

ГЕНЕТИКА И ЦИТОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.3 + 581.163

НОВЫЙ ПОДХОД К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ АНТМОРФОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АПОМИКСИСА У ЗЛАКОВ

Н.А.Пишкинская, О.И.Юдакова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

В основу антморфологического метода выявления апомиксиса у растений, предложенного С.С.Хохловым и разработанного им и его учениками (Хохлов, Зайцева, Близнюк, 1973; Хохлов, Зайцева, Куприянов, 1978; Куприянов, 1989), положено представление о том, что переход на апомиктичное размножение приводит к изменениям в развитии и строении цветка, которые достаточно легко диагностируются и могут быть использованы для идентификации апомиктичных форм. Эти изменения затрагивают как морфологию цветка, так и те интимные процессы, которые протекают в генеративных органах и лежат в основе развития семени. Главное внимание в этой методике уделено качеству пыльцы, как наиболее доступному для диагностики признаку апомиксиса. Показателем качества пыльцы является СДП – степень дефектности пыльцы растений, которую определяют как отношение дефектных пыльцевых зерен к общему количеству исследованных. Подробную методику определения СДП можно найти в работах П.Г.Куприянова (1975, 1983). С помощью методов вариационной статистики он обосновал надежность антморфологического метода выявления апомиктичных форм и установил границу, разделяющую половые и апомиктичные виды по признаку «качество пыльцы». Ей соответствует СДП = 11,7%.

Общезвестно, что популяции всех видов покрытосеменных характеризуются наличием определенного процента стерильной пыльцы. Уровень содержания стерильной или дефектной пыльцы зависит от способа размножения, плоидности растений, гибридности и других характеристик системы репродукции. Принимая во внимание то, что апомиктичные популяции часто состоят из растений с разными уровнями плоидности, диагностику апомиксиса следует проводить с учетом не только величины СДП, но и ее варьирования как в пределах одной особи, так и в популяции.

Необходимо подчеркнуть, что и С.С.Хохлов и П.Г.Куприянов считали антморфологический метод методом диагностики не претендующим на окончательное заключение о наличии этого явления. Он позволяет лишь сузить круг исследования за счет исключения из него видов с нормальной пыльцой.

Наличие взаимосвязи между качеством пыльцы и апомиксисом полностью подтвердили результаты наших многолетних исследований эмбриологии злаков. Однако мы пришли к выводу о необходимости нового подхода к использованию антморфологического метода. Процедура определения СДП является довольно трудоемкой и длительной, так как она включает микроскопический анализ значительного количества пыльцевых зерен (до 600 штук на одно

растение) и биометрическую обработку полученных данных. В то же время получаемые результаты носят предварительный характер, а окончательный вывод о наличии апомиксиса дает только исследование женской генеративной сферы. В связи с этим было желательно найти достаточно надежный визуальный критерий, на основании которого можно различать пыльцу половых и апомиктических форм.

Материал и методы

Однократная фиксация эмбриологического материала (соцветий) производилась в период открытого цветения природных популяций злаков в разных географических регионах бывшего СССР.

Видообразец – случайная выборка растений – включал в среднем от 10 до 20 растений. Для фиксации использовали ацетоалкоголь (3:1) или смесь Чемберлена (Паушева, 1970), а для окраски – ацетокармин или гематоксилин. Окрашенные целиком соцветия промывали проточной водой в течение суток. Затем под бишакуляром препаровальными иглами выделяли пыльники, в капле дистиллированной воды иглой раскрывали их и извлекали пыльцу. Остатки пыльника удаляли, а на пыльцу наносили каплю кармина, тщательно перемешивали и добавляли каплю глицерин-желатина, предварительно разогретого на водяной бане. Еще раз все тщательно перемешивали, препарат накрывали покровным стеклом и подсушивали.

Для определения СДП производили подсчет разных типов пыльцевых зерен в нескольких полях зрения, охватывая не менее 100 штук. За нормальную принимали пыльцу хорошо окрашенную, выполненную, однородную по размеру. Все другие категории пыльцевых зерен (слабоокрашенные, плазмолизированные, крупные, мелкие, пустые) в соответствии с антоморфологическим методом считали дефектными. Пыльцу для анализа брали с разных частей соцветия. СДП популяции определяли как среднее арифметическое СДП отдельных растений.

Результаты исследований

В таблице 1 представлены результаты анализа качества пыльцы в популяциях, у которых на основании исследования женской генеративной сферы установлен половой способ размножения. Всего таких популяций – 33. Примерно половина из них имела высокое качество пыльцы, то есть величина СДП не достигала пограничной величины (11,7%). В трех популяциях (*Bromopsis variegata*, *Phalaroides arundinacea*, *Elymus caninus*) наблюдалось незначительное превышение этого показателя, а в остальных – уровень стерильности был достаточно высоким. Снижение качества пыльцы у половых видов могло быть вызвано несколькими причинами.

Таблица 1. Качество пыльцы в половых популяциях

Вид	Место обитания популяции	Качество пыльцы (СДП, %)
<i>Agrostis borealis</i>	Якутия	Незрелая пыльца
<i>A. clavata</i>	Камчатка	5,3
<i>A. scabra</i>	Камчатка	6,8
<i>Alopecurus pratensis</i>	Приполярный Урал	24,7*
<i>Beckmannia syzigachne</i>	Камчатка	0,0
<i>Bromopsis canadensis</i>	Камчатка	9,5
<i>B. erecta</i>	Северный Кавказ	2,4
<i>B. pumpelliana</i>	Камчатка	8,5
<i>B. gordjagimii</i>	Северный Кавказ	2,4
<i>B. variegata</i>	Северный Кавказ	11,7
<i>Calamagrostis langsdorfii</i>	Камчатка	53,1*
<i>Colpodium humile</i>	Саратовская обл.	8,2
<i>Elymus caninus</i>	Приполярный Урал	12,5
<i>E. jacutensis</i>	Якутия	5,3
<i>E. mutabilis</i>	Приполярный Урал	13,5
	Камчатка, г. Елизово	13,3
	Камчатка, побережье Тихого океана	19,7*
<i>Elytrigia lolioides</i>	Саратовская обл.	9,1
<i>Festuca rubra</i>	Якутия	9,0
<i>Glyceria lithuanica</i>	Камчатка	62,7**
<i>Leymus mollis</i>	Камчатка	5,4
<i>Melica nutans</i>	Саратовская обл.	10,0
	Приполярный Урал	31,9**
	Камчатка	67,8*
<i>Milium vernale</i>	Северный Кавказ	6,5
<i>M. effusum</i>	Камчатка	5,9
<i>Phalaroides arundinacea</i>	Камчатка	15,4
<i>Phleum alpinum</i>	Камчатка	20,1*
<i>Ph. phleoides</i>	Саратовская обл.	30,3*
<i>Ph. pratensis</i>	Саратовская обл.	6,5
<i>Poa alpigena</i>	Камчатка	59,6*
<i>P. annua</i>	Камчатка	60,0*
	Сибирь, р. Усть-Нерга	11,2

Примечание: * Поздний срок фиксации материала; ** Вегетативное размножение.

Во-первых, как показал анализ состояния женской половой сферы, в ряде популяций фиксация материала была произведена в завершающий период цветения, когда прошло оплодотворение и начался естественный процесс отмирания пыльцы (*Melica nutans*, *Alopecurus pratensis* и др.). Во-вторых, причиной высокой СДП мог стать переход популяции на вегетативное размножение, которое сопровождается подавлением семенной репродукции. На это, в частности, указывал высокий уровень дегенеративных процессов в женской генеративной сфере, например у *Glyceria lithuanica* и *Poa annua*. И, в-третьих, к сни-

жению качества пыльцы могла приводить полиплоидность отдельных растений в некоторых популяциях (*Bromopsis variegata*, *Milium vernale* и др.), на что указывала полинуклеолярная структура ядерного аппарата. Следует отметить, что характерной особенностью пыльцы половых форм является однородность ее по размеру. Как нормальные, так и дефектные пыльцевые зерна имеют одинаковую величину, но первые выполнены, а вторые характеризуются либо разной степенью плазмолиза, либо полным отсутствием содержимого.

Данные о качестве пыльцы в популяциях, в которых на основании анализа женской генеративной сферы установлены эмбриологические признаки апомиксиса, представлены в таблице 2. Таких популяций – 26. Уровень дефектности пыльцы (СДП) между популяциями колеблется в широких пределах: от 14,6% у *Festuca valesiaca* до 98% у *Poa glauca*.

Внутри популяции также наблюдается значительное варьирование величины СДП. Например, у разных растений *Festuca drimeja* (выборка составила 13 особей) качество пыльцы колебалось от слабой дефектности (СДП не превышала 10%) до полной стерильности. Нормальная (выполненная, неплазмолизованная пыльца) у одних особей была однородной, у других – различалась по размеру и степени окрашенности. Аналогичная ситуация наблюдалась у *F. jimilensis*: из 10 растений у трех пыльца была нормальной, а у остальных СДП колебалась от 13,1 до 44,7%.

Дисперсионный анализ и вычисление коэффициента вариации показали достоверность различий между отдельными особями по СДП, а также зависимость качества пыльцы от положения цветка в соцветии.

В разных популяциях одного вида разной была не только средняя степень дефектности пыльцы, но и распределение растений в выборках по данному показателю (рис. 1).

Для *F. gigantea* определена доля влияния на качество пыльцы двух факторов: принадлежности пыльцы разным особям и положения цветка в соцветии. Для первого она составила 29%, а для второго – 16%. Остальное приходится на долю неисследованных и случайных факторов.

Степень дефектности пыльцы в популяции *F. valesiaca* из коллекции Ботсада СГУ колебалась от 33,3 до 70,1% и в среднем составила 51,3%. В данном случае низкое качество пыльцы можно было бы целиком отнести на счет апомиксиса, так как у этого вида нами установлена апоархеспория¹.

¹ апоархеспория – один из типов апомиксиса, при котором зародышевый мешок развивается из соматической клетки семязпочки.

Таблица 2. Качество пыльцы в апомиктических популяциях злаков

Вид	Место обитания популяции	Качество пыльцы (СДП, %)
<i>Festuca drimeja</i>	Северный Кавказ	32,0
<i>F. gigantea</i>	Окрестности г. Саратова	41,3
	Абхазия	10,0
<i>F. jumlensis</i>	Северный Кавказ	20,8
<i>F. rubra</i>	Приполярный Урал	26,7
	Камчатка, г. Елизово	35,8
	Камчатка, побережье Тихого океана	52,9
<i>F. ruprechtii</i>	Абхазия	10,6
<i>F. sulcata</i>	Северный Кавказ	38,2
<i>F. valesiaca</i>	г. Саратов, Ботсад СГУ*	51,3
		14,6
	Окрестности г. Саратова	19,7
<i>Panicum glabra</i>	Камчатка, г. Елизово	91,5
	Камчатка, побережье Тихого океана	81,0
<i>Koeleria sabuletorum</i>	Окрестности г. Саратова	Незрелая пыльца
<i>Poa angustifolia</i>	Камчатка	48,5
	Приполярный Урал	28,8
	Якутия	63,8
	г. Саратов	25,5
<i>P. glauca</i>	Якутия	98,0
<i>P. macrocalyx</i>	Камчатка	79,6
<i>P. malacantha</i>	Камчатка	41,0
<i>P. nemoralis</i>	Камчатка	53,9
<i>P. pratensis</i>	Камчатка	29,2
	г. Саратов	31,9
<i>P. radula</i>	Камчатка	87,7
<i>P. sublanata</i>	Камчатка	77,2

Примечание: * Популяция была исследована дважды в разные сезоны.

Однако имелась и другая причина: популяция находилась на начальном этапе семяобразования, когда начался естественный процесс дегенерации мужских половых клеток. В этой же популяции в другой сезон средняя СДП равнялась 14,6%, но качество пыльцы среди растений довольно значительно варьировало. Пыльца была неоднородна по размеру, и у разных растений доминировали разные типы пыльцевых зерен.

В другой популяции *F. valesiaca* из Саратовской области было исследовано 30 растений. Средняя СДП составила 19,7%. Несмотря на сравнительно невысокий уровень дефектности, варьирование пыльцы по размеру было очень значительным: коэффициент вариации колебался от 65,2 до 117,7%. Величина СДП достоверно возрастала с уменьшением диаметра дерновины.

У *F. ruprechtii* при низком уровне средней СДП (10,6%) качество пыльцы в популяции варьировало от 100%-ной фертильности до 18%-ной дефектности. И у этого вида в пределах пыльника наблюдалась неоднородность пыльцы по размеру. Изменения в структуре цветка у некоторых экземпляров

F.ruprechtii говорили о том, что колебания уровня дефектности могут быть связаны с переходом от обособлости к раздельноплодности. Так, в верхних цветках колосков верхней части соцветий завязи были мелкими и часто не содержали зародышевого мешка, а в пыльниках развивалось большое количество пыльцы. В нижних цветках колосков средней и нижней частей соцветий завязи были крупными, а вместо тычинок имелись стаминодии.

В двух камчатских популяциях зубровки (*Hierochloe glabra*) пыльцы у растений было мало, или она отсутствовала совсем. Почти полная пыльцевая стерильность была обусловлена не только апомиксисом, но и тем что популяция находилась в завершающей фазе цветения.

Все изученные виды мятлики имели низкое качество пыльцы (см. таблицу 2), что в значительной степени связано с апомиксисом, так как все популяции характеризовались автономным эмбриогенезом. При разных величинах СДП (от 28,8% у *Poa angustifolia* до 98% у *P.glauca*) во всех изученных популяциях наблюдалось сильное варьирование размеров пыльцы. Так, например, у *P.malacantha* диаметр пыльцы колебался от 0,06 до 5,15 мкм, а у *P.macrocalyx* — от 0,08 до 6,35 мкм. В пыльниках было много пустых пыльцевых зерен.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что в большинстве случаев между половыми и апомиктичными популяциями злаков существуют значительные различия по признаку «качество пыльцы». Однако такая закономерность проявляется только при условии правильного выбора времени фиксации материала (начальная стадия открытого цветения). Поздний срок фиксации искажает действительную картину состояния мужской генеративной сферы у половых видов, значительно повышая уровень дефектности за счет начала естественных дегенеративных процессов. С другой стороны, даже при своевременной фиксации, влияние таких факторов как полиплоидия и переход на вегетативное размножение снижает качество пыльцы. В результате этого величина СДП половых видов может сравняться, а иногда и превысить СДП псевдогамных апомиктов, качество пыльцы которых бывает достаточно высоким, что связано с необходимостью у них оплодотворения для развития эндосперма. Таким образом, действие целого ряда факторов может стереть грань между качеством пыльцы половых и апомиктичных популяций и затруднить диагностику апомиксиса.

Однако при совпадении количественных показателей СДП у половых и апомиктичных популяций, качественные характеристики пыльцы всегда остаются разными. У половых форм пыльца однородна по размеру, а у апомиктичных — легко визуально разделяется на три группы: крупная, средняя и мелкая.

Варьирование размера пыльцы апомиктов может быть следствием ее генетической неоднородности, обусловленной такими явлениями как передукция, анеуплоидия, дополнительные деления половых клеток. Они могут приводить к формированию разных типов пыльцы: нередуцированной, редуцированной,

анеуплоидной и с дополнительными спермиями, которые неизбежно будут иметь разный размер. В соответствии с антморфологическим методом нормальными считаются только выполненные пыльцевые зерна среднего размера, а крупные и мелкие – дефектными. Такое определение, на наш взгляд, является некорректным, так как разные по размеру и пloidности, но выполненные пыльцевые зерна могут, а скорее всего, должны быть функциональными. Формирование генетически неоднородной пыльцы, на наш взгляд, является одним из механизмов регуляции соотношения пloidности зародыша и эндосперма. Большинство апомиктических злаков являются факультативными апомиктами, у которых наряду с разными типами нередуцированных зародышевых мешков развиваются и нормально функционируют редуцированные эуспорические. Обеспечить оптимальное соотношение пloidности зародыша и эндосперма во всех типах женских гаметофитов можно, в том числе, и за счет производства генетически неоднородной пыльцы.

В отличие от апомиктов, для половых форм формирование генетически и, как следствие, морфологически неоднородной пыльцы имело бы противоположный эффект, так ее участие в оплодотворении привело бы к дисбалансу пloidности зародыша и эндосперма. Отклонение от соотношения $2n:3n$, характерное для половых видов, нарушило бы процессы эмбрио- и эндоспермогенеза (Ноглер, 1990; Haig, Westoby, 1991) и снизило семенную продуктивность. В связи с этим, если у половых видов в результате спонтанных нарушений микроспорогенеза и образуются отклоняющиеся типы пыльцевых зерен, то только в единичном количестве.

Учитывая все вышесказанное, в качестве основного критерия при диагностике апомиксиса антморфологическим методом вместо количественной оценки степени дефектности пыльцы целесообразнее использовать визуальный признак «морфологическая неоднородность пыльцы». Это значительно сокращает и упрощает анализ.

Литература

- Куприянов П.Г., Жолобова В.Г. Уточнение понятий нормальная и дефектная пыльцы в антморфологическом методе // Апомиксис и цитозембриология растений. Саратов, 1975. Вып.3. С.47-52.
- Куприянов П.Г. Соотносительная роль факторов, вызывающих появление дефектных пыльцевых зерен в природе // Апомиксис и цитозембриология растений. Саратов, 1983. Вып.5. С.3-33.
- Куприянов, П.Г. Диагностика систем семенного размножения в популяциях цветковых растений. Саратов, 1989. 160с.
- Ноглер Г.А. Гаметофитный апомиксис // Эмбриология растений: использование в генетике, селекции и биотехнологии. Т.2. М., 1990. С.39-82.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М., 1970.- 45 с.
- Хохлов С.С., Зайцева М.И., Близнюк Л.А. Антморфологический метод обнаружения апомиктических форм в природе // Проблемы апомиксиса у растений и животных. Новосибирск, 1973. С.19-21.

Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктических форм во Флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. 224 с.

Haig D., Westoby M. Genetic imprinting in endosperm – its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of same species, and its implication for the evolution of apomixis // Phil. Trans. Roy. Soc. London (B) Biol. Sci. 1991. N 333. P.1-13.

УДК 581.163

ПОЛУЧЕНИЕ ФОРМ КУКУРУЗЫ С ЗАМЕЩЕННОЙ ЦИТОПЛАЗМОЙ МЕТОДОМ АНДРОГЕНЕЗА *IN VIVO*

А.Н. Завалишина, В.С. Тырнов

Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) широко используется в селекции при получении гетерозисных гибридов растений. Кроме того, цитоплазма может оказывать влияние на устойчивость к факторам внешней среды и заболеваниям, длительность вегетационного периода, качество белка, урожайность и ряд других признаков (Орлов, 2001). Все это свидетельствует о важной роли цитоплазмы в изменении признаков и необходимости исследования закономерностей их проявления.

Изменчивость признаков под влиянием цитоплазмы исследуют, как правило, в потомстве, полученном путем реципрокных и насыщающих скрещиваний. Однако эти методы не позволяют достаточно полно и точно дифференцировать вклад генома и плазмона, так как этим методам может сопутствовать ряд явлений, искажающих результаты – кроссинговер, предпочтительное отхождение отдельных хромосом материнской формы в женские гаметы, влияние спорофита и др. Более привлекательно использование для создания аллоплазматических линий явления андрогенеза *in vivo*. Его суть заключается в следующем. При оплодотворении, в силу ряда причин, спермий замещает ядро яйцеклетки. В результате развивается андрогенный зародыш, имеющей материнскую цитоплазму и ядро отцовского родителя. Среди андрогенных растений встречаются гаплоиды и диплоиды. Частота встречаемости андрогенных особей в норме в природе крайне низкая. Для кукурузы установлена средняя частота встречаемости андрогенеза от 1:80000 до 1:800000 (Chase, 1969; Тырнов, 1986). Вместе с тем у этой культуры была обнаружена линия, имеющая ген *ig* (indeterminate gametophyte), у которой андрогенез встречался с частотой свыше 2% (Kermicle, 1969, 1971, 1994). Такая частота позволяла использовать эту линию в практической селекции для ускоренного создания аналогов линий с ЦМС.

Линия с геном *ig* (W23 *ig*) была получена нами из Краснодарского НИИСХ. Однако она оказалась крайне позднеспелой. Начало цветения наступало только в конце августа в нашей зоне Юго-Востока. Поэтому было необходимо создать более скороспелые, вызревающие андрогенезиндуцирующие формы кукурузы, которые можно было бы использовать как для практической селекции, так и для фундаментальных исследований. Это, естественно, требо-