УДК 633.854.78:576.3

Л.Л. ЮШКИНА [1], Е.В. НЕСТЕРОВА [2],
В.В. КИРИЧЕНКО [1], Т.А. ДОЛГОВА [3], В.Н. ПОПОВ [2]
[1] Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева, Харьков
[2] Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева
[3] Национальный фармацевтический университет, Харьков

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА *HELIANTHUS PRAECOX* × *H. ANNUUS*, ЕГО РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ И ДВУХ БЕККРОССОВ

Изучали мейоз у дикого вида (H. praecox) и культурной формы (H. annuus) подсолнечника, их межвидового гибрида F_1, а также двух поколений беккроссов. Выявили невысокий уровень нарушений в мейозе родительских форм гибрида F_1. Межвидовое скрещивание дикой и культурной форм привело в мейозе к значительному (50 %) увеличению нарушений в материнских клетках пыльцы подсолнечника. Беккроссирование гибридов культурной формой подсолнечника снижает количество клеток с нарушениями до 12,8 % у BC_1 и 9,6 % у BC_2, а цитологическая стабильность растений восстанавливается только у второго беккросса.

© Л.Л. ЮШКИНА, Е.В. НЕСТЕРОВА, В.В. КИРИЧЕНКО, Т.А. ДОЛГОВА, В.Н. ПОПОВ, 2009

Введение. Полиморфный род *Helianthus* насчитывает 49 дикорастущих видов одно- и многолетнего типа развития [1]. Каждый вид является потенциальным источником ценных в селекционном отношении признаков (устойчивость к болезням, засухоустойчивость, жирнокислотный состав масла и др.). Из литературных источников известно, что однолетние виды подсолнечника (в том числе культурный) в отличие от многолетних достаточно хорошо скрещиваются между собой [2, 3]. Однако несмотря на относительно хорошую завязываемость семян, у межвидовых гибридов, полученных скрещиванием однолетних видов, могут возникать серьезные нарушения при рекомбинации хромосом вследствие их частичной или полной негомологичности. Это является существенным препятствием вовлечения межвидовых гибридов в селекционный процесс [4, 5].

Использование однолетнего дикого вида *Helianthus praecox* Engelm. & Gray как источника генов ценных признаков – устойчивости к ложной мучнистой росе [6, 7], фомопсису [6], новых типов ЦМС [8], высокого содержания олеиновой кислоты (около 40 %) [9] и др. в селекции подсолнечника, по мнению Георгиевой-Тодоровой [10], затруднено из-за низкой фертильности гибридов F_1, которая возникает в результате нарушений в мейозе. Одним из путей решения данной проблемы может быть проведение беккроссирования межвидовых гибридов F_1 культурной формой подсолнечника, что позволит создать жизнеспособное фертильное потомство с хозяйственно ценными признаками. Отбор стабильных генотипов с интрогрессивными признаками, формирующих нормальные гаметы и жизнеспособное потомство, предполагает изучение хода мейоза у последовательных беккроссов [4]. Мейоз у межвидового гибрида *H. praecox* × *H. annuus* и беккроссов (BC_1 и BC_2), полученных с участием культурного подсолнечника, изучен недостаточно [11]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение мейоза в материнских клетках пыльцы у однолетних форм подсолнечника *H. praecox* и *H. annuus*, их межвидового гибрида F_1, а также поколений BC_1 и BC_2.

Материал и методика. В качестве материнской формы использовали дикий однолетний диплоидный вид *H. praecox* Engelm. & Gray (образец PRA-380, полученный из Североаме-

риканской опытной станции, $2n = 34$), а отцовской – селекционно-ценную инбредную линию Х908-Б культурного подсолнечника (*Helianthus annuus,* $2n = 34$) селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева. Для получения межвидового гибрида *H. praecox* × *H. annuus* использовали метод ручной кастрации материнской формы в утренние часы. Первый беккросс (BC_1) получали от скрещивания F_1 с инбредной линией (F_1 × Х908-Б), второй беккросс (BC_2) – путем скрещивания BC_1 с этой же линией (BC_1 × Х908-Б).

Для изучения мейоза у родительских форм, межвидового гибрида F_1 и двух последовательных беккроссов вырезали сегменты корзинок с пыльниками на R_2 стадии онтогенеза [12] и фиксировали их в уксусном алкоголе (1 : 3) в течение 12 ч. Затем трижды промывали этиловым спиртом и оставляли на хранение в 70%-ном растворе этилового спирта при температуре +4 °С. Хромосомы материнских клеток пыльцы (МКП) окрашивали реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) после горячего гидролиза по Фельгену [13]. Мейоз изучали на давленных в капле 2%-ного ацетокармина временных препаратах. Для каждой формы подсолнечника исследовали в среднем от 2,2 до 4,5 тысяч делящихся клеток у 3–5 растений.

Для оценки стабильности мейоза у гибридов определяли мейотический индекс, который представляет собой процент нормальных тетрад от общего числа изученных. При мейотическом индексе 90 % и выше растение считается цитологически стабильным, т.е. способным воспроизводить в потомстве стабильное число хромосом (в нашем случае 34 хромосомы для диплоидных видов подсолнечника) [14].

Полученные данные подвергали статистической обработке путем попарного сравнения вариантов между собой с использованием критериев t-Стъюдента и φ-Фишера [15].

Результаты исследований и их обсуждение. Родительские формы подсолнечника характеризовались небольшим количеством хромосомных нарушений в МКП (табл. 1). Максимальный процент нарушений в мейозе наблюдали в профазе I (9,52 у дикой формы и 7,25 у культурной). На этой стадии были выявлены униваленты (4,76 % у *H. praecox* и 2,9 % у *H. annuus*), а также элиминация одной или двух пар хромосом (4,76 % у *H. praecox* и 4,35 % у *H. annuus*, табл. 2). Среднее количество хиазм на один мейоцит у дикой и культурной форм составило соответственно 20,4 ± 1,14 и 20,94 ± ± 0,56, а на бивалент – 1,20 ± 0,07 и 1,23 ± 0,03. Количество закрытых (кольцевых) бивалентов у обеих родительских форм было также примерно одинаковым: 3,35 ± 1,09 у *H. praecox* и 3,75 ± ± 0,59 у *H. annuus*.

Второе деление мейоза у подсолнечника заканчивается образованием тетрад по симультанному (одновременному) типу с изобилатеральным расположением микроспор (рисунок). При образовании тетрад количество клеток с нарушениями снижается по сравнению с профазой I в 2,3 раза у дикой формы и в 4,6 раза у культурной (табл. 1). При этом у *H. praecox* наблюдали 2,39 % тетрад с микроядрами, 0,72 % триад, 0,24 % полиад (пентады) и 0,72 % клеток с двумя и четырьмя пикнотическими ядрами (табл. 3). У культурной формы среди нарушений на этой стадии были выявлены только тетрады с микроядрами (0,95 %) и триады (0,63 %). Таким образом, мейотический индекс у дикой и культурной форм подсолнечника составил 95,92 и 98,41 % соответственно.

Так как использованные в исследовании родительские формы являются диплоидными и имеют $2n = 34$, то у их гибрида при нормальной конъюгации в профазе I теоретически должны образовываться 17 бивалентов. Действительно, у гибрида *H. praecox* × *H. annuus* большей частью формировались 17 бивалентов, но мейоз проходил с существенными нарушениями. Количество МКП с 17 бивалентами (рисунок) в F_1 составило 76,21 %, что на 14–16 % ниже по сравнению с родительскими формами (табл. 2). Среди нарушений профазы мейоза I у гибрида F_1 наблюдали элиминацию хромосом (1–4 пары), появление лишних хромосом (2,34 % клеток), униваленты (2,92 %), поливаленты (7,28 %) и другие типы нарушений, представленные сочетанием поливалента с различным количеством унивалентов в клетке (1,94 %). Выявленные в МКП элиминация и появление лишних хромосом могут быть обусловлены асимметричными делениями в митозах клеток археспориальной ткани растений, что и приводит к образованию анеуплоидных клеток. Наибольший процент нарушений в профазе мейоза I в F_1 был

связан с элиминацией одной пары хромосом (16_{II} – 6,31 %) и образованием тетравалента (15_{II} + 1_{IV} – 5,34 %) в клетках.

На стадии метафазы I (рисунок) для гибрида первого поколения наиболее характерным было наличие хромосом (от 1 до 6) за пределами экваториальной пластинки. В анафазе I наблюдали отставания унивалентных хромосом и образование мостов. Максимальное количество нарушений у гибрида F_1 приходилось на стадии анафазы мейоза I и II (66,7 и 70,1 % соответственно). На стадии образования тетрад процент клеток с нарушениями снизился до 55,2. В этот период (табл. 3, рисунок) у гибрида F_1 наблюдали широкий спектр нарушений: монады (0,5 %), диады (15,5 %), триады (18,3 %), полиады (пентады, гексады, единичные гептады – 3,3 %). Кроме того, были выявлены клетки с неравноценными и пикнотическими ядрами, нарушением цитокинеза, в сумме составившие 8,5 %, а также тетрады с микроядрами (9,0 %). Возникновение диад и триад связано с отсутствием второго деления мейоза в МКП. Формировать микроядра могут отставшие хромосомы, а также фрагменты, которые не успели включиться в одно из ядер. Мейотический индекс гибрида F_1 составил 44,8 %.

Беккроссирование гибрида F_1 культурной формой подсолнечника привело к значительному уменьшению нарушений в мейозе (с 50 % в F_1 до 12,79 % у BC_1, табл. 1). Общее количество МКП с нарушениями в профазе I достоверно не отличалось от аналогичного показателя у гибрида F_1. У первого беккросса не были выявлены клетки с 13, 14 и 18 бивалентами (табл. 2), а также снизилось в 4,3 раза количество клеток с 16 бивалентами, но значительно увеличилось количество клеток с унивалентами (в 9,3 раза 16_{II} +2_{I} и в 2 раза 15_{II} +4_{I}). Таким образом, максимальный уровень нарушений в мейозе у BC_1 приходился на стадию профазы I и составил 23,3 %. Однако при формировании тетрад количество нарушений у BC_1 снизилось по сравнению с гибридом F_1 в 4 ра-

Частота материнских клеток пыльцы с нарушениями

Форма и комбинация скрещивания	Изучено клеток на разных стадиях мейоза		Профаза I		Метафаза I		Анафаза I	
	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %
H. praecox	2255	4,79 ± 0,45***	105	9,52 ± 2,86	328	8,54 ± 1,54	307	2,28 ± 0,85
H. annuus	2233	2,65 ± 0,34***	69	7,25 ± 3,12	311	3,55 ± 1,05	313	4,15 ± 1,13
F_1	3952	50,0 ± 0,8	206	23,79 ± 2,97	556	47,1 ± 2,12	261	66,7 ± 2,92
BC_1	4495	12,79 ± 0,24***	206	23,30 ± 2,95	660	15,15 ± 1,40	565	10,79 ± 0,40
BC_2	3072	9,60 ± 1,68***	102	40,20 ± 4,85	464	13,79 ± 1,60	376	7,45 ±1,35

Примечание. Достоверно отличаются от F_1 при *** $P \leqslant 0{,}001$.

Уровень конъюгации хромосом и частота хромосомных

Форма и комбинация скрещивания	Изучено, шт.		Количество хиазм		Количество закрытых бивалентов на мейоцит	Количество бивален-		
	растений	клеток	на мейоцит	на бивалент		13_{II}	14_{II}	15_{II}
H. praecox	3	105	20,4 ± 1,14	1,20 ± 0,07	3,35 ± 1,09	0	0	1,90 ± 1,3
H. annuus	3	69	20,94 ± 0,56	1,23 ± 0,03	3,75 ± 0,59	0	0	1,45 ± 1,4
F_1	5	206	19,89 ± 1,59	1,17 ± 0,09	2,89 ± 1,60	0,97±0,7	0,97 ± 0,7	0,97 ± 0,9
BC_1	5	206	19,77 ± 1,12	1,16 ± 0,07	2,7 ± 1,09	0	0	0,49 ± 0,5
BC_2	4	102	20,00 ± 1,13	1,18 ± 0,07	2,92 ± 1,14	3,92±1,9	1,96 ± 1,4	6,86 ± 2,5

Примечание. Достоверно отличаются от F_1 при ** $P \leqslant 0{,}01$; *** $P \leqslant 0{,}001$.

за и составило 13,65 %. На этой стадии мейоза (табл. 3) выявлены триады (8,29 %), тетрады с микроядрами (4,26 %), а также небольшое количество диад (0,42 %) и полиад (0,33 %). Мейотический индекс у первого беккросса составил 86,3 %.

Повторное беккроссирование культурной формой подсолнечника (BC_2) привело к снижению общего количества МКП с нарушениями в мейозе до 9,6 % (табл. 1). Уровень нарушений на стадии профазы I в 1,7 раза превышал показатель первого беккросса. Основной вклад в это значение привнесли клетки с такими изменениями, как образование унивалентов (16_{II}+ +2_I – 8,82 %, 15_{II} +4_I – 3,92 %), их комбинации с поливалентами (9,8 %), а также элиминация пар хромосом (15_{II} – 6,86 %, 13_{II} и 16_{II} – по 3,92 %, 14_{II} – 1,96 %). Последующие стадии мейоза у BC_2 характеризовались меньшим количеством нарушений по сравнению с BC_1 (табл. 1). На стадии образования тетрад у второго беккросса (табл. 3) наблюдали тот же спектр нарушений, что и у BC_1, с преобладанием тетрад с микроядрами (3,34 %) и триад (2,59 %), диады и полиады были представлены единичными клетками (по 0,19 %). Мейотический индекс у второго беккросса достиг 93,7 %.

Таким образом, у межвидового гибрида подсолнечника *H. praecox* × *H. annuus* происходит нарушение конъюгации хромосом в профазе I, приводящее к появлению большого количества нарушений (55,2 %) при формировании тетрад. Согласно классификации Г.Д. Карпеченко [14], конъюгация у данного межвидового гибрида подсолнечника проходит по неопределенному типу, т.е. имеет место разнообразие числа бивалентов (от 13 до 18) и унивалентов (2 и 4) в клетках. Беккроссирование межвидового гибрида F_1 культурной формой подсолнечника снижает разнообразие числа бивалентов (только 15, 16 и 17), но увеличивает процент унивалентов в клетках. Несмотря на то, что количество нарушений на стадии образования тетрад у первого беккросса по сравнению с F_1 снижа-

Таблица 1

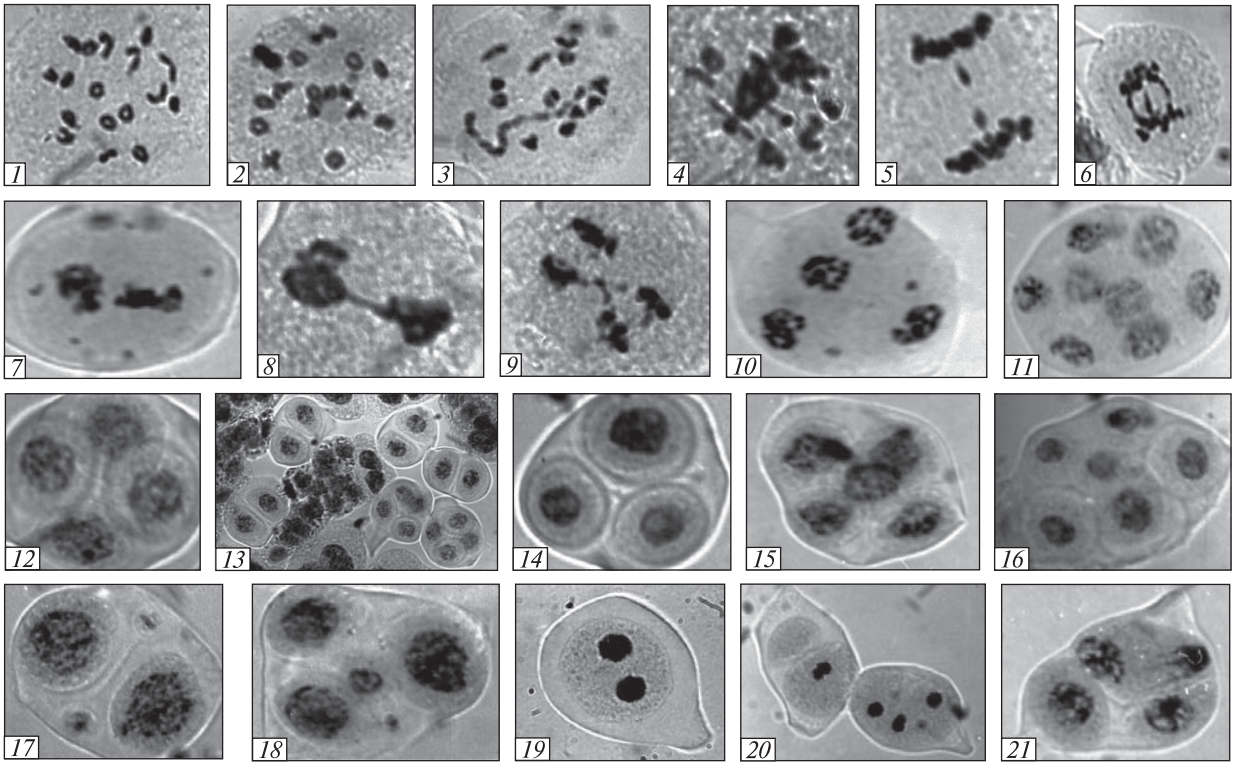
на разных стадиях мейоза у подсолнечника

Телофаза I		Метафаза II		Анафаза II		Телофаза II		Тетрады	
всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %	всего	с нарушениями, %
314	4,46 ± 1,16	224	3,13 ± 1,16	310	3,23 ± 1,0	250	4,0 ± 1,24	417	4,08 ± 0,97***
309	2,91 ± 0,96	306	1,96 ± 0,80	305	1,64 ± 0,73	305	1,64 ± 0,73	315	1,59 ± 0,7***
379	29,82 ± 2,35	442	51,4 ± 2,38	371	70,1 ± 2,38	603	41,8 ± 2,0	1134	55,2 ± 1,48
527	10,82 ± 1,35	499	16,62 ± 1,67	536	11,01 ± 1,35	586	8,19 ± 1,13	916	13,65 ± 0,59***
425	8,94 ± 1,38	357	5,88 ± 1,25	434	7,83 ± 1,30	375	9,33 ± 1,5	539	6,31 ± 1,05***

Таблица 2

ассоциаций на стадии профазы мейоза I

тов на мейоцит, %			Униваленты, %		Поливаленты, %		Другие нарушения, %
16_{II}	17_{II}	18_{II}	16_{II} + 2_I	15_{II} + 4_I	14_{II} + 1_{VI}	15_{II} + 1_{IV}	
2,86 ± 1,6	90,48 ± 2,9***	0	3,81 ± 1,9	0,95 ± 0,9	0	0	0
2,90 ± 2,0	92,75 ± 7,1***	0	2,90 ± 2,0	0	0	0	0
6,31 ± 1,7	76,21 ± 3,0	2,43 ± 1,0	1,46 ±0,8	1,46 ± 0,8	1,94 ± 1,0	5,34 ± 2,5	1,94 ± 1,0
1,46 ± 0,8	76,70 ± 3,0	0	13,59 ± 2,4	2,91 ± 1,2	0,49 ± 0,5	2,43 ± 1,1	1,94 ± 1,0
3,92 ± 1,9	59,80 ± 4,9**	0	8,82 ± 2,8	3,92 ± 1,9	0	0,98 ± 0,9	9,80 ± 2,9



Мейоз в материнских клетках пыльцы гибрида *Helianthus praecox* × *Helianthus annuus*: *1* – 17_{II} в диакинезе; *2* – 18_{II} в диакинезе; *3* – поливалент в диакинезе; *4* – хромосомы за пределами экваториальной пластинки; *5* – отставание унивалентных хромосом в анафазе I; *6* – мосты в анафазе I; *7* – микроядра в метафазе II; *8* – сохранившийся мост и хромосомы за пределами экваториальной пластинки; *9* – отстающие хромосомы в анафазе II; *10* – микроядра в телофазе II; *11* – 8 ядер на стадии телофазы II; *12* – нормальная тетрада; *13* – диады; *14* – триада; *15* – пентада; *16* – гексада; *17*, *18* – разнокачественные ядра тетрад; *19*, *20* – пикнотические ядра; *21* – нарушение цитокинеза

Таблица 3

Частота нормальных и измененных тетрад в материнских клетках пыльцы у подсолнечника

Форма и комбинация скрещивания	Всего изучено клеток, шт.	Средняя частота тетрад, %		Монады	Диады	Триады	Полиады	Другие нарушения
		норма	с микроядрами	%				
H. praecox	417	95,92 ± 0,9 ***	2,39 ± 0,8 ***	0	0	0,72 ± 0,4	0,24 ± 0,2	0,72 ± 0,4
H. annuus	315	98,41 ± 0,7 ***	0,95 ± 0,5 ***	0	0	0,63 ± 0,4	0	0
F_1	1134	44,8 ± 1,5	9,0 ± 0,8	0,5 ± 0,2	15,5 ± 1,1	18,3 ± 1,3	3,3 ± 0,5	8,5 ± 0,8
BC_1	916	86,3 ± 1,1 ***	4,26 ± 0,6 ***	0	0,42 ± 0,2	8,29 ± 0,9	0,33 ± 0,2	0
BC_2	539	93,69 ± 1,0 ***	3,34 ± 0,8 ***	0	0,19 ± 0,19	2,59 ± 0,7	0,19 ± 0,19	0

Примечание. Достоверно отличаются от F_1 при *** $P \leqslant 0{,}001$.

ется в 4 раза, мейотический индекс (86,3 %) указывает на цитологическую нестабильность растений BC_1. Повторное беккроссирование культурной формой подсолнечника хотя и приводит к увеличению количества нарушений на стадии профазы I, но последующие стадии мейоза проходят со значительно меньшими нарушениями, и количество измененных тетрад снижается по сравнению с BC_1 в два раза. Мейотический индекс у BC_2 достигает 93,7 %, что указывает на вероятную цитологическую стабильность растений.

Авторы выражают благодарность А.В. Шарыпину за обработку и подготовку фотографий к публикации.

L.L. Yushkina, E.V. Nesterova,
V.V. Kirichenko, T.A. Dolgova, V.N. Popov

CYTOGENETIC STUDY OF AN INTERSPECIFIC HYBRID *HELIANTHUS PRAECOX* × *H. ANNUUS*, ITS PARENTAL FORMS AND TWO BACKCROSSES

Meiosis of wild species (*H. praecox*) and cultivated sunflower (*H. annuus*), their F_1 interspecific hybrid as well as two backcross generations has been studied. A low level of chromosomal abnormalities in the parents was detected. Interspecific hybridization between the wild and cultivated samples has led to a considerable (50 %) increase of meiosis abnormalities in sunflower pollen mother cells. Backcrossing of hybrids by cultivated sunflower decreased the chromosomal abnormalities level to 12,8 % in BC_1 and 9,6 % in BC_2.Cytological stability of plants restored in BC_2 only.

Л.Л. Юшкіна, О.В. Нестерова,
В.В. Кириченко, Т.А. Долгова, В.М. Попов

ЦИТОГЕНЕТИЧНЕ ВИВЧЕННЯ МІЖВИДОВОГО ГІБРИДА *HELIANTHUS PRAECOX* × *H. ANNUUS*, ЙОГО БАТЬКІВСЬКИХ ФОРМ ТА ДВОХ БЕККРОСІВ

Вивчали мейоз у дикого виду (*H. praecox*) та культурної форми (*H. annuus*) соняшника, їх міжвидового гібрида F_1, а також двох поколінь беккросів. Виявили невисокий рівень порушень мейозу у батьківських форм. Міжвидове схрещування дикої та культурної форм привело до значного (50 %) збільшення порушень в материнських клітинах пилку соняшника. Беккросування гібридів культурною формою знизило кількість клітин з порушеннями до 12,8 % у BC_1 і 9,6 % у BC_2, а цитологічна стабільність рослин відновлювалась тільки у другого беккроса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schilling E.E., Heiser C.B.* Infrageneric classification of Helianthus (Compositae) // Taxonomy. – 1981. – № 30. – P. 393–403.
2. *Гаврилова В.А., Анисимова И.Н.* Генетика культурных растений. Подсолнечник. – СПб.: ВИР, 2003. – 209 с.
3. *Попов В.Н., Юшкина Л.Л., Шарыпина Я.Ю., Кириченко В.В.* Генотипические особенности скрещиваемости культурного подсолнечника с дикими видами и использование эмбриокультуры при отдаленной гибридизации // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 1. – С. 3–8.
4. *Георгиева-Тодорова Й.* Генетични и цитогенетични изследвания на род *Helianthus* L. – София, 1990. – 132 с.
5. *Jan C.C.* Cytology and interspecific hybridization // Sunflower Technology and Production. – Madison, USA, 1997. – P. 497–558.
6. *Korell M., Brahm L., Fried W., Horn R.* Interspecific and intergeneric hybridization in sunflower breeding. 2. Specific uses of wild germplasm // Plant Breed. Abstr. – 1996. – **66**, № 8. – P. 1081–1091.
7. *Miller J., Fick G.* The genetics of sunflower // Sunflower Technology and Production. – Madison, USA, 1997. – P. 441–495.
8. *Serieys H.A.* Identification, study and utilization in breeding programs of new CMS sources // Helia. – 1996. – **19**. – P. 144–160.
9. *Seiler G.* The genus Helianthus as a source of genetic variability for cultivated sunflower // Proc. 12th International sunflower conference. – Novi Sad, Yuogoslavia, 1988. – V. 1. – P. 17–58.
10. *Georgieva-Todorova J.* Interspecific hybridization and its application in sunflower breeding // Biotechnol. & Biotechnol. equipment. – 1993. – № 4. – P. 153–157.
11. *Vassilevska-Ivanova R., Telbizova T.* Hybridization of *Helianthus praecox ssp. praecox* Engl. & Gray ($2n = 34$) with cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. ($2n = 34$). 3. Cytological studies on backcross and sib-pollinated generation // Biotechnol. & Biotechnol. equipment. – 1993. – № 4. – P. 139–141.
12. *Schneiter A., Miller J.* Description of sunflower growths stages // Crop Sci. – 1981. – **21**. – P. 901–903.
13. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 217 с.
14. *Пухальский В.А., Соловьев А.А., Бадаева Е.Д. и др.* Практикум по цитологии и цитогенетике растений. – М.: Колос, 2007. – 198 с.
15. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 294 с.

Поступила 12.09.07