижения молекулярной биологии хромосом и клеток. - Алма-Ата. - 1989. - С. 7—45.
11. *Каушин А.С.* Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. – Саратов. - 2006. - 309 с.
12. *Thomas P.T.* Reproductive versatility in *Rubus*. II. The chromosomes and development. // *J. Genet.* - 1940. - vol. 40, N 1-2. - P. 119-128.
13. *Gustafsson A.* Apomixis in higher plants. Pt. I-III // *Lunds. univ. Arsskrift.* - 1946. - bd. 42, - S. 1—68; 1947. - bd. 43. - S. 69—370.
14. *Хохлов С.С.* Полиплоидия и апомиксис у покрытосеменных растений // Полиплоидия и селекция. - Москва; Ленинград. - 1965. - С. 62—69.
15. *Nogler G.A.* Gametophytic apomixis // *Embryology of Angiosperms.* - Berlin e.a. - 1984. - P. 475-518.
16. *Rutishauser A.* Fortpflanzungsmodus und Meiose apomiktischer Blütenpflanzen // *Protoplasma.* - 1967. – vol. 1, N3. - P. 1-243.
17. *Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г.* Выявление апомиктических растений во флоре цветковых растений СССР. – Саратов. - 1978. - 224 с.
18. *Grant V.* Plant speciation. - New York. - 1981. - 563 p.
19. *Babcock E.B., Stebbins G.L.* The American species of *Crepis*. Their interrelationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis. - Washington. - 1938. - 199 p.
20. *Абрамова Л.И.* Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и пыльцевых зёрнах культурных растений. – Ленинград. - 1988. - 61 с
21. *Мирошниченко Е.Я.* Факультативно-псевдогамный апомиксис и кариологический полиморфизм в роде *Poa* L. // Апомиксис у растений и животных. – Новосибирск. - 1978. - С 224-236.

### Резюме

На примере растений ряда автономных апомиктов Asteraceae рассмотрены цитогенетические особенности генезиса клеток зародышевого пути у апомиктов. Высказана гипотеза о том, что реализация гаметофитного апомиксиса в системе семенного размножения у цветковых обусловлена изменениями на уровне механизма регуляции клеточного цикла после актов гибридогенеза и/или полиплоидии.

На прикладі рослин ряду автономних апоміктів Asteraceae розглянуті цитогенетичні особливості генезису клітин зародкового шляху апоміктів. Запропонована гіпотеза про те, що реалізація гаметофітного апоміксису у системі насінневого розмноження у квіткових рослин зумовлена змінами на рівні механізму регуляції клітинного циклу після подій гібридогенезу і/або поліплоїдії.

Cytogenetic peculiarities of genesis of embryonic path cells in apomicts are under consideration with usage as example some autonomous apomicts from the *Asteraceae*. The hypothesis is stated that realization of gametophytic apomixis in the seed reproduction system of flowering plants is conditioned by changes at the level of the mechanism of cell cycle regulation following after acts of hybridogenesis and/or polyploidy.

**МАЛЕЦКИЙ С.И.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*пр. акад. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090 E-mail:*

*[stas@bionet.nsc.ru](mailto:stas@bionet.nsc.ru)*