

## ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ В ПРИРОДЕ И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**БАТУРИН С.О.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: [baturin@bionet.nsc.ru](mailto:baturin@bionet.nsc.ru)*

### НЕРЕДУКЦИЯ ГАМЕТ У *FRAGARIA VESCA* L. В ПРИРОДЕ И ОПЫТЕ

В роде *Fragaria* четко прослеживается длинный естественный полиплоидный ряд:  $2n=14, 28, 42, 56$  при  $x=7$ . Его формирование проходило при самом непосредственном участии нередуцированных гамет в половом процессе (Bringham, Senanayake, 1966; Jones, 1966; Сухарева, 1980). Сведения об образовании нередуцированных (диплоидных) гамет у полиплоидных представителей рода *Fragaria* достаточно многочисленны. Нередукция гамет у земляники играет очень важную роль в эволюции рода, поскольку формирование полиплоидных видов достигается за счет функционирования нередуцированных гамет (Сухарева, 1984). Почти во всех работах, посвященных межвидовой гибридизации земляник, описаны случаи появления матроморфного (партеногенетического происхождения) потомства и N-гибридов, возникновение которых может быть объяснено участием одной или обеих гамет, обладающих диплоидным для родительских форм числом хромосом (Петров, Сухарева, 1983). Если для полиплоидных видов *Fragaria* формирование и функционирование нередуцированных гамет уже не вызывает сомнения, то для диплоидных видов такие случаи описаны единично (Федорова, 1935; Schiemann, 1937) и требуют дальнейшего изучения.

В природных популяциях диплоидного вида *Fragaria vesca* L. в благоприятных условиях опыления и оплодотворения у преимущественно реализуется половой (зиготический) способ развития семян посредством двойного оплодотворения (Фадеева, 1966; Батуринов, 2007). Сведения о развитии и участии в оплодотворении  $2n$  гамет приводятся лишь в работах по межвидовой гибридизации земляник с участием *F. vesca* в качестве материнского родителя. Так, в скрещиваниях *F. vesca* ( $2x$ )  $\times$  *F. moschata* ( $6x$ ) получены преимущественно пентаплоидные гибриды ( $5x$ ), которые могли возникнуть лишь при участии в оплодотворении нередуцированных женских гамет со стороны *F. vesca* (Федорова, 1935; Schiemann, 1937).

Наряду с зиготическим способом формирования семян (посредством двойного оплодотворения) у *F. vesca* имеет место апозиготический способ развития семян в форме диплоидного партеногенеза. Первые убедительные сведения о проявлении агамоспермии псевдогамного типа у *F. vesca* ( $2x$ ) приводятся в работе Е.М. East (1930). Им в гетероплоидном межвидовом скрещивании *F. vesca* ( $2x$ )  $\times$  *F. virginiana* ( $8x$ ) было получено 24 диплоидных растения матроморфного типа, происхождение которых он объяснил индуцированным партеногенезом гаплоидной яйцеклетки с последующим удвоением числа хромосом на первых этапах эмбриогенеза. S.H. Yarnell (1931) предположил возникновение диплоидных матроморфных сеянцев во внутривидовых аутбредных скрещиваниях *F. vesca* за счет функционирования одной из форм псевдогамии. Т.С. Фадеева (1966), склонна считать реализацию агамоспермии у *F. vesca* в форме индуцированного диплоидного партеногенеза, т. е. благодаря развитию нередуцированных женских гамет – яйцеклеток. Такого же мнения придерживается и автор данной статьи (Батуринов, 2007). Цель данного исследования – оценить проявление нередукции гамет в половом процессе диплоидного вида *F. vesca* в естественных популяциях, посредством анализа возникновения матроморфных сеянцев, а также N-гибридов.

#### **Материал и методы**

В качестве материала исследования были использованы образцы лесной земляники *Fragaria vesca* L. ( $2n=2x=14$ ), относящихся к евроазиатскому подвиду *F. vesca* ssp. *vesca*, из коллекции земляник лаборатории популяционной генетики растений

ИЦиГ СО РАН. Образцы, использованные в эксперименте, имели следующее происхождение: № 69-1 - дикорастущий образец, собранный в окрестностях г. Мукачево (Закарпатье); № 98-2 - образец взят из естественного фитоценоза ленточного соснового бора на берегу Бердского залива Искитимского района Новосибирской области; № 03/С-1-10 - выделен из семян, собранных в дикорастущей популяции в Маслянинском р-не, Новосибирской области, урочище Гы-Чи, юго-западный склон горы в пойме р. Бердь; № 01-10 – дикорастущий образец из поймы реки Суенга Маслянинского района Новосибирской области; № 97-1 - дикорастущий образец, собранный в Хакасии, Красноярского края; № 13 – сорт Белая альпийская; №№ 96-1, 96-2, 96-3, 96-4, 96-5, 96-6 - дикорастущие образцы, собранные на расстоянии не менее 500 м один от другого в окрестностях с. Барановка, Кемеровского района, Кемеровской области. Растения сорта "Александрия" выращены из семян, приобретенных в розничной торговле.

Для кастрации использовали цветки в состоянии нераскрытого бутона. Кастрацию производили пинцетом, соцветия изолировали пищевым целлофаном с прокладкой слоя ваты у основания цветоноса, что исключает возможность проникновения пыльцы извне благодаря насекомым-опылителям. Контролем качества изоляции служили неопыленные изолированные соцветия. Пыльцу для аутбредных скрещиваний выделяли из нераскрытого бутона, подсушивали при комнатной температуре без доступа прямых солнечных лучей. Опыление производили мягкой кисточкой однократно.

Индукцию агамоспермии проводили, используя чужеродное опыление кастрированных и изолированных цветков. В качестве пыльцевого партнера использовали пыльцу *Potentilla anserina* L., выделенную из раскрывшихся бутонов, подсушенную при температуре 20-22°C без доступа прямых солнечных лучей. Для идентификации сеянцев партеногенетического происхождения использовали цитологический и биоморфологический анализы потомства. Подсчет числа хромосом образцов проводили в клетках корневых меристем на «давленных» препаратах при помощи микроскопа «Axiostar plus» при увеличении 10×1.25×100. Перед фиксацией материал предварительно обрабатывали 0,1% раствором колхицина (2 часа), затем раствором 8-оксихинолина (3 часа), фиксировали ацетоалкоголем (3:1), окрашивали ацетокармином в течение суток в холодильнике (Bringham, Senanayake, 1966).

### **Результаты и обсуждение**

*Проявление нередукации гамет при апозиготическом способе семенной репродукции.*

Агамоспермия в виде диплоидного партеногенеза обусловлена формированием и развитием нередуцированных гамет. В нашем эксперименте по изучению проявления агамоспермии у *F. vesca* были использованы в качестве материнских растений рецессивные дигомозиготы по маркерным признакам «S - тип плодоношения» и «R - тип побегообразования» из семенного потомства сорта «Александрия». Этот сорт и подобные ему сорта ремонтантной диплоидной земляники выделены из альпийских популяций *F. vesca ssp. vesca* в результате длительного селекционного процесса. Хорошая скрещиваемость сорта Александрия с образцами *F. vesca* сибирского происхождения указывает на их таксономическую близость и принадлежность к одному виду.

Предварительно кастрированные и изолированные цветки растений сорта «Александрия» были опылены различными образцами *F. vesca* сибирского происхождения – доминантными гомозиготами. Их доминантное состояние по маркерным признакам предварительно было подтверждено в результате анализа их потомства от самоопыления. Результаты таких аутбредных скрещиваний (*ssrr* × *SSRR*) представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Проявление агамоспермии у *F. vesca* при аутбридинге

Комбинация скрещивания	Распределение фенотипов в семенном потомстве		
	"длинностолонный, неремонтантный"* (генотип <i>SsRr</i> )	"короткостолонный, ремонтантный"** (генотип <i>ssrr</i> )	партеногенетических семян, %
Александрия № 69-1 ×	117	13	10,0
Александрия № 96-1 ×	41	5	10,9
Александрия № 97-1 ×	15	4	21,0

Примечание: \* - ожидаемый фенотип (гибрид); \*\* - материнский фенотип (партеногенетический потомок).

В семенном потомстве, полученном от таких скрещиваний, мы ожидали получить 100% семян гибридного фенотипа, исходя из менделеевских закономерностей моногенного наследования маркерных признаков, т.е. все семена ( $F_1$ ) должны быть неремонтантными и формирующими длинные наземные столоны-усы (генотип *SsRr*). Однако в семьях, наряду с ожидаемыми семенами гибридного фенотипа, зарегистрированы матроморфные семена с  $2n=14$  (до 21,0%), сохранившие материнский фенотип - ремонтантный и короткостолонный (часто называемый «безусый»).

Поскольку появление матроморфных семян отмечено в аутбредном потомстве рецессивных гомозигот *F. vesca* культурного происхождения, в данном случае сорта "Александрия", была предпринята попытка оценить возможность проявления агамоспермии среди дикорастущих образцов из сибирского региона при помощи индуцированного партеногенеза (табл. 2).

Таблица 2.

Результаты индукции агамоспермии при помощи чужеродного опыления у дикорастущих образцов *F. vesca* сибирского происхождения

Материнская форма	Высажено семян, шт.	Получено ПС*	Среднее число ПС на 100 семян
№ 96-1	923	41	4,4
№ 96-2	9	2	2,2
№ 96-3	154	18	11,7
№ 96-4	50	3	6,0
№ 96-5	51	2	3,9
№ 96-6	130	6	4,6
№ 97-1	745	24	3,2

Примечание: ПС\* - партеногенетический сеянец.

Все полученные матроморфные семена имели число хромосом свойственное материнскому ( $2n=14$ ) и сохраняли основные признаки материнского фенотипа. Опыт показал, что образцы *F. vesca* сибирского происхождения, как и растения сорта «Александрия», также могут формировать матроморфные семена путем партеногенетического развития нередуцированных женских гамет - яйцеклеток. Причем тенденция к партеногенетическому развитию нередуцированных женских

гамет проявляется различно среди образцов, варьируя от 2,2 до 11,7 партеногенетических семян на 100 развившихся семян.

#### *Участие нередуцированных гамет в двойном оплодотворении*

Об участии нередуцированных гамет в процессе сингамии у *F. vesca* судили по возникновению семян с триплоидным числом хромосом ( $2n=3x=21$ ). Среди 130 дикорастущих образцов *F. vesca*, собранных в сибирском регионе в местах естественного произрастания, обнаружен лишь один образец (№ 98-2) с триплоидным числом хромосом. Растения произрастали на обочине лесной дороги в ленточном сосновом бору и занимали площадь около 8 м<sup>2</sup>. У растений данного образца, произраставших в естественном фитоценозе, плодов с семенами на засохших цветоносах мы не обнаружили, тогда как при его культивировании на экспериментальном участке, развивались единичные семечки на недоразвитых плодах. Еще один триплоидный образец *F. vesca* № 03/С-1-10 выращен из семян, собранных на юго-западном склоне горы в пойме реки Бердь в Маслянинском р-не, Новосибирской области. У этого образца также развиваются единичные семена в условиях культивирования на экспериментальном участке. Обсуждая происхождение этих двух образцов, невозможно однозначно утверждать, какие именно нередуцированные гаметы приняли участие в оплодотворении – женские или мужские. Исходя из данных опыта по индукции агамоспермии при помощи чужеродного опыления, можно предположить, что именно яйцеклетки – гаметы с нередуцированным числом хромосом, которые в дальнейшем были оплодотворены гаплоидными спермиями.

#### **Выводы**

1. Среди популяций *Fragaria vesca*, произрастающих в сибирском регионе, обнаружен клон с триплоидным числом хромосом – результат участия в сингамии нередуцированной гаметы.

2. Проращивание семян, развившихся в условиях естественного произрастания популяции, выявило сеянец с триплоидным числом хромосом.

3. Возникновение партеногенетических семян (до 21,0%) с диплоидным числом хромосом в благоприятных условиях опыления и оплодотворения (внутривидовые скрещивания) свидетельствует о регулярном формировании в семечках нередуцированных женских гамет.

4. Эволюционное значение нередукиции женских гамет для *F. vesca* состоит как в образовании N-гибридов (триплоидов) – проявлении геномной изменчивости, так и в способности в неблагоприятных условиях опыления поддерживать семенную продуктивность за счет диплоидного партеногенеза.

#### **Литература**

1. Батурич С.О. Индукция диплоидного партеногенеза у *Fragaria vesca* L. // Сибирский экологический журнал. – 2007. - № 6. - С. 987-991.
2. Петров Д.Ф., Сухарева Н.Б. Отдаленная гибридизация и апомиксис в роде *Fragaria* и их значение для селекции земляники в Сибири // Сельскохозяйственная биология. - 1983. – № 2. – С. 59–65.
3. Сухарева Н.Б. Эволюционное значение нередукиции гамет у *Fragaria* / В кн.: Индуцированный мутагенез и апомиксис. - Новосибирск. - 1980. - С. 204-210.
4. Фадеева Т.С. Проблемы сравнительной генетики растений. Сообщение I. Принципы геномного анализа (на примере рода *Fragaria*) // Генетика. - 1966. - Т.2. - № 1. - С. 12-28.
5. Федорова Н.Я. Межвидовая и внутривидовая гибридизация земляники и ее значение для селекции // Социалистическое растениеводство. – 1935. - № 15. – С. 101-110.
6. Bringham R.S., Senanayake Y.D.A. The evolutionary significance of natural *Fragaria chiloensis* × *F. vesca* hybrids resulting from unreduced gametes // Amer. J. Bot. - 1966. - Vol. 53. - P. 1000-1006.

7. East E. M. The production of homozygotes through induced parthenogenesis. // Science. - 1930. - V. 72. - № 1858. - P. 148-149.
8. Schiemann E. *Artkreuzungen bei Fragaria*.-Z. f. Induct. Abstammungs und Vererbungslehre. – 1937. - Bd 73. - H 2. - S. 375-390.
9. Yarnell S.H. Genetics and cytological studies on *Fragaria* // Genetics. - 1931. - № 16. - P. 422- 454.

### Резюме

В сибирских дикорастущих популяциях *Fragaria vesca* регулярно формируются нередуцированные женские гаметы. В результате участия в половом процессе таких гамет либо возникают N-гибриды (триплоиды), либо диплоидные потомки партеногенетического происхождения. Эволюционное значение нередукции женских гамет состоит в формировании геномной изменчивости, а также реализации страховочного механизма семяобразования.

Unreduced female gametes regularly develops in Siberian wild populations of *Fragaria vesca*. Participation of such gametes at sexual reproduction leads to development of N-hybrids – double fertilization, or to development of parthenogenetic diploid seedlings (single fertilization - pseudogamy). An evolution significance of unreduced female gametes consists in formation of genomic variety, and at the same time at additional mechanism of seed formation.

### ВЕРГОЛЯС М. Р., ГОНЧАРУК В. В.

*Інститут колоїдної хімії і хімії води ім.А.В.Думанського НАН України, Україна, 03680, Київ, бульв. акад. Вернадського, 42e-mail: [vergolyas@meta.ua](mailto:vergolyas@meta.ua)*

## ВИКОРИСТАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ БІОМАРКЕРІВ НА РИБАХ ДЛЯ ОЦІНКИ АНТРОПОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ МОРСЬКИХ ПРІСНИХ ВОД

Виявлення забруднення морських та прісних вод у результаті антропогенної дії, що посилюється, є одним з актуальних завдань нашого часу. Риби є одним з найбільш зручних об'єктів для дослідження впливу антропогенних забруднювачів водного середовища, оскільки вони зазвичай реагують на токсиканти подібно до вищих хребетних, і можуть бути використані для виявлення речовин, що потенційно викликають токсичний або канцерогенний ефекти у людини. Окрім вивчення загального токсичного впливу на біоту, риби можуть стати модельним об'єктом для виявлення потенційного генотоксичного впливу шкідливих речовин, присутніх у водному середовищі.

Для виконання поставлених завдань використовували стандартизовані методи дослідження токсичності, модифікований метод дослідження генотоксичності - мікроядерний тест. Мікроядерний тест на клітинах риб успішно використовується як метод дослідження генотоксичності водних розчинів різних класів сполук *in vivo*, так і для моніторингу хімічного забруднення води *in situ* [2].

Збільшення числа клітин з мікроядрами та з патологіями поділу, як правило, супроводжується пригніченням мітотичної активності. Це може бути зумовлено зниженою життєздатністю клітин з мікроядрами [1, 3]. Так, було показано, що при високих концентраціях токсичних сполук порушується лінійний характер залежності кількості мікроядер від дози мутагену. Токсичні дози можуть призвести до інгібування поділу клітин та їх загибелі поряд із зменшенням кількості клітин з мікроядрами [4].