

ГАПЛОИДИЯ У ТОМАТА

Шмыкова Н.А.

ГНУ Всероссийский НИИ селекции и семеноводства
овощных культур

Россия, 143080, Московская область,

п. ВНИИССОК, тел. (495) 599-24-42

E-mail: vniissok@mail.ru



В статье рассматривается перспектива создания гомозиготных линий томата через гаплоиды. Гаплоиды могут быть получены как из клеток женского, так и мужского гаметофита. Обсуждаются достижения в области гаплоидии томата, полученные за последние 40 лет, отражены успехи и проблемы получения дигаплоидов через андрогенез и гиногенез.

Ключевые слова: томат, гаплоиды, гиногенез, андрогенез.

Томат является наиболее распространенной овощной культурой во всём мире (Anonimous, 2004). В производстве преобладают гибриды F_1 , имеющие высокую урожайность, устойчивость к болезням и неблагоприятным условиям. Процесс создания гибридов F_1 длительный и трудоёмкий, что делает гибридные семена дорогостоящими. На создание линии требуется несколько лет, наименьшее количество инбредных поколений у самоопыляемых культур составляет 5-7 (Ellialtioglu et al., 2001). В настоящее время развиваются альтернативные методы ускоренного получения гомозиготных линий через гаплоиды. Гаплоиды могут быть получены как из клеток женского, так и мужского гаметофитов, соответственно через культуру неопыленных семян и культуру пыльников и микроспор. Обычно различают: **андрогенез** – получение гаплоидных растений на искусственных питательных средах из изолированных пыльников, микроспор; **гиногенез** – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семян. После удвоения числа хромосом гаплоиды становятся 100% гомозиготными формами и могут быть использованы непосредственно как родительские линии в производстве гибридов.

Сегодня накоплена большая информация в области генетики, физиологии и биохимии томата, он используется как модельное растение в цитологических и цитогенетических исследованиях, составлены его генетические карты и разработаны молекулярные маркерные системы

(Foolad, 2007). Производство гаплоидов томата может значительно облегчить фундаментальные исследования и ускорить селекционный процесс. Для получения гаплоидов томата разрабатываются различные методы.

Гиногенез

Получение гаплоидных растений в культуре *in vitro* неопыленных семян является результатом перехода клеток зародышевого мешка с гаметофитного пути развития на спорофитный с образованием из них эмбрионов или морфогенного каллуса. Однако первые гаплоидные растения томата сорта Мэрглоуб были получены задолго до начала развития биотехнологии растительных клеток и тканей – в 1930 году за счет партеногенетического развития яйцеклетки (Morrison, 1932; Cook, 1936). Lindstrom E.W. с коллегой (1931) провели цитогенетическое исследование гаплоидной формы томата и её диплоидного и тетраплоидного потомства. В 1957 году гаплоидные растения томата были получены от опыления гибрида F_1 (сорт Бизон х сорт Штамбовый Алпатьева) пыльцой сорта Бизон, облученной рентгеновскими лучами (500 p). Из 8964 растений выделено 56 с 12 хромосомами (Кириллова, Богданова, 1978). В 2001 году появились сообщения о цитогенетическом исследовании гаплоидов томата сорта Микадо, полученных в Саратовском Государственном Университете. Автором было показано, что доза генов не сказывается на проявлении качественных признаков (габитусе ку-

ста, маркерных признаках: форме листа, окраске плода), но в значительной мере определяет количественные, такие как число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, размеры листьев, количество компонентов цветка, пыльцевых зерен в цветке (Иванова, 2001). Использование метода индукции партеногенеза через опыление облученной пылью успешно применяется в настоящее время и на других овощных культурах, например у огурца (Truong-Andre, 1988; Sauton, 1989; Przyborowski, Niemirowicz-Czeczutt, 1994; Caglar, Abak, 1996). Однако, в исследованиях, проведенных в Турции, этот метод положительных результатов не дал. Для опыления цветков нескольких сортов томата использовалась пыльца, облученная 1000 и 800 Gys, и только при опылении пылью облученной 800 Gys происходило успешное развитие пыльцевых трубок и вход их в семязачатки, но развитие гаплоидного эмбриона было прервано на очень ранних стадиях (Bal, Abak, 2007).

Наряду с опылением облученной пылью для индукции гиногенеза часто используется опыление чужеродной пылью, которая способна прорасти на рыльце пестика, а пыльцевые трубки достигать семязачатки, но оплодотворение не должно происходить. У томата рядом исследователей для этой цели использовалась пыльца *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Chambonnet, 1996; Bal, Abak, 2003 a). Chambonnet (1996) сообщил о получении 8 фертильных растений, имеющих главным образом 24 хромосомы, но в некоторых клетках было по 12 хромосом. В исследованиях других авто-

ров, проведенных *in vitro*, при опылении культурных сортов томата пыльцой *S. sisymbriifolium* пыльцевая трубка достигала яйцеклетки через 24 часа после опыления, и было получено несколько плодов (Bal, Abak, 2003 а). Часть плодов не содержала семян, в других имелись семечки, из которых при культивировании *in vitro* образовались растения-регенеранты. Сеянцы достигли 10 см в высоту. При подсчете хромосом в клетках кончиков корней выявлено 24, 25, 26 хромосом. Однако растения не были выращены, и дальнейшая информация о них отсутствует. Авторы предполагают, что они были удвоенными гаплоидами.

Число работ по культивированию завязей *in vitro* ограничено, полученные в них результаты противоречивы. В одних исследованиях показано, что происходит образование каллуса из соматических тканей, который препятствует развитию семечек (San, Gelebart, 1986). В других работах предполагается, что успех в культуре семечек возможен (Bal, Abak, 2003). Для подавления каллусообразования из стенок завязей семечки культивировали на среде с добавлением маннита вместо сахарозы. Предкультивирование было выполнено при 10°C в темноте в течение семи дней на 1/2 среды MS, содержащей регуляторы роста и аминокислоты. Впоследствии завязи были культивированы на среде NLN с гидролизатом казеина. Во время культивирования каллус из тканей стенок завязи не развивался, стенки разрушались, семечки становились видимыми. Семечки были двух типов: шаровидные с круглыми контурами и почти прямоугольные. Гистологический анализ показал наличие массы клеток внутри зародышевого мешка, которая напоминала глобулярные эмбриониды. Хотя дальнейшее развитие их не происходило, деление клеток зародышевого мешка прослеживалось.

Анализ немногочисленных сообщений показал, что методы индукции гиногенеза у томата недостаточно разработаны и получение дигаплоидов с использованием этого метода возможно.

Андрогенез

Число и возможности индукции эмбриогенеза из микроспор томата ограничены, а полученные результаты далеки от тех, которые известны для табака и рапса. Первые сообщения об андрогенезе у томата, появились в 1972 году, спустя почти десятилетие после первых положительных результатов культивирования пыльников (Guha, Maheshwari, 1964). Было предложено несколько вариантов питательных сред для культивирования пыльников томата, которые затем часто применялись в подобных экспериментах (Gresshoff, Doy,

1972). В первом сообщении (Sharp et al., 1971; 1972) использовали не культуру пыльников непосредственно а, точнее, ткани пыльников служили для поддержания микроспор, – так называемая «культура няньки». Микроспоры были помещены на бумажные фильтровальные диски, лежащие на неповрежденных пыльниках, культивируемых на агаризованной среде. Эти авторы первыми сообщили о получении каллуса и корней, образовавшихся из него, в культуре пыльников. Позже в последующих исследованиях, индуцируя андрогенез в культуре пыльников и микроспор, также получали каллус, реже побеги, которые погибали на ранних стадиях развития (Debergh, Nitsch, 1973; Нгуен, Шамина, 1978; Cheyah et al., 1990; Jaramillo, Summer, 1990, 1991; Summer et al., 1992). Некоторые авторы сообщали о получении не гаплоидных растений, а растений с более высокой ploидностью, то есть 2n, 4n. Однако в ряде экспериментов у растений-регенерантов наблюдали проявление рецессивного маркера (tf), что указывает их гаплоидное происхождение (Ziv et al., 1982, 1984).

Известно, что на индукцию андрогенеза влияет целый ряд факторов. Наиболее значимым у томата является генотип растения (Gresshoff и Doy 1972; Chlyah, Taarji, 1984). Использование в эксперименте мужских стерильных линий позволило получить растения-регенеранты (Zamer et al., 1980). Изучение влияния таких факторов, как состав питательных сред, тип желирующих веществ, темнота, освещенность, предобработки, стадии развития, проводились в многочисленных экспериментах по культивированию пыльников томата (Jaramillo, Summers, 1990, 1991; Summers et al., 1992; Ozzambak, Atasayar 1994; Paksoy, Abak, 1994; Brasileiro et al., 1999). Однако при использовании этого метода было получено лишь несколько растений-регенерантов (Ancora et al., 1977; Zamir et al., 1980; Ziv et al., 1984). Наиболее полное и всестороннее исследование факторов, влияющих на андрогенез, было исследовано в работах болгарских ученых, ими были получены в культуре пыльников многочисленные растения-регенеранты (Zagorska et al., 1998; 2004). Наименьшее число работ посвящено культуре микроспор томата (Yinnan et al., 1999; Bal, Abak, 2005).

Факторы, влияющие на результативность культуры пыльников *in vitro*

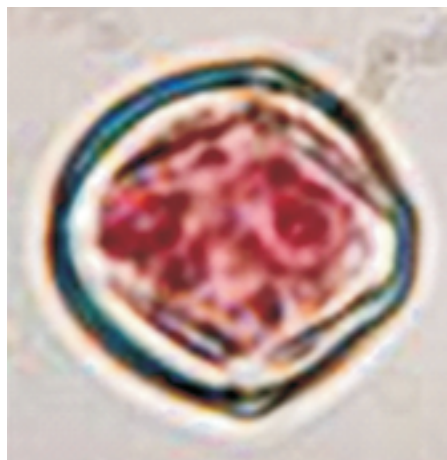
Регенерация растений в культуре пыльников томата зависит от различных факторов, взаимодействующих друг с другом. Генотип – один из важных факторов, определяющий ответ пыльника на состав питательной среды и условий предобработки. Zagorska с коллегами (1998) нашли, что из 80 проверенных культурных сортов томата,

53 были отзывчивы, у них происходило каллусообразование, но только маленькая доля была способна дифференцироваться и развиваться в растения-регенеранты. Однако культурные сорта, несущие ген *ms 1035* мужской стерильности, могли образовывать каллус, сопровождающийся органоогенезом и регенерацией. Ранее, путем воздействия на микроспоры, находящиеся на необходимой стадии развития, был продемонстрирован высокий уровень индукции каллуса от пыльников мужских стерильных линий, несущих ген *ms 1035* (Zamer et al., 1980). Это исследование показало, что из четырех протестированных культурных сортов и селекционных линий одна фертильная линия продуцировала каллус с очень низкой частотой – 0,7%, тогда как изогенные стерильные линии образовывали каллус до 37,7%. Другие авторы наблюдали каллусообразование только у трех культурных сортов, а побеги – у одного из 43 протестированных (Gresshoff, Doy 1972).

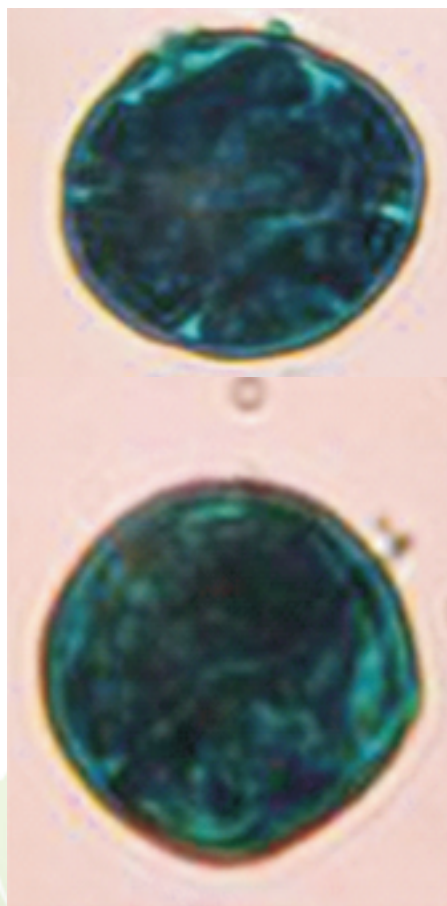
Вторым значимым фактором для индукции андрогенеза является стадия развития микроспор, на которой происходит культивирование пыльников или микроспор. У большинства видов растений период отзывчивости микроспоры к индукции андрогенеза соответствует переходу от стадии вакуолизированной микроспоры к ранней двухклеточной пыльце, то есть это период накануне и после первого пыльцевого митоза (Hause et al., 1993; Reynolds, 1997; Binarova et al, 1997). В большинстве цитируемых работ для культивируемых *in vitro* пыльников томата характерным является образование каллуса с последующей регенерацией растений, что не дает четкого ответа о его происхождении. Информация, накопленная в мировой практике за последние 35 лет, противоречива. Первоначально ряд исследователей указывали на отзывчивость пыльников, содержащих мейоциты (Gresshoff, Doy, 1972; Zamer et al., 1980). В прошлом десятилетии появилось несколько работ, где указывается, что критический период совпадает с мейотическим развитием и тетрадами (Summens et al., 1992; Shtereva et al., 1998; Brasileiro et al., 1999). В более поздних работах внесено уточнение, что этот период находится между метафазой I и телофазой II (Sequi-Simarro, Nuez, 2005). Подтверждением этому может служить способность к каллусообразованию пыльников стерильных линий с геном 1035 (Zagorska et al., 1998).

Однако существуют и другие мнения, например, стадия молодых микроспор (Levenko et al., 1977; Gulshan, Sharma, 1981), последняя стадия вакуолизированных микроспор (Нгуен, Шамина, 1978; Evans et al., 1989; Yinnan et al., 1999; Bal, Abak, 2005;). Наши исследования (Шмыкова, 2006), проведенные на сорте Грунтовый Грибовский 1180, показали, что у томата образованию эмбриогенной пыльцы предшествуют отклонения от нормы в

асимметричном митозе, происходит замена его на симметричное деление (рис. 1), при этом из каждой клетки может развиваться эмбриогенная структура. В случае асимметричного митоза и образования двухклеточной пыльцы, на ранних этапах также возможен переход на спорофитный путь развития (рис. 1).



А



Б

Рис.1. Образование эмбриоидов в пыльниках томата (сорт Грунтовый Грибовский), культивируемых *in vitro*, из микроспор, находящихся на поздних стадиях развития:
А – равный тип деления; Б – неравный тип деления

Аналогичные изменения в культуре пыльников этого же сорта наблюдали другие исследователи: эмбриоиды развивались до стадии 20-32 клеток, после чего процесс останавливался (Нгуен, Шамина, 1978). В другом эксперименте при культивировании пыльников с микроспорами на поздней вакуолизированной стадии были получены гаплоидные растения межвидового гибрида *L. esculentum* x *L. pennellii* (Evans et al., 1989). Однако наряду с вышеописанными изменениями в культивируемых *in vitro* пыльниках томата мы прослеживали дополнительные деления микроспор в тетрадах (рис. 2) в пыльниках сорта Грунтовый Грибовский 1180 (Шмыкова, 2006).

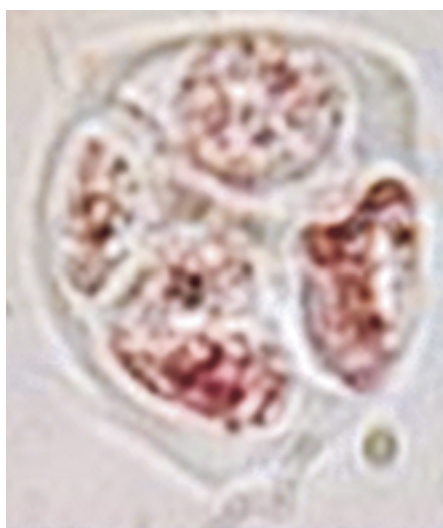
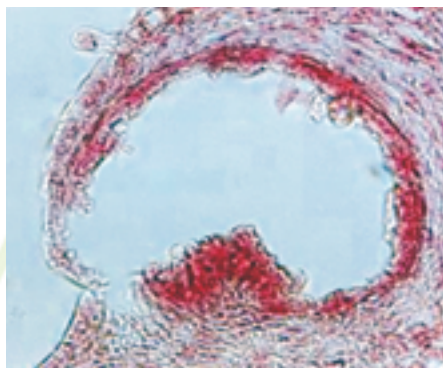
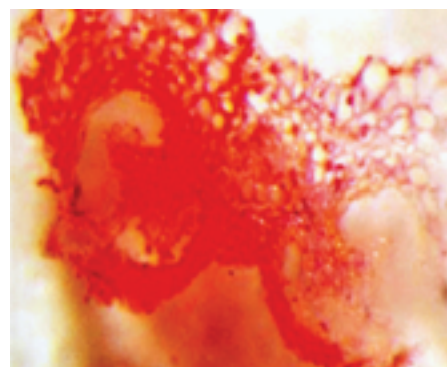


Рис.2. Деление микроспоры в тетраде в период культивирования пыльника томата (сорт Грунтовый Грибовский) *in vitro*

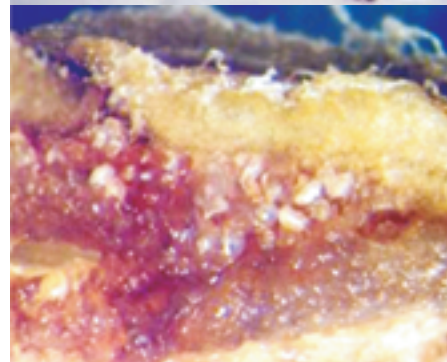
Каллус также может развиваться из соматических клеток стенок пыльника (рис. 3). В этом процессе могут участвовать клетки средних слоев, эндотеция и связника, которые сохраняются мало измененными на протяжении всего периода микроспорогенеза (Шмыкова, 2006).



А



Б



В

Рис. 3. Образование каллуса из соматических клеток стенок пыльника томата:
А – поперечный срез пыльника до культивирования *in vitro*; Б – поперечный срез пыльника, культивируемого *in vitro*; В – каллус, образовавшийся на поверхности культивированных *in vitro* пыльников

В большинстве случаев андрогенез индуцируется путем воздействия различными физическими или химическими факторами до культивирования или в период культивирования. Для томата используют чаще два типа предобработок: первая – пониженными температурами, вторая – повышенными. Chlyah и Taarji (1984) показали, что холодовые предобработки в течение 24 часов до культивирования или после культивирования вызвали каллусообразование 48,5% и 44,5 % соответственно. В контроле каллус развивался у 37% пыльников. Побегообразование ни в одном из вариантов не наблюдалось. Shtereva с коллегами (1998) исследовали эффект предобра-

боток температурой 4, 7, 10 и 35°C различной продолжительностью воздействия. Evans с коллегами (1989) рекомендуют соцветие инкубировать в течение 2-6 суток при температуре 3...5°C, а пыльники культивировать при 34...38°C в течение 7-9 суток в темноте и только затем при 22°C с фотопериодом 12-18 часов. Нгуен и Шамина (1978) перед культивированием пыльников помещали бутон томата на 12 часов в холодильник при температуре 4°C. Bal и Abak (2005) предкультивировали бутоны на среде с маннитом при температуре 10°C.

Много исследований в культуре пыльников томата было сфокусировано на основных компонентах питательных сред, использовались различные варианты макро- и микроэлементов и регуляторов роста (Gresshof, Doy 1972; Sharp et al., 1972; Debergh, Nitsch, 1973). Для индукции андрогенеза в пыльниках томата использовались питательные среды разного состава. В первоначальных протоколах чаще всего упоминаются три основных питательных среды DBM I, DBM II и DBM III с различными концентрациями НУК и кинетина (Gresshof, Doy 1972). При испытании 7 вариантов сред, каллусообразование наблюдалось на среде DBM I с 2 мг/л НУК и 5 мг/л кинетина и DBM II с 2 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина. DBM среды в дальнейшем включались в эксперименты по культивированию пыльников томата целым рядом других исследователей (Нгуен, Шамина, 1978; Chlyah, Taarji, 1984; Jaramillo, Summers, 1990; 1991; Summers et al., 1992). Напротив, Zamir с коллегами (1980) использовал MS среду

(Murashige, Skoog, 1962) с 1-2% сахарозы, 0,8 % агара, pH 5,8, а в качестве регуляторов роста – зеатин 0,25мг/л и ИУК 0,5 мг/л. При этом было выявлено, что линии с мужской стерильностью образуют каллус у 30 % культивируемых пыльников. Evans с коллегами (1989) рекомендуют на начальных этапах использовать среду типа Sibi (Sibi et al., 1979) с 7-12 % сахарозой, с 5×10^{-8} – 5×10^{-9} М 2,4Д и 5×10^{-8} – 5×10^{-9} М цитокинина с последующим переносом на среду с 3% сахарозой 5×10^{-7} – 5×10^{-8} М цитокинина. В исследованиях других авторов было протестировано 20 вариантов сред, содержащих питательные вещества по прописи MS (Murashige, Skoog, 1962), Ls (Linsmaier, Skoog, 1965) и Нича (Nitsch, 1969) с различным сочетанием регуляторов роста (Shtereva et al., 1998). Они выявили, что две среды MS, содержащие 2 мг/л 2ip и 2 мг/л ИУК, или 0,5 мг/л зеатина и 0,5 мг/л ИУК, показали лучшие результаты индукции каллуса из пыльников томата. Исследования проводили на линиях с мужской стерильностью и фертильных. Было показано, что среда MS-1 наиболее благоприятна для индукции каллуса, доля пыльников образующих каллус была на 10% выше, чем MS-2. Однако регенерация растений и развитие побегов и листьев были выше на среде MS-2. Число хромосом у регенерантов изменялось от 12 до 36 (Zagorska et al, 1998; 2004).

Результативность использования культуры пыльников томата далека от удовлетворения производства гаплоидов, а получаемые результаты часто вызывают сомнения по поводу происхождения растений-регенерантов. В этом

случае более перспективной и надежной является культура микроспор. Фактически еще в первых работах Sharp с коллегами (1972) культивировали микроспоры, а сам пыльник служил культурой-нянькой. Не смотря на то, что ими был получен каллус, в дальнейшем этот способ использовался крайне редко (Debergh, Nitsch, 1973; Varshese, Yadav, 1986; Yinnan et al., 1999; Bal, Abak, 2005). Yinnan с коллегами (1999) сообщили о развитии глобулярных и сердцевидных эмбриоидов из изолированных микроспор, культивируемых на среде NLN (Lichter, 1981), содержащей гидролизаты казеина и лактоальбумина. В качестве предобработки бутоны были инокулированы на среде с маннитом (среда голодания) и инкубированы в темноте при 10°C в течение 7 дней. Однако гаплоидные растения не были получены.

Используемые приемы в технике культивирования пыльников не дают однозначных удовлетворительных результатов и вряд ли это возможно, так как соматические ткани пыльников у томата способны к образованию каллуса на протяжении всего периода микроспорогенеза (Шмыкова, 2006), поэтому использование культуры микроспор может оказаться более плодотворным.

Заключение

Несмотря на экономическую значимость томата, исследования в области получения гаплоидов у этой культуры заслуживают намного большего внимания, чем это происходит на практике.

