

Tetramutant recombinant of *ap1-1, bp-1, clv1-1, gl1-1* certainly have mutational changes beyond diagnostic (species-, genera- and familyspesific) attributes.

ЦВЕТОВА М.И.¹, ЭЛЬКОНИН Л.А.¹, ИШИН А.С.²

¹ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: elkonin@mail.saratov.ru

²ФГНУ Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы, 410010 Саратов, пос. Зональный; e-mail: rossorgo@yandex.ru

ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ АУТОТЕТРАПЛОИДОВ СОРГО, ИНДУЦИРОВАННЫХ КОЛХИЦИНОМ

У большинства изученных видов растений в зиготе содержится диплоидный, а в гаметах гаплоидный набор хромосом и соответствующее им количество ДНК. Постоянство числа хромосом – один из фундаментальных признаков вида, обеспечивающих сохранение генетической информации в ряду поколений, по крайней мере, у амфимиктичных видов растений.

В то же время многочисленными исследованиями показано, что у многих видов растений в ходе онтогенеза возникает миксоплоидия - наличие клеток с различающимися числами хромосом [1]. В данной работе речь идёт об изменении чисел хромосом в клетках апикальных меристем, из которых в процессе онтогенеза формируются генеративные органы и гаметы. Это явление отлично от мультипликации или редукции генома или частей генома, связанных с клеточной дифференциацией.

Результаты многочисленных исследований указывают на то, что возникновение миксоплоидии связано с нарушениями клеточного цикла у растительных форм, произошедших в результате гибридогенеза и полиплоидизации [1,2]. Мы наблюдали нестабильность числа хромосом в потомстве аутотетраплоидов, индуцированных колхицином у константного отобранного сортообразца сорго и полустерильной линии, полученной с использованием культуры *in vitro*.

Материал и методы

Исследованы аутотетраплоиды линий Н-3366/2-тетра, полученной на основе сортообразца Негритянское кремово-бурое к-3366/2 и АС-1-30, которая является потомством одного растения из линии АС-1, происходящей из каллуса, полученного от метёлки полностью стерильного растения из F₂ гибрида [А1]Саратовское-3/С-752 [3]. Тетраплоиды индуцированы путём колхицинирования апикальных меристем проростков [4].

В скрещиваниях использованы линии со стабильной цитоплазматической мужской стерильностью: [А2]КВВ-181, [9Е]Желтозёрное-10, [А4]Желтозёрное-10 и [А3]Фетерита-14. Метелки растений до начала цветения тщательно изолировали пергаментными изоляторами.

Пыльцу анализировали на временных препаратах, окрашенных раствором йодистого калия; диаметры пыльцевых зёрен (ПЗ) измеряли с помощью окуляр-микрометра. Подсчёт хромосом проводили в корневых меристемах, зафиксированных в ацето-алкоголе (1:3) после предобработки в растворе α-монобромнафталина и окрашенных ацето-гематоксилином.

Результаты и обсуждение

В поколении С₅ среди аутотетраплоидов линии Н-3366/2-тетра, которые отличаются уменьшенной по сравнению с исходной линией высотой, крупными колосковыми чешуями и низкой озёрнёностью метёлок, было выделено растение НТ-12, которое отчётливо выделялось высотой и полностью озёрнённой метёлкой.

Цитологический анализ подтвердил его диплоидную конституцию, что позволяет считать его полигаплоидом.

147 растений из его потомства было изучено в поле. Среди них в период цветения по морфологии выделено 8 тетраплоидов, а также 2 растения, у которых, разные побеги по морфологическим признакам были диплоидными, либо тетраплоидными. При этом различались по плоидности не только различные побеги кущения, но и некоторые боковые метёлки второго порядка отличались по плоидности от несущего их побега первого порядка.

У выделенных растений был проведён анализ пыльцы. Ранее было показано, что диаметр абсолютного большинства пыльцевых зёрен (ПЗ) у исходного сортообразца лежит в пределах от 41,7 до 54,3 мкм, причём ПЗ, диаметр которых равен или превышает большее из этих значений, встречаются у диплоидов редко. При этом, между размерами гаплоидных и диплоидных ПЗ у сорго отсутствует четко выраженная граница, и их диаметры совпадают в пределах 50,1-54,3 мкм [4].

В исследуемом материале в пыльце метёлок, определённых как диплоидные, с низкой частотой встречались ПЗ с диаметром 50,1 мкм, что является нижней границей диаметра ПЗ фенотипически тетраплоидных метёлок. Однако в некоторых случаях (метёлки №№ 2, 3 и 7 растения НСТ-8) пыльца представляла собой смесь «нормальных» и крупных ПЗ (табл.1).

Таблица 1

Распределение пыльцевых зёрен в зависимости от диаметра в пыльце некоторых соцветий у растения НСТ-8 из потомства полигаплоида негритянского сорго

№ метёлки	Плоидность по фенотипу	Частота пыльцевых зёрен с диаметром* (%)							
		4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
		37,5	41,7	45,9	50,1	54,3	58,5	62,7	66,8
8-1	2n	6,0	40,0	48,0	4,0	2,0	-	-	-
8-3	2n	-	1,0	6,0	31,0	26,0	33,0	2,0	1,0
8-2	4n	-	18,0	12,0	34,0	28,0	8,0	-	-
8-4	4n	-	-	-	13,9	23,3	46,5	11,6	4,6
8-7	4n	-	-	20,0	40,0	26,0	14,0	-	-

* Верхняя строка-диаметр пыльцевых зёрен в делениях окуляр-микрометра, цена деления – 8,35 мкм; нижняя строка – диаметр пыльцевых зёрен в микронах

Однако очевидно, что анеуплоидные ПЗ, образующиеся в результате нарушений мейоза у тетраплоидов, могут иметь размер, характерный для гаплоидных ПЗ. Поэтому различия в уровне плоидности ПЗ у тетраплоида могут быть доказаны только в результате цитологического анализа потомства. При подсчёте числа хромосом в потомстве растения НСТ-8 было показано, что в четырёх семьях (семья – потомство одной метёлки) все растения были диплоидными, тогда как в трёх семьях выявлены только тетраплоиды. Эти данные подтверждают, что различные метёлки растения НСТ-8 имели разную плоидность. У растения НСТ-41 также имело место расщепление по числу хромосом в потомстве одной метёлки. Почти в каждой семье (потомстве одной метёлки) выявлены экземпляры как с диплоидным, так и с тетраплоидным набором хромосом.

Известно, что генетически различающиеся побеги образуются при возникновении мутаций на I - II этапах органогенеза. Мутационные события на более поздних стадиях онтогенеза ведут к возникновению более мелких секторов мутантных тканей в пределах побега, соцветия, пыльника [5].

В нашем материале у растений НСТ-8 и НСТ-41 по плоидности различались побеги. В то же время выявлена миксоплоидность и в пределах отдельных метёлок, т.е.

нарушения в работе митотического аппарата клеток происходили на разных этапах онтогенеза.

В последующих поколениях случаи расщепления по плоидности потомства, как отдельных растений, так и отдельных соцветий, не были обнаружены. Однако у большинства изученных тетраплоидных растений были выявлены ПЗ, диаметр которых не превышал 45,9 мкм (0,50-25,0%). Тетраплоидные растения с повышенной частотой таких ПЗ были вовлечены в скрещивания со стабильными линиями с ЦМС, не завязывающими семян в отсутствие чужой пыльцы.

49 метёлок стерильных линий опылили пылью индивидуальных соцветий, либо смесью пыльцы исследуемых тетраплоидных растений. Как правило, в скрещиваниях диплоидов с тетраплоидами образуются зерновки с триплоидным зародышем и щуплым тетраплоидным эндоспермом. В данном материале наряду с щуплыми зерновками на 14 метёлках получены выполненные зерновки, причём на шести метёлках от 15 до нескольких десятков семян. Развившиеся из выполненных зерновок растения были диплоидами, что подтверждено цитологическим анализом.

Пять из этих растений оказались гибридами, что безусловно доказывает наличие гаплоидных ПЗ у исследуемых тетраплоидов. Низкий уровень завязываемости гибридных зерновок в данных скрещиваниях, возможно, объясняется тем, что в разряд ПЗ с диаметром ниже 50,1 мкм могли попасть анеудиплоидные ПЗ, отличающиеся сниженной жизнеспособностью. Остальные растения в этих семьях не отличались по фенотипу от растений материнской линии. Они, очевидно, возникли в результате развития семян на базе диплоидного зародышевого мешка за счёт псевдогамной формы апомиксиса, когда зародыш возникает путем партеногенетического развития яйцеклетки, а эндосперм – в результате оплодотворения ядер центральной клетки зародышевого мешка.

Ранее с помощью аналогичного подхода было продемонстрировано существование гаплоидных гамет у аутотетраплоидной линии сорго с вариабельной мужской фертильностью, АС-1-30-тетра. Было сделано предположение, что самым вероятным механизмом их образования является соматическая редукция на разных этапах органогенеза [6]. Так как у этой линии частота образования гаплоидных пыльцевых зёрен выше, чем у Н-3366/2-тетра, мы исследовали микроспорогенез с целью уточнения механизмов их образования.

В МІ и ТІ отмечено по одной клетке с нарушениями мейоза, которые могли бы привести к образованию микроспор с уменьшенным числом хромосом, а именно мейоциты с двумя веретёнами деления (0,35% и 0,07%, соответственно). В ТІ отмечены клетки с несколькими отстающими хромосомами и с неразделившимися бивалентами, задержавшимися на экваторе (18,6% и 13,8%, соответственно). Однако число отстающих хромосом и бивалентов не было достаточным для возникновения гаплоидных клеток, и могло обеспечить лишь образование анеуплоидных ПЗ.

В то же время в диакинезе и в МІ у шести из девяти исследованных растений отмечено от 0,6 до 5,7 % клеток с 10 бивалентами. Таким образом, было подтверждено, что редукция числа хромосом произошла в премейотический период. Подобная миксоплоидность, спонтанно возникающая в соматических тканях, либо в пыльниках в ходе премейотических делений, описана у ряда видов растений [1]. При этом клетки, отличающиеся по уровню плоидности от основного, чаще всего имели тетра- или полиплоидное число хромосом. Гораздо меньше сообщений о возникновении у растений соматических клеток или тканей с редуцированным набором хромосом. У сорго наблюдали диплоидизацию конусов нарастания тетраплоидных проростков после воздействия колхицином, и именно воздействием этого вещества объясняли имеющую место соматическую редукцию, так как в необработанных растениях из исследованных семей это явление обнаружено не было [7].

В нашем материале редукция числа хромосом происходила спонтанно и наблюдалась у линий сорго до S_{20} . Можно предположить, что она обусловлена нарушением клеточного цикла, аналогично тому, которое имеет место у апомиктов и гибридов [1,2], тем более что для сорго свойственен апомиксис в его факультативном проявлении.

Выводы

1. Геномная нестабильность в потомстве индуцированного колхицином аутотетраплоида сорго проявляется в формировании миксоплоидных растений ($2n - 4n$).
2. Образование гаплоидных гамет у аутотетраплоидов сорго является результатом соматической редукции, которая происходит на разных этапах онтогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 06-04-49119, 08-04-00319).

Литература

1. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К. - 2005. - 730 с.
2. Каушин А.С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых. – Саратов. – 2006 - 309 с.
3. Elkonin L.A., Enaleeva N.Kh., Tsvetova M.I., Belyaeva E.V., Ishin A.G. Partially fertile line with apospory obtained from tissue culture of male sterile plant of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // Ann. Botany - 1995. - vol. 76. - P.359-364.
4. Цветова М.И. Изучение закономерностей экспериментальной полиплоидии у сорго: дисс...канд. биол.наук. – Санкт-Петербург. - 1997. – 162 с
5. Шевченко В.В., Гриних Л.И. Химерность у растений. – М. - 1981. - 212 с.
6. Цветова М.И., Эльконин Л.А. Нестабильность уровня ploidy у аутотетраплоидов линии сорго с варибельной мужской фертильностью // Генетика. - 2002. – т.38, № 5. – С. 641-646.
7. Chen C.H., Ross J.G. Colchicine-induced somatic chromosome reduction in Sorghum. V. Diploidization of the stem apex after treatment of tetraploid seedlings // Can. J. Gen. Cytol. – 1965. – vol.7, № 1. - P. 21-30.

Резюме

Обнаружена нестабильность уровня ploidy в потомстве индуцированных колхицином аутотетраплоидов сорго. Предполагается, что возможным механизмом образования гаплоидных гамет у аутотетраплоидов является соматическая редукция хромосом на разных этапах онтогенеза.

Виявлена нестабільність рівня ploidy у нащадків індукованих колхіцином аутотетраплоїдів сорго. Вважається, що можливим механізмом утворення гаплоїдних гамет у аутотетраплоїдів є соматична редукція хромосом на різних стадіях онтогенезу.

Instability of ploidy level has been discovered in the offspring of the sorghum autotetraploids induced by colchicine. It is supposed that a possible mechanism of haploid gamete formation in autotetraploids is somatic reduction of chromosome number at different stages of ontogenesis.