

М.Ф. САНАМЬЯН

Национальный университет Узбекистана, Ташкент

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ОБРАБОТКИ СЕМЯН ХЛОПЧАТНИКА ТЕПЛОВЫМИ НЕЙТРОНАМИ



*Показано, что облучение семян хлопчатника тепловыми нейтронами привело к возникновению растений с изменениями отдельных плеч хромосом (третичная моносомия) или целых хромосом (первичная моносомия). Такое облучение также индуцировало транслокации с вовлечением в межхромосомные обмены больших участков негомологичных хромосом. У выявленных в M_2 новых для хлопчатника мутаций хлорофиллдефектности типа *hantha* и *viridis* установлено моногенное рецессивное наследование. Обнаружено независимое и одновременное возникновение хлорофильной мутации типа *viridis* и транслокации.*

© М.Ф. САНАМЬЯН, 2003

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2003. № 3

Введение. Использование нейтронов для получения мутаций у высших растений начато в 40-е годы. Было показано, что при облучении тепловыми нейтронами семян ячменя в клетках растений накапливаются многочисленные повреждения хромосом, которые доходят до мейоза и вызывают стерильность растений M_1 [1]. Позже было указано на большую в два раза частоту обменных перестроек хромосом на каждое растение при облучении семян тепловыми нейтронами, чем при рентгеновском облучении [2]. Такую повышенную эффективность облучения нейтронами связывали с подавлением восстановления повреждений [3]. Преимущества нейтронов для резкого повышения частоты транслокационных перестроек по сравнению с другими видами радиации связаны также с высокой выживаемостью растений при снижении фертильности с повышением дозы облучения [4, 5].

У многих видов культурных растений на протяжении десятилетий проводили исследования по созданию серий цитогенетически маркированных линий. У культур со слабо морфологически дифференцированными хромосомами были разработаны нетрадиционные методы маркировки с помощью межхромосомных обменов [6–10].

Необходимость создания серии цитогенетически маркированных линий у хлопчатника требует поиска эффективных путей получения анеуплоидов и транслокантов [11, 12]. Использование нейтронов позволило получить в США одну моносомную и 11 транслокационных линий хлопчатника [13, 14].

В задачу настоящей работы входило выяснение влияния облучения семян тепловыми нейтронами на кариотип хлопчатника и использование этого метода для пополнения коллекции цитогенетически маркированных линий.

Материал и методика. Воздушно-сухие семена линии Л-458, полученной Абзаловым М.Ф. и Фатхуллаевой Г.Н. после длительного инбридинга сорта хлопчатника 108-Ф, перед посевом в поле облучали в биологическом канале исследовательского реактора типа ВВР-СМ тепловыми нейтронами ($E_n = 0,025$ эв, плотность потока $1,8 \cdot 10^6$ нейтронов, $см^2 \cdot с$) в дозах 1,3 и 27 Гр. Облученные семена высевали в поле для получения растений M_1 . Контролем служили растения, выращенные из необлученных семян. Цитологический анализ мейоза проводили по методике, описанной нами ранее [15]. У растений M_1 учитывали всхожесть, выживаемость, характер измен-

чивости и цитогенетические особенности. В M_2 изучали потомство измененных растений M_1 с целью выяснения причин их изменчивости. Полученные экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми для данного рода опытов математическими методами.

Результаты исследований и их обсуждение. В вариантах с облучением семян в отличие от контроля наблюдали морфологически измененные растения, причем с увеличением дозы облучения значительно возрастала доля таких растений (от 19,75 до 78,02 %). Тем не менее стерильность (5,49 %) и химерность (3,3 %) измененных растений M_1 при большей дозе облучения были невысокими.

В связи с изложенным представляло большой интерес выяснить причины изменчивости растений M_1 путем установления частоты aberrаций хромосом. Изучение конъюгации хромосом на стадии метафазы I (MI) мейоза позволило обнаружить различные типы хромосомных aberrаций (табл. 1). Так, облучение семян тепловыми нейт-

ронами дозой 1,3 Гр индуцировало межхромосомный обмен у растения 1471/1 с невысокой частотой формирования квадривалента ($0,18 \pm 0,07$ в среднем на клетку) в форме зигзага с чередующимся типом расхождения хромосом из транслокационного кольца. При дозе облучения 27 Гр изменчивость части растений M_1 была связана с третичной моносомией и перестройками хромосом обменного типа. Так, среди 16 растений M_1 с измененным кариотипом 8 были третичными моносомиками, причем 5 из них имели еще и межхромосомные обмены. У третичных моносомных форм наряду с унивалентами наблюдались и триваленты. Появление у моносомиков ассоциаций из трех хромосом свидетельствовало о конъюгации двух нормальных гомологов с одной хромосомой, состоящей из плеч различных негомологичных хромосом набора. Такие третичные моносомики появились вследствие разрывов центромер двух негомологичных хромосом и воссоединения только двух из четырех плеч.

Таблица 1

Конъюгация хромосом на стадии метафазы I мейоза у мутантов хлопчатника в M_1

Материал	Изучено клеток в MI	Число хромосом (2n)	Среднее число на клетку			
			унивалентов	бивалентов	тривалентов	квадривалентов
Л-458	50	52	0	26,00 ± 0	0	0
1474/24	22	51	1,18 ± 0,13	23,27 ± 0,26	1,09 ± 0,17	0
1476/1	25	51	0,88 ± 0,07	24,88 ± 0,07	0,12 ± 0,07	0
1476/25	23	51	0,78 ± 0,14	24,39 ± 0,15	0,48 ± 0,11	0
1474/1	23	51	0,13 ± 0,07	22,65 ± 0,27	0,87 ± 0,07	0,74 ± 0,11
1474/8	24	51	1,21 ± 0,08	23,75 ± 0,20	0,21 ± 0,08	0,42 ± 0,10
1475/22	26	51	0,77 ± 0,08	24,38 ± 0,19	0,23 ± 0,08	0,23 ± 0,08
1476/13	20	51	0,40 ± 0,11	24,00 ± 0,21	0,60 ± 0,11	0,20 ± 0,09
1476/20	29	51	0,48 ± 0,12	23,45 ± 0,20	0,66 ± 0,09	0,41 ± 0,09
1471/1	28	52	0	25,64 ± 0,14	0	0,18 ± 0,07
1474/10	35	52	0,06 ± 0,06	24,94 ± 0,18	0	0,51 ± 0,09
1474/26	25	52	0,24 ± 0,13	23,88 ± 0,31	0,48 ± 0,17	0,64 ± 0,10
1475/8	26	52	0,15 ± 0,11	24,54 ± 0,31	0,31 ± 0,14	0,46 ± 0,10
1475/20	24	52	0,38 ± 0,15	24,71 ± 0,25	0,13 ± 0,07	0,46 ± 0,13
1475/32	33	52	1,45 ± 0,17	23,94 ± 0,18	0,18 ± 0,09	0,52 ± 0,09
1476/3	21	52	0	25,62 ± 0,18	0	0,19 ± 0,09
1476/17	22	52	0,18 ± 0,08	24,64 ± 0,30	0,36 ± 0,14	0,36 ± 0,10

Третичные моносомы с транслокациями характеризовались формированием в мейозе, кроме уни-, три- и бивалентов, ассоциаций из четырех хромосом — квадрилвалентов (от $0,20 \pm 0,09$ до $0,74 \pm 0,11$ в среднем на клетку) в форме зигзага, кольца и П-образных с чередующимся и примыкающим типом расхождения хромосом.

Восемь дисомных растений M_1 от облучения тепловыми нейтронами отличались присутствием межхромосомных обменов в виде транслокаций с различной частотой и типом формирования квадрилвалентов (от $0,18 \pm 0,07$ до $0,64 \pm 0,10$ в среднем на клетку). Так, у одних транслокантов (1475/20, 1475/32, 1476/26) в материнских клетках пыльцы (МКП) наблюдали квадрилваленты только в форме зигзага с чередующимся типом расхождения хромосом, у других (1474/10, 1476/17) — только в форме колец и П-образных с примыкающим типом расхождения хромосом, а у третьих (1475/8, 1476/3) — различной формы как с чередующимся, так и с примыкающим ти-

пами расхождения хромосом из транслокационных колец. Особенностью выявленных нами транслокаций является высокая частота формирования квадрилвалентов в МКП у большей части изученных растений M_1 . Это связано с вовлечением в межхромосомные обмены больших участков негомологичных хромосом. Именно такие транслокации представляют особый интерес в целях их использования в качестве маркеров отдельных хромосом.

Изучение мейоза на стадии спорад позволило обнаружить у третичных моносомиков снижение мейотического индекса (от $90,47 \pm 0,73$ до $76,88 \pm 1,12$) по сравнению с контролем ($95,97 \pm 0,36$) (табл. 2). Кроме того, у растения 1476/25 наблюдалось значительное увеличение процента тетрад с микроядрами ($12,77 \pm 0,89$), что свидетельствовало о сильных нарушениях в расхождении хромосом в анафазе мейоза.

Характерной особенностью изученных третичных моносомиков было полное отсутствие

Таблица 2
Анализ спорад, фертильности пыльцы и завязываемости семян у мутантов хлопчатника в M_1

Материал	Доза облучения, Гр	Анализ спорад			Фертильность пыльцы		Завязываемость семян, %
		Число спорад	Мейотический индекс	Процент тетрад с микроядрами	Число пыльцы	Фертильность пыльцы, %	
Л-458	0	1329	$95,97 \pm 0,36$	$0,90 \pm 0,67$	200	$96,57 \pm 0,33$	$85,45 \pm 0,51$
1474/24	27	1325	$88,54 \pm 0,88$	$2,27 \pm 0,41$	100	0	$11,76 \pm 7,81$
1476/1	27	1048	$89,50 \pm 0,95$	$0,19 \pm 0,13$	100	0	$21,05 \pm 4,18$
1476/25	27	1410	$76,88 \pm 1,12$	$12,77 \pm 0,89$	100	0	$60,00 \pm 5,66$
1474/1	27	1380	$89,14 \pm 0,84$	$2,46 \pm 0,42$	100	0	$69,78 \pm 3,40$
1474/8	27	1356	$84,96 \pm 0,97$	$2,65 \pm 0,44$	100	0	$41,03 \pm 5,57$
1475/22	27	1140	$89,65 \pm 0,90$	$1,93 \pm 0,41$	100	0	$75,00 \pm 8,18$
1476/13	27	1616	$90,47 \pm 0,73$	$0,87 \pm 0,23$	100	0	$62,77 \pm 4,82$
1476/20	27	1348	$89,17 \pm 0,85$	$1,63 \pm 0,35$	100	0	$14,29 \pm 5,00$
1471/1	1,3	1510	$87,68 \pm 0,85$	$1,17 \pm 0,28$	201	$84,58 \pm 8,49$	$82,35 \pm 6,54$
1474/10	27	1436	$88,58 \pm 0,84$	$2,23 \pm 0,39$	100	0	$8,11 \pm 4,48$
1474/26	27	990	$91,72 \pm 0,88$	$2,42 \pm 0,49$	100	0	$20,00 \pm 7,30$
1475/8	27	1308	$90,52 \pm 0,81$	$0,92 \pm 0,26$	100	0	0
1475/20	27	1498	$88,25 \pm 0,83$	$3,60 \pm 0,48$	390	$91,28 \pm 2,04$	$38,98 \pm 3,67$
1475/32	27	1240	$89,45 \pm 0,87$	$2,38 \pm 0,43$	100	0	0
1476/3	27	1602	$94,51 \pm 0,57$	$0,50 \pm 0,18$	250	$90,35 \pm 1,87$	$75,63 \pm 3,94$
1476/17	27	1370	$89,20 \pm 0,84$	$2,19 \pm 0,40$	100	0	$17,65 \pm 9,25$

фертильной пыльцы при наличии завязываемости семян от перекрестного опыления (от $11,76 \pm 7,81$ до $75,00 \pm 8,18$).

Анализ мейоза на стадии спорад у дисомных растений с межхромосомными обменами позволил обнаружить небольшое снижение мейотического индекса (до $87,68 \pm 0,85$) и увеличение процента тетрад с микроядрами (до $3,60 \pm 0,48$). Высокой фертильностью пыльцы характеризовались только три растения из изученных (1471/1, 1475/20 и 1476/3). Остальные растения имели полностью стерильную пыльцу и низкую завязываемость семян. Исключение составляли стерильные растения 1475/8 и 1475/32, не завязавшие ни одного семени.

Так как в M_1 не удалось установить кариотипы у всех измененных растений, в M_2 было продолжено изучение потомств облученных растений. Результаты изучения конъюгации на стадии МI мейоза представлены в табл. 3, из которой видно, что в M_2 были обнаружены формы как с анеуплоидией (моносомики), так и с хромосомными перестройками (транслоканты). Однако цитологически aberrantные формы M_2 отличались от таковых в M_1 . Так, особый интерес представляло обнаружение среди растений M_2 первичного моносомика с транслокацией (1475/31₁₄). Как известно, первичные моносомики образуются в результате инактивации центромеры и элиминации одной из гомологичных хромосом под воздействием радиации,

реже спонтанно. У моносомного растения 1475/31₁₄ в МКП наблюдали очень маленький унивалент, что указывало на D-субгеномную принадлежность моносомы. Последнее чрезвычайно ценно ввиду меньшей толерантности хлопчатника к потере D-субгеномных хромосом, нежели A-субгеномных [13]. Однако из-за присутствия квадривалента в форме кольца с примыкающим типом расхождения хромосом у этого растения в некоторых МКП ($0,23 \pm 0,08$ в среднем на клетку) в его потомстве потребуются выделение моносомика без транслокации.

Третичный моносомик 1475/2₁ характеризовался присутствием в МКП, помимо редких тривалентов, от 1 до 9 унивалентов. Последнее указывало на наличие десинаптического эффекта у этого растения. Он может быть связан как со специфическим влиянием третичной моносомы, так и с проявлением независимо мутировавшего десинаптического локуса.

Растения с межхромосомными обменами в M_2 отличались от транслокантов в M_1 более низкой частотой формирования квадривалентов, за исключением бледно-зеленого растения 1475/30₄, у которого частота квадривалентов была значительно более высокой ($0,64 \pm 0,10$). У растений с обменами в M_2 наблюдали только однотипные квадриваленты: у трех — в форме зигзага (1474/9₁₄, 1474/22₁ и 1476/28₁) с чередующимся типом расхождения хромосом, у остальных — в

Таблица 3

Конъюгация хромосом на стадии метафазы I мейоза у мутантов хлопчатника в M_2

Материал	Изучено клеток в МI	Число хромосом (2n)	Среднее число на клетку			
			унивалентов	бивалентов	тривалентов	квадривалентов
1475/31 ₁₄	26	51	$1,00 \pm 0$	$24,54 \pm 0,17$	0	$0,23 \pm 0,08$
1475/2 ₁	16	51	$3,06 \pm 0,57$	$23,75 \pm 0,22$	$0,13 \pm 0,09$	0
1474/9 ₁₄	30	52	0	$25,47 \pm 0,16$	0	$0,27 \pm 0,08$
1474/16 ₃	29	52	0	$25,45 \pm 0,15$	0	$0,28 \pm 0,08$
1474/20 ₄	20	52	$0,20 \pm 0,14$	$25,20 \pm 0,25$	$0,20 \pm 0,14$	$0,20 \pm 0,09$
1474/22 ₁	26	52	$0,19 \pm 0,11$	$25,23 \pm 0,19$	$0,04 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,10$
1475/10 ₁₇	25	52	$0,08 \pm 0,05$	$25,60 \pm 0,16$	$0,08 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,07$
1475/16 ₁₃	23	52	0	$25,48 \pm 0,19$	0	$0,26 \pm 0,09$
1475/30 ₄	22	52	0	$24,73 \pm 0,21$	0	$0,64 \pm 0,10$
1476/28 ₁	26	52	$0,04 \pm 0,04$	$25,65 \pm 0,17$	0	$0,15 \pm 0,03$

форме кольца с примыкающим типом, причем ассоциации из четырех хромосом у растения 1476/28₁ отличались от таковых у других растений очень малым размером. Последнее, вероятно, объясняется вовлечением в межхромосомный обмен двух негомологичных D-субгеномных хромосом.

Кроме перечисленных хромосомных абберантов, в M₂ были обнаружены мутантные семьи с хлорофильной недостаточностью. Они связаны с нарушением определенных этапов синтеза хлорофилла, который зависит от функционирования разных локусов хромосом [4].

При посемейном анализе M₂ в двух семьях (1475/9_n и 1475/18_n) наблюдали расщепление на зеленые и желтые растения в соотношении 3:1 (17:3, $\chi^2 = 1,07$, P = 0,50–0,20 и 20:5, $\chi^2 = 0,33$, P = 0,80–0,50 соответственно), а в семье 1475/30_n — на зеленые и светло-зеленые также в соотношении 3:1 (14:4, $\chi^2 = 0,08$, P = 0,95–0,80). Такое расщепление свидетельствовало о моногенном рецессивном наследовании мутаций хлорофиллдефектности. Растения с желтой окраской в семьях 1475/9_n и 1475/18_n из-за отсутствия в листьях хлорофилла через 12–15 дней погибали. Цитологический анализ светло-зеленого растения 1475/304 позволил обнаружить в МКП квадриллентные ассоциации хромосом, указывающие на транслокантную природу этого растения (табл. 3). От черенка этого растения, полученного путем обработки в 0,1%-ном растворе индолилмасляной кислоты, при оптимальных условиях выращивания в теплице удалось получить самоопыленные семена. Посев их с целью выявления в потомстве гомозиготы по транслокации обнаружил, что все растения потомства имели светло-зеленую окраску независимо от гомо-, гетерозиготности или нормы по межхромосомному обмену. Это свидетельствовало о независимом и одновременном возникновении генной хлорофильной мутации и хромосомной транслокации, причем светло-зеленая окраска листьев и жизнеспособность в течение всего периода вегетации позволяют отнести эту мутацию хлорофиллдефектности к типу *viridis*. Необходимо отметить, что сходное одновременное мутирование с возникновением в одной и той же линии генной хлорофильной мутации и хромосомной транслокации было обнаружено ранее у гороха Гостимским [17].

Таким образом, облучение семян хлопчатника тепловыми нейтронами вызвало сильную фенотипическую изменчивость растений M₁ при высокой дозе облучения (27 Гр), однако существенно не отразилось на всхожести и выживаемости. Такое облучение привело к нарушению центромерных районов хромосом, в результате чего появились третичные моносомы, состоящие из плеч различных негомологичных хромосом набора, а также к повышению частоты крупных обменных перестроек хромосом. Тем не менее такое возрастание межхромосомных обменов у растений M₁ не сопровождалось повышением стерильности и химерности растений в изученных нами дозах облучения, хотя и наблюдалось сильное снижение фертильности пыльцы вплоть до полной стерильности у большинства хромосомных абберантов.

Выводы. Облучение семян хлопчатника тепловыми нейтронами оказалось эффективным методом индуцирования межхромосомных обменов с вовлечением в транслокации крупных участков негомологичных хромосом. Последнее чрезвычайно ценно, так как транслокационные линии с высокой частотой формирования квадриллентов очень удобны для маркировки хромосом и последующего их использования в исследованиях по идентификации хромосом.

Автор выражает искреннюю благодарность Гулину В.В. и Цупиной Л.Т. за помощь, оказанную при облучении семян.

SUMMARY. After irradiation of cotton seeds with thermal neutrons, primary and tertiary monosomics and also plants with translocations were detected among offsprings M₁ and M₂. The interchanges had high frequency of multivalents at metaphase-I of meiosis. Genetic analysis of chlorophyll deficient cotton mutants has shown that recessive monogenic factors caused new mutations of the types *xantha* and *viridis*. New *viridis* mutant was also characterized by the heterozygosity of interchromosome translocations.

РЕЗЮМЕ. Після опромінення насіння бавовника тепловими нейтронами серед нащадків M₁ та M₂ були виявлені первинні і третинні моносоміки, а також рослини з перебудовами хромосом. Міжхромосомні обміни мали високу частоту формування мультівалентів у метафазі I мейоза. Генетичний аналіз хлорофиллдефектних мутантів бавовника показав, що рецесивні моногенні фактори обумовлюють нові мутації типу *xantha* та *viridis*. Рослина з новим мутантним типом *viridis* характеризувалась також гетерозиготністю за міжхромосомним обміном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gustafsson A., Mac Key J.* The genetical effects of mustard gas substances and neutrons // *Hereditas.* — 1948. — **34**, № 4. — P. 371–386.
2. *Кальдекотт Р.С.* Ионизирующие излучения как оружие в руках селекционера // *Применение радиоактивных изотопов в промышленности, медицине и сельском хозяйстве.* — М.: Изд-во АН СССР, 1956. — С. 533–545.
3. *Кузин А.М.* Некоторые вопросы теории биологического действия быстрых нейтронов // *Радиобиология.* — 1964. — **4**, № 1. — С. 18–22.
4. *Дишлер В.Я.* Действие быстрых нейтронов на генетические системы растений. — М.: Атомиздат, 1974. — 116 с.
5. *Дишлер В.Я.* Индуцированный рекомбиногенез у высших растений. — Рига: Зинатне, 1983. — 222 с.
6. *Burnham C. R.* Chromosomal interchanges in plants // *Bot. Rev.* — 1956. — **22**. — P. 419–552.
7. *Gill B. S., Burnham C. R., Stringam G. R., Stout J. T., Weinheimer W. H.* Cytogenetic analysis of chromosomal translocations in tomato: preferential breakage in heterochromatin // *Can. J. Genet. Cytol.* — 1980. — **22**. — P. 333–341.
8. *Михайлова Е.И., Соснихина С.П., Мичурина Т.Г.* Идентификация хромосом ржи на основании конъюгационного теста в мейозе // *Генетика.* — 1993. — **29**. — С. 978–989.
9. *Фучжун Л., Гостимский С.А.* Исследование транслокаций у гороха // *Генетика.* — 1998. — **34**. — С. 1269–1276.
10. *Mahama A. A., Deaderick L. M., Sadanada K., Newhouse K. E., Palmer R. G.* Cytogenetic analysis of translocations in *Soybean* // *J. Hered.* — 1999. — **90**. — P. 648–653.
11. *Stelly D.M.* Interfacing cytogenetics with the cotton genome mapping effort // *Proc. Beltwide Cotton Conf. (New Orleans, Louisiana, USA., 10–14 January)* / Eds D.J. Herber, D.A. Richter — Memphis, 1993. — P. 1545–1550.
12. *Ji Y., Raska D.A., Mc Knight T.D., Islam-Faridi M.N., Crane C.F., Zwick M.S., Hanson R.E., Price H.J., Stelly D.M.* Use of meiotic FISH for identification of a new monosome in *Gossypium hirsutum* L. // *Genome.* — 1997. — **40**. — P. 34–40.
13. *Edwards G.A., Brown M.S., Niles G.A., Nagi S.A.* Monosomics of cotton // *Crop Sci.* — 1980. — **20**, № 4. — P. 527–528.
14. *Brown M.S.* Identification of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by means of translocations // *J. Heredity.* — 1980. — **71**. — P. 266–274.
15. *Санамьян М.Ф.* Цитогенетические особенности мутантов хлопчатника, полученных после опыления облученной пылью // *Цитология и генетика.* — 1997. — **31**, № 2. — С. 8–13.
16. *Калам Ю., Орав Т.* Хлорофильная мутация. — Таллин: Валгус, 1974. — 60 с.
17. *Гостимский С.А.* Случай одновременного возникновения хлорофильной мутации и реципрокной транслокации при облучении семян гороха гамма-лучами // *Генетика.* — 1970. — **6**, № 9. — С. 51–54.

Поступила 21.12.2000