

УДК 573.354:635.64

Т. П. Лісовська – кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки;

В. П. Войтюк – кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки;

І. І. Кузьмішина – кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки;

В. В. Андрєєва – кандидат сільськогосподарських наук, асистент кафедри ботаніки і садово-паркового господарства Волинського національного університету імені Лесі Українки

Фертильність мікро- й макрогаметофітів мейотичних мутантів томата

Роботу виконано на кафедрі ботаніки і садово-паркового господарства ВНУ ім. Лесі Українки

Наведено результати дослідження фертильності мікро- й макрогаметофітів, а також морфометричних параметрів пилку дев'яти мейотичних мутантів томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Усі мутації, крім мутації додаткового поділу мейозу *amd*, викликають істотне зниження фертильності продуктів чоловічого та жіночого мейозу. Мутант *amd* виявляє повну стерильність і найменші розміри пилку, проте високу фертильність макрогаметофітів.

Ключові слова: мейотичні мутанти, фертильність, мікрогаметофіт, макрогаметофіт, пилок, томат.

Лисовская Т. П., Войтюк В. П., Кузьмишина И. И., Андреева В. В. Фертильность микро- и макрогаметофитов мейотических мутантов томата. Приведены результаты исследования фертильности микро- и макрогаметофитов, а также морфометрических параметров пыльцы девяти мейотических мутантов томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Все мутации, кроме мутации дополнительного деления мейоза *amd*, вызывают достоверное снижение фертильности продуктов мужского и женского мейоза. Мутант *amd* выявляет полную стерильность и наименьшие размеры пыльцы, однако высокую фертильность макрогаметофитов.

Ключевые слова: мейотические мутанты, фертильность, микрогаметофит, макрогаметофит, пыльца, томат.

Lisovska T. P., Voytiuk V. P., Kuzmishyna I. I., Andreeva V. V. Fertility of Micro-and Makrogametophytes Meiotic Mutants of Tomato. The results of the study of fertility micro- and macrogametophytes, as well as the morphometric parameters of the pollen of nine meiotic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) was

© Лісовська Т. П., Войтюк В. П., Кузьмішина І. І., Андрєєва В. В., 2011

presented. All mutations, except mutations additional meiotic division *amd*, cause significant reduction in fertility products of male and female meiosis. The *amd* mutant reveals a complete sterility of the pollen and the smallest size, but high fertility macrogametophytes.

Key words: meiotic mutants, fertility, microgametophyte, macrogametophyte, pollen, tomato.

Постановка наукової проблеми та її значення. Мейоз – особливий тип поділу статевих клітин – охоплює два послідовних ділення мейоцитів з одноразовим подвоєнням хромосом у передмейотичній інтерфазі. Завдяки мейозу підтримується сталість хромосомного набору в нащадків під час статевого розмноження, а також відбуваються такі важливі генетичні процеси, як репарація й рекомбінація спадкового матеріалу [1, 2, 9]. Процеси взаємодії гомологічних хромосом у мейозі складні та контролюються значною кількістю генів. Успіх у дослідженні генетичного контролю елементарних подій, які забезпечують синапсис хромосом, репарацію і рекомбінацію генетичного матеріалу, регулярне розподілення гомологів в анафазі I, пов'язаний із вивченням мейотичних мутантів – організмів, у яких порушено нормальний перебіг мейозу. На сьогодні відомі мутації, що викликають повну відсутність мейозу; відсутність першого поділу мейозу; синаптичні мутації; мутації, що викликають порушення конденсації хроматину й мутації додаткового поділу мейозу [4, 7]. Дослідження якомога більшої кількості мейотичних мутацій різних організмів дасть змогу з'ясувати генетичні механізми, які забезпечують регулярний хід мейозу, їх універсальність і специфічність. Мейотичні мутанти з порушенням мейозу характеризуються різним ступенем стерильності продуктів чоловічого й жіночого мейозу. У лабораторії генетики та селекції біологічного факультету ВНУ імені Лесі Українки зібрано унікальну колекцію мейотичних мутантів томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [2]. Підтримання колекції мейотичних мутантів та проведення генетичного аналізу вимагають щорічної ідентифікації значного обсягу популяцій, що розщеплюються на фертильні (гетерозиготні за мей-генами) і стерильні (гомозиготні за мей-генами) рослини. Ми передбачили, що різні типи мейотичних мутацій характеризуються специфічним впливом на фертильність продуктів чоловічого й жіночого мейозу.

Мета роботи полягала в дослідженні фертильності мікро- і макрогаметофітів, а також морфометричних параметрів пилку дев'яти мейотичних мутантів томата.

Матеріали й методи. Матеріалом дослідження були мутантні рослини, які є в колекції мейотичних мутацій томата лабораторії генетики та селекції біологічного факультету ВНУ імені Лесі Українки. До складу колекції входять синаптичні мутанти (*as_b*, *as₁*, *dsm₁*, *as₅*, *dsm₂*, *dsm₃*), мутанти, які характеризуються порушенням конденсації хроматину (*as₄* і *sti*), і мутант із додатковим другим поділом мейозу (*amd*) [2]. За походженням мутації *as₁*, *as₅* і *as₄* – спонтанні мутації, відібрані за стерильністю в польових посівах томата сорту San Marzano, *as_b* – сорту Bountry [9], *amd* і *dsm₃* виділені в M₂ сорту “Факел”, який отримали з насіння, опроміненого γ-променями в дозі 500 Гр [2]. Мутації *dsm₁* і *sti* виникли спонтанно в польових посівах томата сорту “Глорія” [8], а мутацію *dsm₂* відібрано серед рослин-регенерантів томата сорту “Вікторина”. Рослини морфологічно не відрізнялися від інших рослин вихідних сортів. Квітки були звичайної будови, відбувалося нормальне цвітіння, але плоди не зав'язувалися. Через високу чоловічу стерильність мутації підтримуються у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мей-генами рослин (у ролі материнської форми) із фертильними гетерозиготами в ролі батьківської форми.

Для всіх мутацій встановлено моногенний рецесивний характер успадкування, для найбільш вивчених встановлено відсутність алелізму між ними, проте виявлено його між синаптичними мутаціями *dsm₁* і *as_b*, які мають різне походження.

Фертильність пилку визначали ацетокарміновим методом. Фотографії пилкових зерен зроблено з використанням світлового мікроскопа Axioskop-40 при збільшенні × 400, спорад – при збільшенні × 1000. Розміри пилку вимірювали на фотографіях із наступним перерахуванням у мкм за допомогою об'єкт-мікрометра. Площу поперечного перерізу пилкових зерен розраховували для фертильних пилкових зерен округлої форми за формулою $S = \pi \cdot r^2$, для стерильних пилкових зерен овальної форми – за формулою $S = (\pi \cdot d_1 \cdot d_2) / 4$. Статистичну обробку даних здійснювали за загальноприйнятими методиками в програмі Microsoft Excel.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. Для оцінки впливу досліджуваних мейотичних мутацій на мейоз у мікро- й макроспорогенезі ми провели аналіз життєздатності продуктів чоловічого мейозу за фертильністю пилку, а продуктів жіночого мейозу – за зав'язуванням насінин на плід під час штучного запилення гомозиготних за мей-генами

рослин фертильним пилком. Проведено також оцінювання морфометричних параметрів пилку. Діаметр пилкових зерен вимірювали на фотографіях із подальшим обчисленням площі.

Наші дані свідчать, що всі гомозиготні за мейотичними мутаціями рослини виявляють низьку фертильність пилку, яка достовірно відрізняється від фертильності пилку гетерозиготних за тими ж мутаціями рослин (табл. 1). Однак найменшу фертильність пилку мають мутанти з додатковим другим поділом мейозу (*amd*), у яких виявлено 100 % чоловічу стерильність. Наші дані відповідають літературним даним щодо фертильності мутантів цього типу, виявлених в інших організмів [5, 7]. Серед усіх мейотичних мутантів пилкові зерна найменшого розміру (47,4 % площі фертильних гомозигот) утворюються в мутантних рослин *amd / amd* (табл. 2, рис. 1), що пояснюється характером порушень мейозу в цих мутантів. У результаті нерегулярного додаткового поділу мейозу (без реплікації ДНК і подвоєння хромосом) на стадії спорад, замість рівноцінних тетрад мікроспор, у них утворюються октади нерівного розміру (рис. 2).

Таблиця 1

Показники фертильності мікро- й макрогаметофітів мейотичних мутантів томата

Генотип	Фертильність пилку		Зав'язуваність насіння	
	фертильність, %	% до гетерозиготи	насіння на плід, кількість	% до гетерозиготи
<i>Amd/amd</i>	96,12 ± 0,90	100,0	70,60 ± 6,70	100
<i>amd/amd</i>	0	0	47,60 ± 5,00	67,0
<i>Sti/sti</i>	70,72 ± 2,61	100,0	124,90 ± 11,30	100,0
<i>sti/sti</i>	0,58 ± 0,41*	0,8	13,30 ± 2,20*	10,6
<i>As₄/as₄</i>	93,67 ± 0,97	100,0	89,30 ± 10,30	100,0
<i>as₄/as₄</i>	1,67 ± 0,68*	1,7	5,50 ± 1,00*	6,2
<i>As_b/as_b</i>	81,98 ± 2,11	100,0	110,80 ± 15,80	100,0
<i>as_b/as_b</i>	3,15 ± 0,98*	3,9	10,67 ± 2,26*	9,6
<i>Dsm₁/dsm₁</i>	97,66 ± 0,70	100,0	115,00 ± 14,20	100,0
<i>dsm₁/dsm₁</i>	5,70 ± 1,09*	4,7	6,83 ± 2,15*	5,9
<i>Dsm₂/dsm₂</i>	86,13 ± 0,94	100,0	133,30 ± 21,22	100,0
<i>dsm₂/dsm₂</i>	1,16 ± 0,58*	1,3	8,71 ± 3,41*	6,5
<i>Dsm₃/dsm₃</i>	96,16 ± 3,84	100,0	98,00 ± 15,12	100,0
<i>dsm₃/dsm₃</i>	10,33 ± 1,44*	10,7	18,43 ± 2,31*	18,8
<i>As₁/as₁</i>	93,67 ± 0,97	100,0	90,00 ± 9,76	100,0
<i>as₁/as₁</i>	15,76 ± 1,59*	16,8	22,16 ± 2,76*	24,6
<i>As₅/as₅</i>	78,28 ± 0,41	100,0	107,25 ± 13,72	100,0
<i>as₅/as₅</i>	4,87 ± 0,95*	6,2	13,63 ± 1,13*	12,7

* - відмінність показників гомозиготних за мей-генами рослин від гетерозигот істотна при $P < 0,05$

Дуже низькою фертильністю пилку характеризуються рослини, гомозиготні за генами, що порушують конденсацію хроматину – *as₄* і *sti* – 1,67 ± 0,68 % і 0,58 ± 0,41 %, відповідно (див. табл. 1). Пилки цих мутантних рослин характеризується досить великими розмірами відносно фертильних гетерозигот (68,6 % для *sti / sti* і 78,8 % для *as₄ / as₄*) (рис. 3, 4). Слід зазначити, що мутації цього типу викликають настільки значні порушення в першому поділі мейозу, що другий поділ відсутній майже у всіх мейоцитах. На стадії спорад спостерігаються переважно діади й діади з мікроядрами.

Фертильність синаптичних мутантів також знижена, причому за ступенем фертильності синаптичні мутанти дещо відрізняються. Так, у гомозиготи *as₁ / as₁* фертильність пилку становить 15,76 ± 1,59 %, тоді як у *dsm₂ / dsm₂* – 1,16 ± 0,58 % (див. табл. 1). Ми припускаємо, що це може бути пов'язано з різним ступенем порушення синапсису гомологічних хромосом у цих мутантних рослин.

Усі гомозиготні мейотичні мутанти істотно відрізняються за площею пилкових зерен від фертильних гетерозигот (рис. 3). Крім того, стерильний пилки характеризується значною варіабельністю розмірів, що відбивається в зростанні коефіцієнта варіації площі пилку (див. табл. 2). Найбільшою варіабельністю за площею пилкових зерен вирізняється мейотичний мутант *amd* – коефіцієнт варіації площі пилку гомозиготних рослин дорівнює 50,7 %, порівняно із 4,6 % у фертильних гетерозигот.

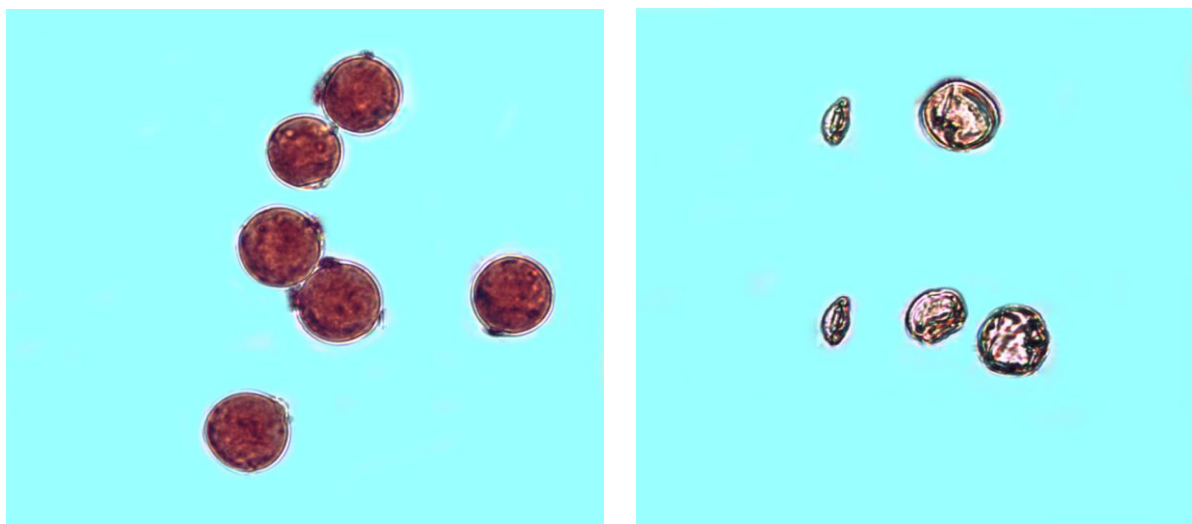


Рис. 1. Пилки гетеро- (зліва) й гомозиготних (справа) за мутацією *amd* рослин (X 400)

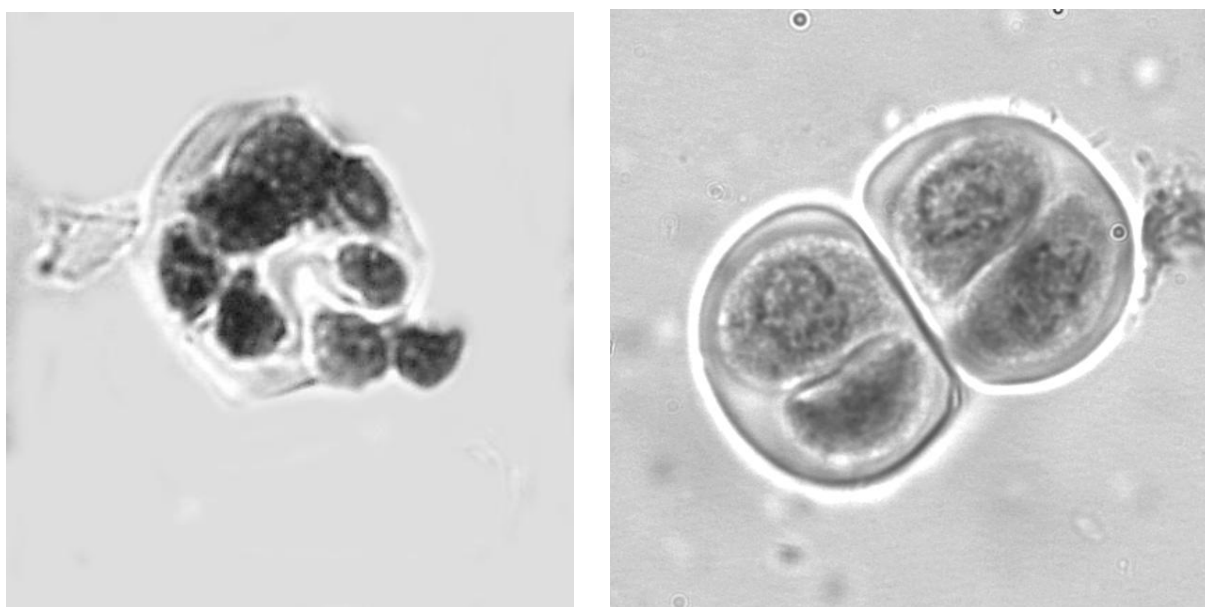


Рис. 2. Поліади у гомозиготних за мутацією *amd* (зліва) і діади в гомозиготних за мутацією *as₄* (справа) рослин на стадії спорад (X 1000)

Таблиця 2

Морфометричні параметри пилку мейотичних мутантів томата

Генотип	d_1	d_2	Площа пилкових зерен, μm^2	% до площі гетерозиготи	V, %
1	2	3	4	5	6
Amd/amd	$24,45 \pm 0,13$	–	$469,48 \pm 4,83$	100,0	4,6
amd/amd	$17,84 \pm 1,00^*$	$15,08 \pm 0,95^*$	$222,47 \pm 25,20^*$	47,4	50,7
Sti/sti	$26,96 \pm 0,17$	–	$491,08 \pm 7,21$	100,0	6,3
sti/sti	$22,37 \pm 0,51^*$	$18,94 \pm 0,70^*$	$335,70 \pm 17,60^*$	68,6	28,5
As ₄ /as ₄	$26,36 \pm 0,14$	–	$545,56 \pm 5,62$	100,0	4,6
as ₄ /as ₄	$24,34 \pm 0,44^*$	$22,41 \pm 0,57^*$	$429,94 \pm 15,92^*$	78,8	15,7
As _b /as _b	$24,53 \pm 0,16$	–	$472,87 \pm 6,08$	100,0	5,8
as _b /as _b	$21,36 \pm 0,45^*$	$18,02 \pm 0,37^*$	$302,00 \pm 8,60^*$	63,4	12,4

Закінчення таблиці 2

1	2	3	4	5	6
Dsm ₁ /dsm ₁	23,56 ± 0,25	–	436,64 ± 8,96	100,0	9,2
dsm ₁ /dsm ₁	20,34 ± 0,46*	16,82 ± 0,44*	271,18 ± 10,41*	62,1	17,2
Dsm ₂ /dsm ₂	26,63 ± 0,58	–	561,31 ± 25,67	100,0	19,9
dsm ₂ /dsm ₂	21,14 ± 0,64*	16,91 ± 0,78*	283,92 ± 19,07*	50,6	30,0
Dsm ₃ /dsm ₃	24,45 ± 0,13	–	469,48 ± 4,83	100,0	4,6
dsm ₃ /dsm ₃	19,49 ± 0,46*	17,33 ± 0,47*	267,26 ± 12,85*	56,9	21,5
As ₁ /as ₁	24,65 ± 0,30	–	503,78 ± 8,55	100,0	9,0
as ₁ /as ₁	20,64 ± 0,40*	16,19 ± 0,70*	263,90 ± 13,91*	52,4	23,6
As ₅ /as ₅	24,58 ± 0,26	–	475,08 ± 9,81	100,0	9,0
as ₅ /as ₅	18,49 ± 0,37*	17,20 ± 0,30*	250,12 ± 7,61*	52,6	12,5

* – відмінність морфометричних показників пилку гомозиготних за мей-генами рослин від гетерозиготних істотна при $P < 0,05$;

d₁ – діаметр пилку круглої форми або максимальний діаметр пилку овальної форми, d₂ – мінімальний діаметр пилку овальної форми, V – коефіцієнт варіації.

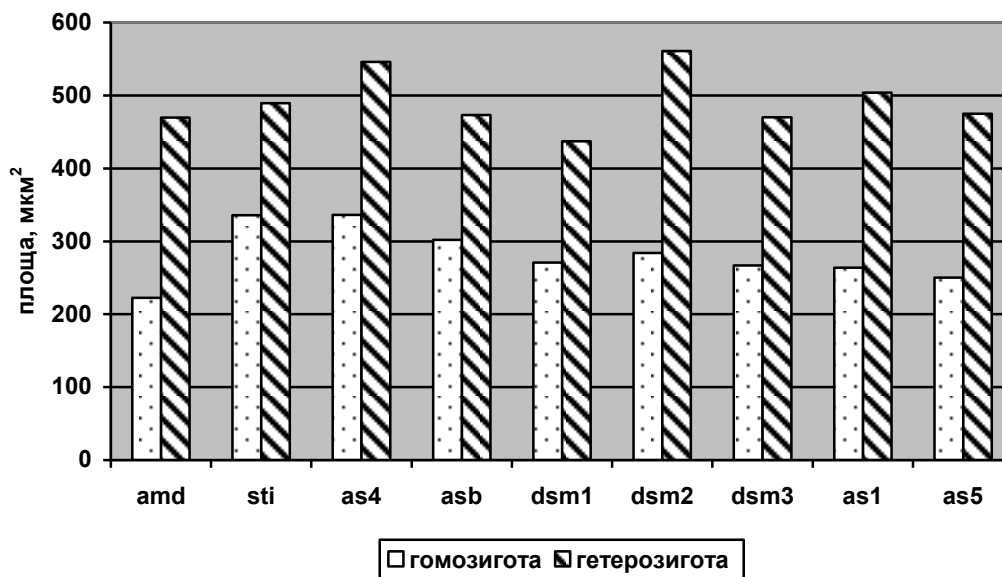


Рис. 3. Площа пилкових зерен гомо- та гетерозиготних за мейотичними мутаціями рослин

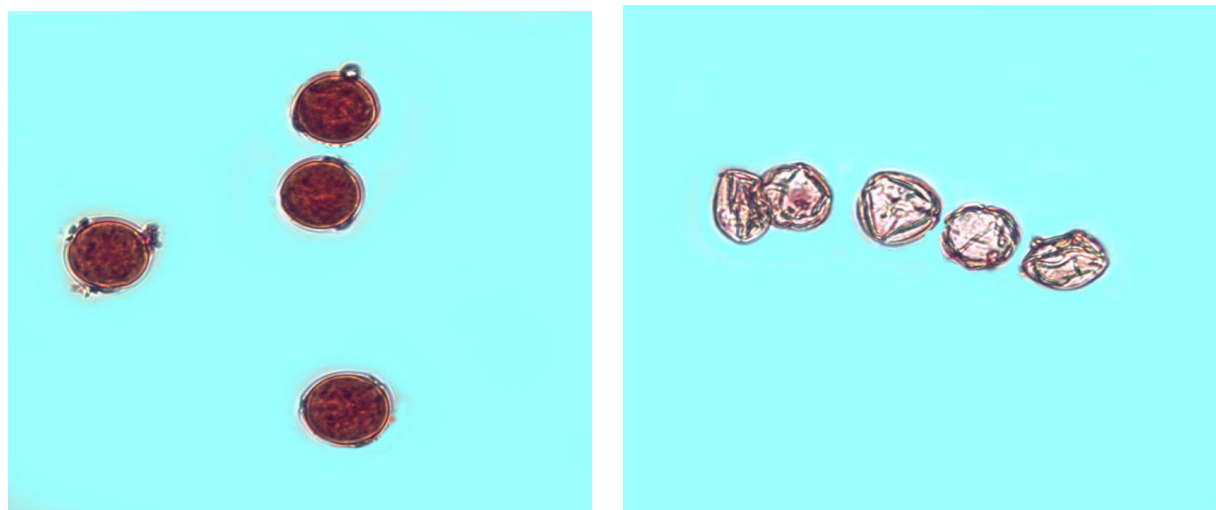


Рис. 4. Пилки гетеро- (зліва) й гомозиготних (справа) за мутацією as₄ рослин (X 400)

У зв'язку з неможливістю прямого оцінювання фертильності макрогаметофітів ми провели непряму оцінку за зав'язуванням насіння в плодах, що є також досить інформативним показником. Усі досліджені мейотичні мутанти томата, крім *amd*, виявили істотно меншу зав'язуваність насіння на плід порівняно з фертильними гетерозиготами, що свідчить про вияв мейотичних мутацій як у мікроспорогенезі, так і в макроспорогенезі. Найменшою фертильністю продуктів жіночого мейозу характеризуються мутанти з порушенням конденсації хроматину *as₄ / as₄* і *sti / sti* (5,50 і 13,30 насіння на плід, відповідно), що збігається з низьким відсотком фертильності пилку в цих рослин (див. табл. 1). Установлено високу позитивну кореляцію ($r = 0,93$) між ступенем фертильності пилку та зав'язуваністю насіння в плодах для всіх досліджених мейотичних мутантів (за винятком *amd*).

Найбільшу кількість насіння на плід серед гомозиготних за мей-генами рослин отримано в мутантів *amd / amd* – 47,60 % або 67,0 % щодо фертильних гетерозигот, що вказує на те, що така мутація не впливає або незначним чином впливає на мейоз у макроспорогенезі. Цей результат збігається з літературними даними щодо подібної за цитологічним виявом до *amd* мутації “*polimitosis*” [7] кукурудзи, яка характеризується значною кількістю зерен у качанах гомозиготних рослин.

Висновки. Установлено, що всі досліджені мейотичні мутації томата мають вияв у мікроспорогенезі, порушуючи окремі стадії мейозу, що призводить до значного зниження фертильності пилку гомозиготних за мей-генами рослин. Синаптичні мутації й мутації, які викликають порушення конденсації хроматину, також впливають на мейоз у макроспорогенезі, що засвідчує низька зав'язуваність насіння в плодах гомозиготних рослин, отриманих унаслідок запилення фертильним пилком.

Мутація *amd*, яка викликає додатковий другий поділ мейозу, має вияв у мікроспорогенезі, але не впливає або впливає незначним чином на мейоз у макроспорогенезі. Пилок гомозиготних за цією мутацією рослин повністю стерильний, має найменший розмір і значну варіабельність морфометричних параметрів.

Отже, проаналізовані типи мейотичних мутацій специфічно впливають на фертильність і розміри пилкових зерен, а також фертильність макрогаметофітів, що має практичне значення в щорічній роботі з ідентифікації значної кількості рослин популяцій, які розщеплюються за мей-генами, для складання схем схрещування, а також для виділення нових мейотичних мутацій.

Література

1. Голубовская И. Н. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе / И. Н. Голубовская // Цитология и генетика мейоза. – М. : Наука, 1975. – С. 312–343.
2. Лисовская Т. П. Мейотические мутации томата. Синтетическая теория эволюции: состояние, проблемы, перспективы : материалы междунар. науч. конф. / Т. П. Лисовская, В. П. Войтюк, И. И. Кузьмина, Л. А. Коцун. – Луганск : [б. и.], 2009. – С. 107–108.
3. Соснихина С. П. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапсиса / [С. П. Соснихина, Е. И. Михайлова, О. А. Тихолиз и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 10. – С. 1424–1433.
4. Baker V. S. The genetic control of meiosis / [V. S. Baker, A. T. C. Carpenter, M. S. Esposito et al.] // Annu. Rev. Genet. – 1976. – Vol. 10. – P. 53–134.
5. Bhavanandan K. V. Supernumerary cell division during meiosis in *Rumohra aristata* (Forst.) Ching / K. V. Bhavanandan // Cytologia. – 1971. – V. 36, № 4. – P. 575–578.
6. Gottschalk W. Asynapsis and desynapsis in flowering plants. II. Desynapsis / W. Gottschalk, M. L. H. Kaul // Nucleus. – 1980. – V. 23, № 1, 2. – P. 97–120.
7. Kaul M. L. H. Mutant genes affecting higher plant meiosis / M. L. H. Kaul, T. G. K. Murthy // Theor. Appl. Genet. – 1985. – V. 70. – P. 449–466.
8. Lisovska T. P. Two new tomatoes meiotic mutants appeared spontaneously / T. P. Lisovska, M. I. Grati, Iu. I. Nyutin // Probleme actuale ale geneticii, biotehnologiei si ameliorarii : Conf. I Nationale. – Chisineu, 1994. – P. 37–38.
9. Moens P. B. Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato / P. B. Moens // Canad. J. Genet. and Cytol. – 1969. – V. 11, № 4. – P. 857–859.
10. Pawlowski W. P. Coordinating the events of the meiotic prophase / W. P. Pawlowski, W. Z. Cande // Trends in Cell Biology. – 2005. – V. 15, № 12. – P. 674–681.

Статтю подано до редколегії
19.04.2011 р.