


Пятая международная научная конференция PlantGen2019

## Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров

М.Ф. Санамьян , Ш.У. Бобохужаев

Национальный университет Узбекистана им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

 e-mail: sanam\_marina@rambler.ru

Отсутствие четких морфологических маркеров хромосом хлопчатника способствовало разработке нетрадиционного метода маркировки хромосом с помощью транслокаций. Тестерные транслокационные линии хлопчатника на сегодняшний день представляют собой наиболее полный набор цитологических маркеров. Приведены результаты цитогенетического анализа гибридов  $F_1$ , полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника с транслокационными линиями с идентифицированными хромосомами. Цитогенетическая идентификация и нумерация унивалентных хромосом у 25 моносомных линий цитогенетической коллекции Национального университета Узбекистана позволила установить, что четыре моносомные линии имеют унивалентные хромосомы по хромосоме 2, 15 линий – по хромосоме 4, четыре линии – по хромосоме 6, одна линия – по хромосоме 7 субгенома  $A_t$  и одна линия – по хромосоме 18 субгенома  $D_t$  хлопчатника. Остальная 21 линия была дубликатом трех негомологичных хромосом. Все идентифицированные моносомные линии характеризовались различиями в размерах унивалентов, величине мейотического индекса, числа тетрад с микроядрами, фертильности пыльцы, частоты воспроизводства моносомного состояния в потомстве и комплекса морфологических признаков, ассоциированных с моносомией по идентифицированной хромосоме. Несмотря на различия в генотипической среде и методах получения моносомиков в двух коллекциях хлопчатника, наблюдается удивительное совпадение данных по большей частоте появления моносомиков по хромосомам 2, 4 и 6, тогда как моносомики по другим хромосомам набора появляются с куда меньшей частотой, а по восьми негомологичным хромосомам (5, 8, 13 субгенома  $A_t$  и 14, 15, 19, 22 и 24 субгенома  $D_t$ ) вообще никогда не выявляются.


Ключевые слова: хлопчатник; *Gossypium hirsutum* L.; цитогенетический анализ; транслокационные линии; моносомные линии; идентификация хромосом.

**Для цитирования:** Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У. Идентификация унивалентных хромосом у моносомных линий хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. с помощью цитогенетических маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557

## Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers

M.F. Sanamyan , Sh.U. Bobokhujayev

National University of Uzbekistan named after M. Ulugbek, Tashkent, Uzbekistan

 e-mail: sanam\_marina@rambler.ru

The lack of clear morphological markers of cotton chromosomes contributed to the development of an unconventional method for marking chromosomes using translocations. Today, tester translocation cotton lines represent the most complete set of cytological markers. The results of cytogenetic analysis of  $F_1$  hybrids obtained from crosses of monosomic cotton lines with translocation lines with identified chromosomes are presented. Cytogenetic identification and numbering of univalent chromosomes in 25 monosomic lines of the cytogenetic collection of the National University of Uzbekistan allowed us to establish the following univalent occurrences: chromosome 2 in four monosomic lines, chromosome 4 in 15 lines, chromosome 6 in four lines, chromosome 7 of the  $A_t$ -subgenome in one line and chromosome 18 of the  $D_t$ -subgenome in one line. The remaining 21 lines were duplicates of three non-homologous chromosomes. All monosomic lines identified were characterized by differences in univalent sizes, meiotic index, number of tetrads with micronuclei, pollen fertility, frequency of monosomy in the progeny, and a complex of morphological characters associated with the monosomy of the chromosome identified. Despite differences in the genotypic environment and methods for producing monosomics in the two cotton collections, there is a surprising coincidence of data suggesting a higher frequency of chromosomes 2, 4 and 6 occurring as monosomics, while the other chromosomes of the set occur as monosomics at a much lower frequency, and eight

nonhomologous chromosomes (5, 8, 13 of the  $A_1$ -subgenome and 14, 15, 19, 22 and 24 of the  $D_1$ -subgenome of cotton) never do.

Key words: cotton; *Gossypium hirsutum* L.; cytogenetic analysis; cotton cytogenetics; monosomic lines; chromosome identification.

**For citation:** Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U. Identification of univalent chromosomes in monosomic lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by means of cytogenetic markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):836-845. DOI 10.18699/VJ19.557 (in Russian)

## Введение

Необходимость кариологического изучения культур, имеющих слабо морфологически дифференцированные хромосомы, способствовала разработке нетрадиционных методов маркировки хромосом с помощью транслокаций. Широкое распространение получили работы по созданию тестерных наборов транслокаций, которые были найдены у пяти видов растений: кукурузы (Burnham, 1954), ячменя (Burnham et al., 1954), гороха (Lamm, Miravalle, 1959), ржи (Sybenga, Wolters, 1972) и томата (Gill et al., 1980). Частично была решена проблема идентификации отдельных хромосом набора у таких видов, как конские бобы, фасоль и соя, благодаря созданию транслокационных линий по некоторым негомологичным хромосомам генома (Sjodin, 1971; Ashraf, Bassett, 1986; Mahama et al., 1999).

Как известно, культивируемый хлопчатник вида *Gossypium hirsutum* L. является аллотетраплоидом ( $2n = 52$ ) и включает два субгенома –  $A_1$  и  $D_1$ . M.S. Brown (1980) получила 62 транслокационные линии хлопчатника *G. hirsutum* с помощью X-,  $\gamma$ -, Бикини радиации и облучения быстрыми нейтронами семян или пыльцы различных сортов, а также нескольких линий. При этом в 58 линий было вовлечено две негомологичные хромосомы, в три линии – три хромосомы и в одну – четыре. Для идентификации и нумерации хромосом были проведены исследования по отнесению транслоцированных хромосом к субгеномам. В результате выяснилось, что хромосома 26 не была вовлечена ни в одну из транслокаций и определялась методом исключения, поскольку за все время исследований не удалось получить транслокацию с участием этой хромосомы (Stelly, 1993). Перечисленные транслокации составляют наиболее полный набор цитологических маркеров для изучения геномов хлопчатника (Menzel, Brown, 1978).

При идентификации мелких хромосом большие надежды были связаны с методом дифференциальной окраски, однако попытки получить дифференциальную исчерченность хромосом, достаточную для идентификации негомологичных хромосом, не привели к желаемому результату (Турков и др., 1980; Escalant, Schwendiman, 1984; Wang, 1985). Окраска прометафазных хромосом хлопчатника с помощью BrdU-Ноеchst-Giemsa и специальная система анализа позволили обнаружить от 2 до 9 главных блоков на хромосоме, которые соответствовали рано реплицирующейся ДНК (Muravenko et al., 1998; Муравенко, Зелен, 2009).

Культивируемый хлопчатник *G. hirsutum* толерантен к потере отдельных хромосом, поскольку является аллотетраплоидом. Однако создание серии моносомных линий в США, характеризующихся потерей отдельных хромосом ( $2n = 51$ ), растянулось на многие годы (Endrizzi, Brown, 1964; Endrizzi et al., 1985). Так, до 1985 г. в США были вы-

делены и идентифицированы моносомики лишь по 15 из 26 негомологичных хромосом *G. hirsutum*. На сегодняшний день в созданной в США цитогенетической коллекции хлопчатника отсутствуют любые виды нехваток по хромосомам 13, 19 и 24, тогда как по пяти негомологичным хромосомам (хромосомы 5, 8 субгенома  $A_1$  и 14, 15, 22 субгенома  $D_1$ ) имеются нехватки только отдельных плеч хромосом (Saha et al., 2012). Тем не менее это не мешает использовать их для хромосомной локализации маркерных генов и получения серии замещенных линий, которые создаются одновременно при участии трех тетраплоидных видов (Saha et al., 2004, 2006, 2013).

В Национальном университете Узбекистана в течение многих лет проводились исследования по индуцированию растений хлопчатника с хромосомными aberrациями с использованием различных методов индуцированного мутагенеза (Санамьян, 2003; Samanyan, Rakhmatullina, 2003). В результате была создана уникальная цитогенетическая коллекция хлопчатника, включающая моносомные, монотелодисомные и транслокационные линии, которая по числу линий занимает второе место в мире после аналогичной американской коллекции (Sanamyan et al., 2010, 2014).

Целью работы является унифицированная идентификация унивалентных хромосом у ранее полученных моносомных линий хлопчатника с помощью набора тестерных транслокационных линий хлопчатника с идентифицированными хромосомами.

## Материалы и методы

Материалом для исследований служили гибридные моносомные растения хлопчатника, полученные от скрещивания моносомных линий различного происхождения цитогенетической коллекции хлопчатника *G. hirsutum* Национального университета Узбекистана (НУУз) (Sanamyan et al., 2014) с транслокационными линиями с идентифицированными хромосомами американской цитогенетической коллекции (Stelly, 1993). Моносомные линии хлопчатника, за которыми ведутся наблюдения, круглогодично произрастают в пленочной теплице НУУз, где выполняются все агротехнические мероприятия. Цитогенетические маркеры в виде набора линий с идентифицированными транслокациями были любезно предоставлены профессором Техасского университета Дэвидом Стелли через ARS-USDA программу обмена.

В процессе цитологических анализов исследовали мейоз на стадии метафазы I (M1) в материнских клетках пыльцы (МКП). Для этого проводили фиксацию 2–3 мм бутонов в спирт-уксусной смеси (7:3). Затем МКП окрашивали железом-ацетокармином. На временных давленных препаратах под световым микроскопом анализировали

метафазы первого деления мейоза и учитывали характер конъюгации хромосом, число уни-, би-, три- и мультивалентов.

Все цитологические наблюдения проводили с помощью микроскопов Laboval, AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и Biomed (Leica, Швейцария) при увеличении объективов 10×, 100×, бинокулярной насадки 1.6× и GF 12.5 ×120 и окуляра 10×. Микрофотографирование выполняли с использованием цифровой фотокамеры Mikroskop-Kamera AxioCam ERc5s. При экспонировании применяли зеленый светофильтр ЗС-11-3. Фотографии растений и их частей сделаны цифровой фотокамерой Canon A-610.

### Результаты и обсуждение

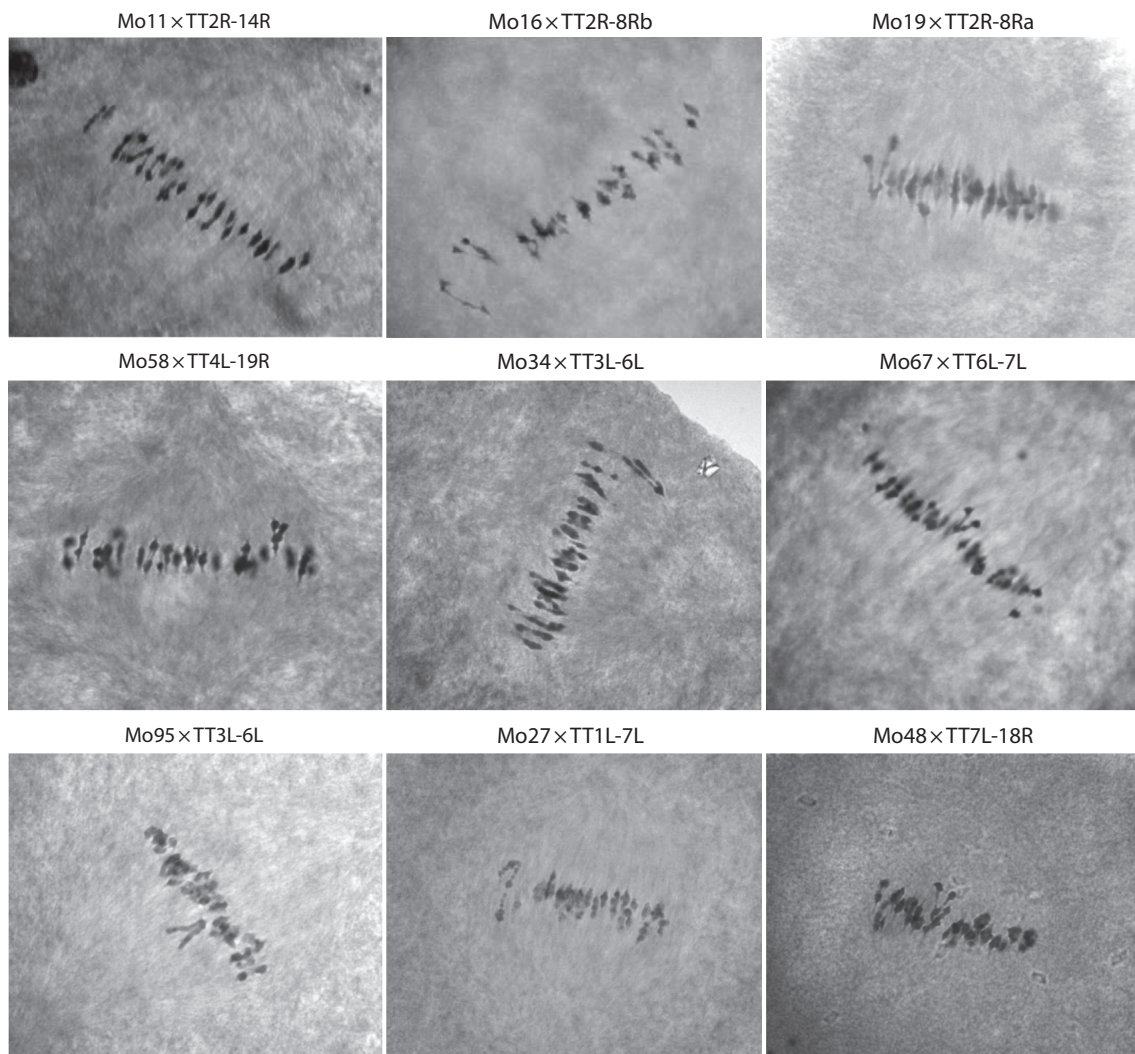
Цитогенетический анализ гибридов F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий хлопчатника с идентифицированными в соответствии с международной номенклатурой транслокационными линиями, позволил определить унивалентные хромосомы у моносомных линий цитогенетической коллекции хлопчатника НУУз. Известно, что выявление в материнских клетках пыльцы в метафазе I мейоза у гибридных транслокационных моносомиков квадριвалента и унивалента указывает на негомологичность унивалента и хромосом, вовлеченных в транслокацию (Endrizzi, Brown, 1964). Если же в МКП у гибридных транслокационных моносомиков обнаруживаются триваленты, то говорят о гомологичности унивалента и одной из хромосом в транслокации. В этом случае проводят скрещивания моносомика с другими транслокационными линиями, у которых одна из хромосом в транслокациях была такая же, как и у первой линии. Анализ ассоциаций хромосом у моносомных гибридов позволяет идентифицировать унивалентную хромосому как специфическую хромосому набора.

Исследования проведены для всех гибридных потомств, полученных от скрещиваний моносомных и транслокационных линий хлопчатника с идентифицированными хромосомами. В таблицу по конъюгации хромосом мы включили только те варианты, у которых были обнаружены общие хромосомы (табл. 1).

В результате анализа моносомных линий хлопчатника с помощью серии транслокационных линий с идентифицированными хромосомами удалось идентифицировать унивалентные хромосомы у ряда линий. Так, установлена гомологичность унивалентных хромосом у четырех моносомных линий (Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93) и одной из транслоцированных хромосом в скрещиваниях с шестью транслокационными линиями – TT2L-6R, TT2L-3Lb, TT2R-3La, TT2R-8Ra, TT2R-8Rb и TT2R-14R, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент (рис. 1, см. табл. 1). В шести транслокационных линиях участвует одна общая хромосома 2, поэтому унивалентные хромосомы у моносомных линий Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93 являются хромосомой 2 субгенома A<sub>t</sub> хлопчатника, а перечисленные четыре моносомные линии – дубликатами. Молекулярно-генетический анализ четырех моносомных межвидовых гибридов F<sub>1</sub> с участием линий Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93 подтвердил эти данные (Санамьян и др., 2016).

**Таблица 1.** Цитогенетический анализ гибридов F<sub>1</sub>, полученных от скрещиваний моносомных линий с транслокационными линиями тестерного набора с гомологичными хромосомами

Субгеномная принадлежность	Хромосома	Гибридный вариант	
Субгеном A <sub>t</sub>	2	Mo11 × TT 2L-3Lb	
		Mo11 × TT 2R-3La	
		Mo11 × TT 2R-8Ra	
		Mo11 × TT 2R-8Rb	
		Mo11 × TT 2R-14R	
		Mo16 × TT 2L-3Lb	
		Mo16 × TT 2R-8Ra	
		Mo16 × TT 2R-8Rb	
		Mo16 × TT 2R-14R	
		Mo19 × TT 2L-6R	
		Mo19 × TT 2L-3Lb	
		Mo19 × TT 2R-8Ra	
		Mo19 × TT 2R-8Rb	
		Mo19 × TT 2R-14R	
		Mo93 × TT 2R-8Ra	
		Mo93 × TT 2R-8Rb	
		Mo93 × TT 2R-14R	
		4	Mo7 × TT 4L-19R
			Mo31 × TT 4L-19R
			Mo31 × TT 4R-15L
Mo38 × TT 4L-19R			
Mo58 × TT 4L-19R			
Mo59 × TT 4L-19R			
Mo60 × TT 4R-15L			
Mo69 × TT 4L-19R			
Mo70 × TT 4L-19R			
Mo70 × TT 4R-15L			
Mo71 × TT 4R-15L			
Mo72 × TT 4L-19R			
Mo72 × TT 4R-15L			
Mo73 × TT 4L-19R			
Mo73 × TT 4R-15L			
Mo75 × TT 4L-19R			
Mo75 × TT 4R-15L			
Mo76 × TT 4L-19R			
Mo76 × TT 4R-15L			
Mo81 × TT 4L-19R			
Mo89 × TT 4L-19R			
Mo89 × TT 4R-15L			
6	Mo13 × TT 3L-6L		
	Mo13 × TT 6L-7L		
	Mo13 × TT 6L-10R		
	Mo34 × TT 3L-6L		
	Mo34 × TT 6L-14L		
	Mo67 × TT 6L-7L		
	Mo95 × TT 3L-6L		
	Mo95 × TT 6L-10R		
7	Mo27 × TT 1L-7L		
	Mo27 × TT 7L-12R		
	Mo27 × TT 7R-11R		
	Mo27 × TT 7R-21R		
Субгеном D <sub>t</sub>	18	Mo48 × TT 7L-18R	



**Рис. 1.** Критические конфигурации хромосом ( $24^{II} + 1^{III}$ ) в метафазе I мейоза у гибридных моносомных растений, полученных от разных комбинаций скрещивания.

Растения исходных первичных моносомиков четырех линий хлопчатника, моносомных по хромосоме 2, были получены в результате опыления облученной пылью в дозах 10–25 Гр. Все они характеризовались средним размером унивалантов, высоким мейотическим индексом (от  $92.50 \pm 0.31$  до  $98.25 \pm 0.22$ ), повышенным числом тетрад с микроядрами (до  $3.00 \pm 0.20$  %) и высокой фертильностью пыльцы (от  $91.54 \pm 0.48$  до  $96.41 \pm 0.42$  %), а также сниженной частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 19.35 до 44.44 %) и сниженной частотой передачи  $n-1$  гамет. В потомстве моносомной линии Мо19 в одном случае отмечалось появление монотелодисомного растения, что свидетельствовало о неправильном (поперечном) делении центромеры униваланта у этой линии.

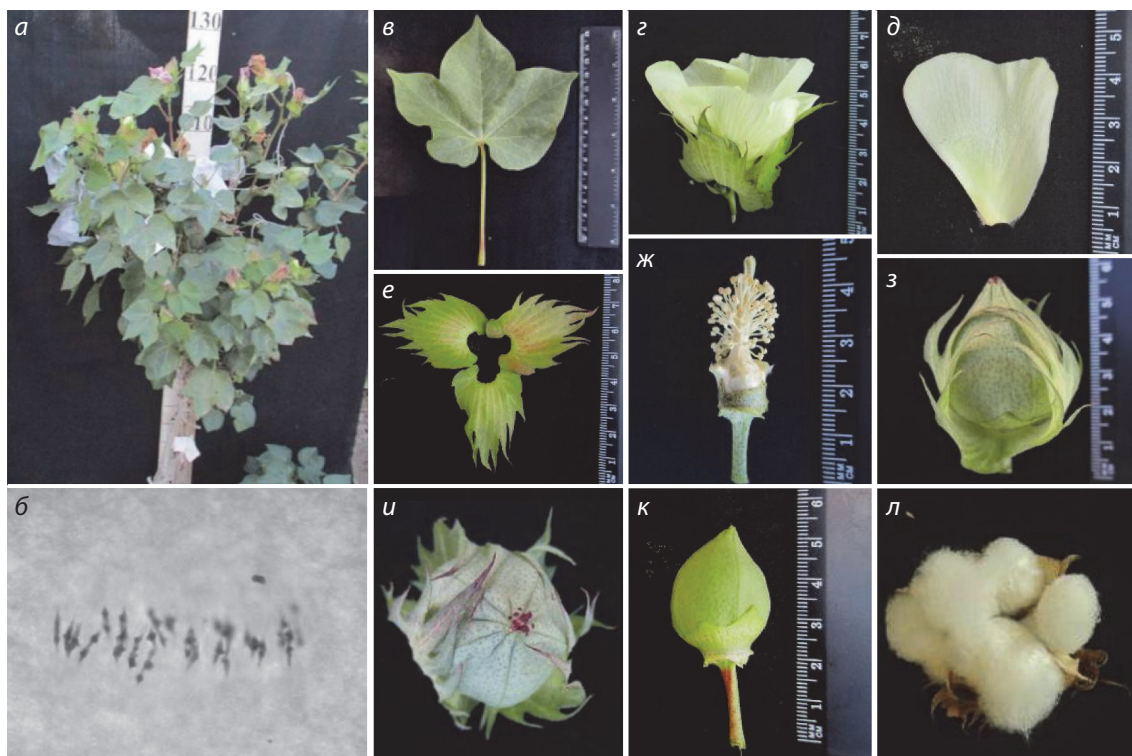
Моносомные линии по хромосоме 2 имели схожий набор характерных фенотипических признаков (табл. 2, рис. 2), отличались низкой завязываемостью семян (до 54.84 %) по сравнению с исходной инбредной линией Л-458 (89.81 %). Такое снижение завязываемости происходило за счет присутствия в коробочках моносомиков большого числа неоплодотворенных яйцеклеток в виде

улюков, наличие которых, наряду с уменьшением количества семян, приводило к уменьшению размеров коробочек.

При анализе гибридов  $F_1$ , полученных от скрещивания семи моносомных линий хлопчатника (Мо31, Мо70, Мо72, Мо73, Мо75, Мо76, Мо89) с двумя тестерными транслокационными линиями TT4L-19R и TT4R-15L, была установлена гомологичность унивалантов этих семи линий с одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента и один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). У тестерной линии TT4L-19R в транслокацию вовлечены хромосомы 4 и 19, а у линии TT4R-15L – хромосомы 4 и 15, т. е. одна из этих хромосом гомологична унивалантной хромосоме у семи исходных моносомных линий. Поскольку в обе транслокационные линии вовлечена хромосома 4, значит, унивалантные хромосомы у моносомных линий Мо31, Мо70, Мо72, Мо73, Мо75, Мо76, Мо89 представлены хромосомой 4 субгена  $A_1$  хлопчатника, а сами моносомные линии являются дубликатами. Это предположение подтвердилось при молекулярно-генетическом исследовании моносомных межвидовых гибридов  $F_1$  (Санамьян и др., 2016).

**Таблица 2.** Происхождение и некоторые особенности моносомных линий хлопчатника *G. hirsutum* L.

Моносомная линия	Происхождение	Год получения	Хромосома		Морфологические характеристики
			Размер	Идентичность	
Мо11	Облучение пыльцы	1991	Средний	A 2	Мелкий узкий лист, укороченные симподиальные ветви, маленькие круглые коробочки
Мо16		1991			
Мо19		1991			
Мо93		2007			
Мо7	Облучение пыльцы	1990	Средний	A 4	Густое пышное растение, удлиненные лопасти листа, длинные прицветники и цветоножки, удлиненные ребристые коробочки
Мо31		1993			
Мо38		1993			
Мо58		Десинапсис			
Мо59	1996				
Мо60	1996				
Мо69	1997				
Мо70	1997				
Мо71	1997				
Мо72	1997				
Мо73	1997				
Мо75	Облучение пыльцы	1999			
Мо76		2001			
Мо81		2003			
Мо89	Десинапсис	2003	Крупный	A 6	Укороченные симподии, жесткий стебель, маленькие круглые коробочки, позднее цветение
Мо13	Облучение пыльцы	1991			
Мо34		1993			
Мо67		Гетерозигота по транслокации			
Мо95	Облучение пыльцы	2012	Средний	A 7	Короткие симподии, толстые прицветники и листья, маленькая коробочка
Мо27	Облучение пыльцы	1993			
Мо48		1994	Мелкий	D 18	Маленькие листья, длинный столбик и рыльце, короткие симподии



**Рис. 2.** Особенности моносомных линий хлопчатника по хромосоме 2:

а – куст; б – конфигурации хромосом ( $25^{II}+1I$ ); в – лист; г – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.



**Рис. 3.** Особенности моносомных линий хлопчатника по хромосоме 4:

а – куст; б – конфигурации хромосом ( $25^{II}+1^I$ ); в – лист; г – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.

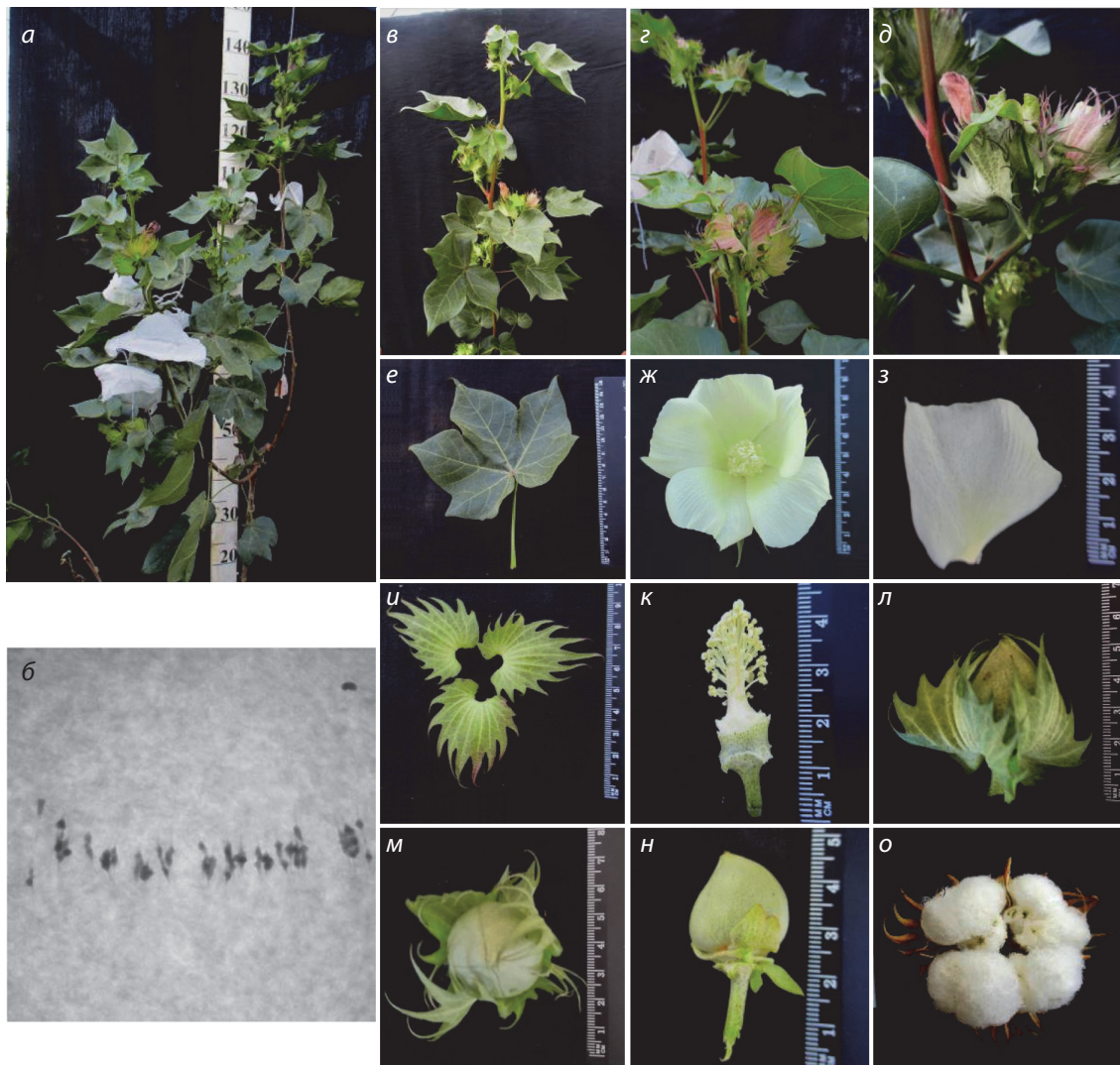
При изучении гибридов, полученных от скрещиваний восьми моносомных линий хлопчатника (Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81) с одной из двух транслокационных линий – ТТ4L-19R или ТТ4R-15L, была обнаружена гомологичность унивалентов указанных восьми линий с одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента плюс один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). У тестерной линии ТТ4L-19R в транслокацию вовлечены хромосомы 4 и 19, а у линии ТТ4R-15L – хромосомы 4 и 15. Одна из этих трех хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомных линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81. Можно предположить, что унивалентные хромосомы у линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81 представлены общей для них хромосомой 4 субгена  $A_1$  хлопчатника, а моносомные линии являются дубликатами. Окончательное цитологическое подтверждение будет получено после изучения гибридов от скрещиваний перечисленных восьми моносомных линий уже с другой (не рассмотренной здесь) транслокационной линией, вовлекшей хромосому 4. Однако локализация хромосом-специфичных SSR-маркеров на гибридах  $F_1$  с участием линий Мо7, Мо38, Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо71 и Мо81 подтвердила эти данные (Санамьян и др., 2016).

К сожалению, третья транслокационная линия тестерного набора – ТТ4L-5 – не могла быть использована в

исследовании по идентификации унивалентных хромосом вследствие обнаруженных нами сразу двух квадривалентов в «критических клетках», по-видимому из-за гомозиготности одновременно по двум транслокациям. Ранее M. Brown (1980) сообщала, что две или более цитологические аберрации присутствовали у исходных растений десяти из 62 транслокационных линий хлопчатника *G. hirsutum*, однако в дальнейшем у этих линий была получена только одна транслокация в гомозиготном состоянии.

Исходные растения шести моносомных линий хлопчатника (Мо7, Мо31, Мо38, Мо75, Мо76, Мо81) с нехваткой по хромосоме 4 были получены в результате опыления облученной пылью в дозе 10–25 Гр, тогда как исходные растения девяти моносомных линий (Мо58, Мо59, Мо60, Мо69, Мо70, Мо71, Мо72, Мо73, Мо89) обнаружены в потомствах десинаптических растений. Все вышеперечисленные линии характеризовались средним размером унивалентов, высоким мейотическим индексом (от  $90.50 \pm 0.72$  до  $98.46 \pm 0.20$ ), небольшим числом тетрад с микроядрами (до  $2.07 \pm 0.14$  %) и высокой фертильностью пыльцы (от  $90.67 \pm 0.88$  до  $97.53 \pm 0.35$  %), а также сниженной частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 16.67 до 42.86 %), что приводило к снижению частоты передачи гапло-дефицитных гамет.

Моносомные линии по хромосоме 4 имели схожие фенотипические отличия, резко выделяющие их среди других моносомных линий (рис. 3, см. табл. 2). Также они отличались более высокой завязываемостью семян



**Рис. 4.** Особенности моносомных линий хлопчатника по хромосоме 6:

а – куст; б – конфигурации хромосом ( $25^{II} + 1^I$ ); в–д – части стебля; е – лист; ж – цветок; з – лепесток; и – прицветники; к – тычиночная колонка; л, м – зеленые коробочки; н – коробочка с плодоножкой; о – раскрывшаяся коробочка.

(до 72.22 %), за исключением моносомной линии Мо76 (32.61 %).

При исследовании четырех моносомных линий хлопчатника (Мо13, Мо34, Мо67, Мо95) с помощью транслокационных линий ТТ3L-6L, ТТ6L-7L, ТТ6L-10R, ТТ6L-14L была установлена гомологичность унивалентных хромосом у моносомных линий и одной из транслоцированных хромосом в вышеперечисленных транслокациях, поскольку у моносомных транслокационных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалось 24 бивалента и один тривалент (см. табл. 1, рис. 1). В четырех транслокационных линиях участвует одна общая хромосома 6, поэтому унивалентные хромосомы у моносомных линий Мо13, Мо34, Мо67, Мо95 являются хромосомой 6 субгенома  $A_1$  хлопчатника, а сами моносомные линии – дубликатами. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов  $F_1$  с участием моносомных линий Мо13, Мо34, Мо67, Мо95 подтвердил эти данные (Санамьян и др., 2016).

Исходные растения трех моносомных линий хлопчатника (Мо13, Мо34, Мо95) с нехваткой по хромосоме 6 были

получены в результате опыления облученной пылью в дозе 20–25 Гр, тогда как исходное растение моносомной линии Мо67 обнаружено в потомстве растения, гетерозиготного по транслокации с десинаптическим эффектом. Все эти линии отличались крупным размером унивалента, высоким мейотическим индексом (от  $94.13 \pm 0.38$  до  $96.82 \pm 0.49$ ), небольшим числом тетрад с микроядрами (до  $2.07 \pm 0.23$  %), сниженной фертильностью пыльцы (от  $88.46 \pm 1.28$  до  $94.34 \pm 0.51$  %) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (от 9.38 до 14.29 %), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет.

Моносомные линии с нехваткой хромосомы 6 характеризовались целым комплексом морфологических признаков, ассоциированных с моносомией по этой хромосоме (рис. 4, см. табл. 2), а также более низкой завязываемостью семян (от 38.78 до 57.45 %) по сравнению с линией Л-458.

При исследовании моносомной линии Мо27 в четырех вариантах скрещиваний – Мо27 × ТТ1L-7L, Мо27 × ТТ7L-12R, Мо27 × ТТ7R-11R и Мо27 × ТТ7R-21R – была



**Рис. 5.** Особенности моносомной линии хлопчатника по хромосоме 7:

а – куст; б – конфигурации хромосом ( $25n + 1$ ); в – часть стебля; г – лист; д – цветок; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з, и – зеленые коробочки; к – коробочка с плодоножкой; л – раскрывшаяся коробочка.

обнаружена гомологичность унивалентной хромосомы Мо27 и одной из транслоцированных хромосом, поскольку у моносомных гибридов в метафазе I мейоза наблюдалась конъюгация хромосом в виде 24 бивалентов и одного тривалента (см. рис. 1). У тестерной линии ТТ1L-7L в транслокацию вовлечены хромосомы 1 и 7, у ТТ7L-12R – хромосомы 7 и 12, у ТТ7R-11R – хромосомы 7 и 11, а у линии ТТ7R-21R – хромосомы 7 и 21. Одна из этих хромосом гомологична унивалентной хромосоме у моносомной линии Мо27. Поскольку общая для четырех транслокационных линий – это хромосома 7, то унивалентная хромосома у моносомной линии Мо27 является хромосомой 7 субгенома  $A_1$  хлопчатника.

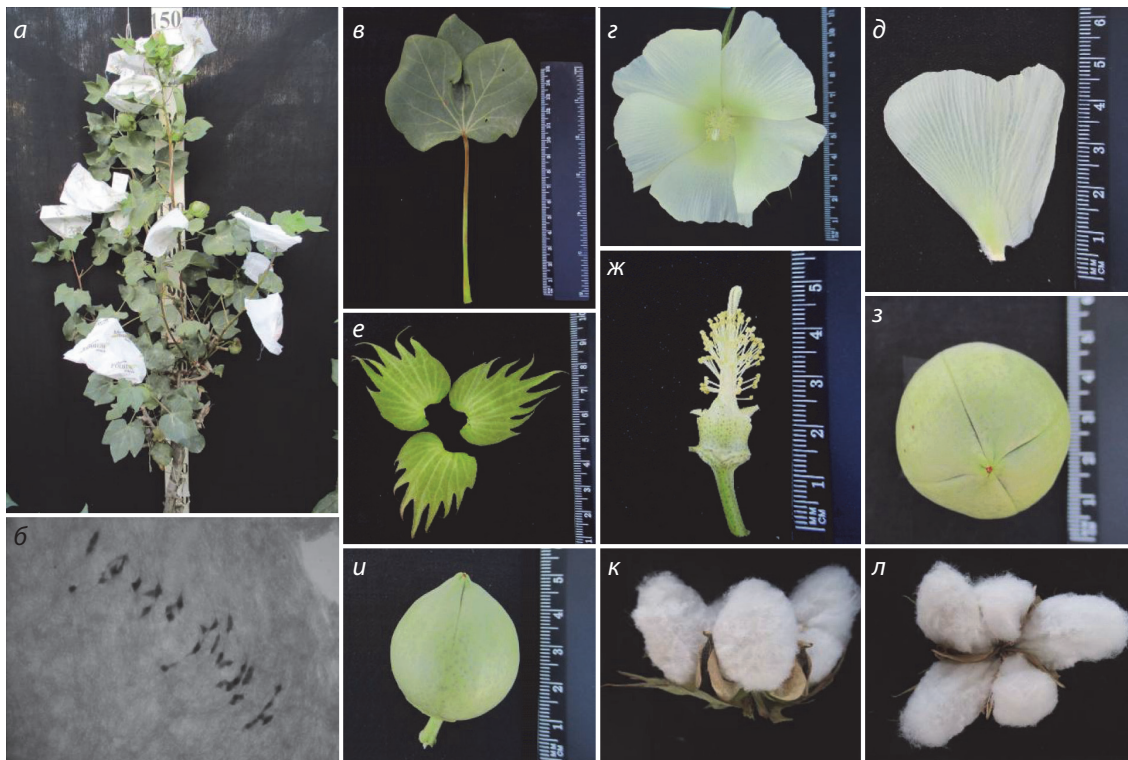
Исходное растение моносомной линии хлопчатника Мо27 с нехваткой по хромосоме 7 было получено в результате опыления облученной пыльцой в дозе 20 Гр. Эта линия характеризовалась средним размером унивалента, высоким мейотическим индексом ( $95.81 \pm 0.38$ ), небольшим числом тетрад с микроядрами ( $1.77 \pm 0.25\%$ ), сниженной фертильностью пыльцы ( $89.88 \pm 0.83\%$ ) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (22.23%), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет. Моносомная линия с нехваткой хромосомы 7 тоже отличалась комплексом морфологических признаков, ассоциированных с моносомией (рис. 5, см. табл. 2), и более низкой по сравнению с линией Л-458 завязываемостью семян (65.10%).

При исследовании моносомной линии Мо48 в варианте скрещивания с транслокационной линией ТТ7L-18R в

метафазе I мейоза были обнаружены 24 бивалента плюс один тривалент (см. рис. 1), который свидетельствовал о гомологичности унивалентной хромосомы у Мо48 и одной из транслоцированных хромосом у транслокационной линии Мо48. Поскольку в транслокацию тестерной линии ТТ7L-18R вовлечены хромосомы 7 и 18, можно предположить, что унивалентная хромосома моносомной линии Мо48 гомологична одной из двух хромосом. К сожалению, в тестерном наборе линий с идентифицированными хромосомами отсутствует вторая транслокационная линия, вовлекающая хромосому 18. Чтобы определить, какой из двух хромосом этой транслокации гомологична унивалентная хромосома моносомной линии Мо48, ранее мы использовали хромосом-специфичные микросателлитные SSR-маркеры, которые амплифицировали стандартным ПЦР-анализом. Молекулярно-генетический анализ моносомного межвидового гибрида  $F_1$  (Мо48  $\times$  Pima 3-79) выявил присутствие полиморфных аллелей только от вида *G. barbadense* L., что указало на локализацию хромосом-специфичного SSR-маркера – BNL3280 – у вышеназванного гибрида (Санамьян и др., 2016). Ранее этот маркер был локализован на хромосоме 18 субгенома  $D_1$  хлопчатника, поэтому можно считать, что линия Мо48 коллекции НУУз имеет моносомию по хромосоме 18 субгенома  $D_1$ .

Исходное растение моносомной линии хлопчатника Мо48 с нехваткой по хромосоме 18 было получено в результате опыления облученной пыльцой в дозе 25 Гр. Линия характеризовалась мелким размером унивалента, высоким мейотическим индексом ( $95.68 \pm 0.50$ ), неболь-





**Рис. 6.** Особенности моносомной линии хлопчатника по хромосоме 18:

а – куст; б – конфигурации хромосом ( $25n+1$ ); в – лист; з – цветок; д – лепесток; е – прицветники; ж – тычиночная колонка; з – зеленая коробочка; и – коробочка с плодоножкой; к, л – раскрывшаяся коробочка.

шим числом тетрад с микроядрами ( $0.86 \pm 0.26$  %), высокой фертильностью пыльцы ( $95.23 \pm 0.74$  %) и низкой частотой воспроизводства моносомного состояния в потомстве (18.19 %), что значительно снижало частоту передачи гапло-дефицитных гамет. Моносомная линия с нехваткой хромосомы 18 имела набор морфологических признаков, ассоциированных с моносомией (рис. 6, см. табл. 2), а также отличалась высокой завязываемостью семян (85.64 %).

### Заключение

Благодаря использованию транслокационных линий с идентифицированными хромосомами стало возможным привести нумерацию унивалентных хромосом у моносомных линий нашей коллекции в соответствие с общепризнанной номенклатурой. Цитогенетическая идентификация и нумерация унивалентных хромосом у 25 моносомных линий цитогенетической коллекции НУУз позволила установить, что четыре моносомные линии имеют унивалентные хромосомы по хромосоме 2, 15 линий – по хромосоме 4, четыре линии – по хромосоме 6, одна линия – по хромосоме 7 субгена  $A_1$  и одна линия – по хромосоме 18 субгена  $D_1$  хлопчатника. Большинство моносомных линий выявлено по наиболее часто регистрируемым моносомикам хлопчатника – хромосомам 2, 4 и 6.

При сравнительном анализе первых 20 идентифицированных моносомиков хлопчатника, полученных в США, обнаружены сходные тенденции, поскольку в результате исследования было выявлено семь моносомиков по хро-

мосоме 2, семь – по хромосоме 4, три – по хромосоме 6 и по одному – по хромосомам 1, 17 и 18 (Brown, Endrizzi, 1964). Сходство данных, полученных при исследовании разных коллекций, указывает, несмотря на различия в генотипической среде и методах получения моносомиков, на удивительное совпадение данных у хлопчатника по большей частоте появления моносомиков именно по хромосомам 2, 4 и 6, тогда как моносомики по другим хромосомам набора появляются с куда меньшей частотой, а по восьми негомологичным хромосомам (5, 8, 13 субгена  $A_1$  и 14, 15, 19, 22 и 24 субгена  $D_1$ ) вообще никогда не выявлялись (Saha et al., 2012). По-видимому, центромерные районы определенных хромосом подвержены более частой поломке и геном в целом остается толерантен к потере больших  $A_1$ -субгеномных хромосом без явного эффекта на жизнеспособность и фертильность, тогда как хромосомы некоторых мелких  $D_1$ -субгеномных хромосом вообще не подлежат каким-либо изменениям вследствие несовместимости с жизнеспособностью.

Сравнительный анализ цитогенетических особенностей моносомиков хлопчатника из двух коллекций не представляется возможным, поскольку в литературных источниках присутствуют лишь отрывочные сведения, касающиеся неправильного поперечного деления (misdivision) унивалентов и частоты воспроизводства моносомного состояния у некоторых моносомиков американской коллекции. Однако сложность создания серии моносомных линий у тетраплоидного хлопчатника и очевидность того, что определенные хромосомы субгена А чаще встречаются в моносомном состоянии, чем хромосомы субгена D,

не умаляют ценности проводимых работ ввиду необходимости дальнейшего развития молекулярно-генетических исследований и создания замещенных линий хлопчатника.

### Список литературы / References

- Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений. Генетика. 2009; 45(11):1516-1529.  
[Muravenko O.V., Zelenin A.V. The study of the chromosome organization of the genomes of small chromosome plants. Russ. J. Genet. 2009;45(11):1516-1529. DOI 10.1134/S1022795409110088.]
- Санамьян М.Ф. Оценка влияния облученной пыльцы на изменчивость кариотипа растений *M<sub>2</sub>* хлопчатника. Генетика. 2003; 39(8):1081-1090.  
[Sanamyan M.F. Evaluation of the effect of pollen irradiation on karyotype variability in *M<sub>2</sub>* cotton plants. Russ. J. Genet. 2003; 39(8):909-916. DOI 10.1023/A:1025330823281.]
- Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахманов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum*) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):545-554. DOI 10.18699/VJ16.186.  
[Sanamyan M.F., Bobokhujayev Sh.U., Makamov A.X., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Y. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR-markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5): 643-652. DOI 10.18699/VJ16.186. (in Russian)]
- Турков В.Д., Шелепина Г.А., Шевчук Л.П., Кайседо П.Л. Кариологическое изучение хлопчатника *Gossypium herbaceum* L. методом монохромного и дифференциального окрашивания хромосом. Докл. АН СССР. 1980;4(255):992-995.  
[Turkov V.D., Shelepina G.A., Shevchuk L.P., Kaysedo P.L. Karyological study of cotton *Gossypium herbaceum* L. by monochrome and differential staining of chromosomes. Doklady AN SSSR = Reports of the USSR Academy of Sciences. 1980;4(255):992-995. (in Russian)]
- Ashraf M., Bassett M.J. Cytogenetic analysis of translocation heterozygosity in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Can. J. Genet. Cytol. 1986;28(4):574-580.
- Brown M.S. Identification of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by means of translocations. J. Hered. 1980;71(4):266-274.
- Brown M.S., Endrizzi J.E. The origin, fertility and transmission of monosomic in *Gossypium*. Am. J. Bot. 1964;51(1):108-115.
- Burnham C.R. Tester set of translocations. Maise Genet. Coop. Newsl. 1954;28:59-60.
- Burnham C.R., White F.H., Livers R. Chromosomal interchanges in barley. Cytologia. 1954;19:191-202.
- Endrizzi J.E., Brown M.S. Identification of monosomes for six chromosomes in *Gossypium hirsutum*. Am. J. Bot. 1964;51(2):117-120.
- Endrizzi J.E., Turcotte E.L., Kohel R.J. Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. Adv. Genet. 1985;23:271-375.
- Escalant J.V., Schwendiman J. Tentative de "banding" des chromosomes du cotonnier. Cot. Fib. Trop. 1984;39(2):9-14.
- Gill B.S., Burnham C.R., Stringam G.R., Stout J.T., Weinheimer W.H. Cytogenetic analysis of chromosomal translocations in the tomato: preferential breakage in heterochromatin. Can. J. Genet. Cytol. 1980;22(3):333-341.
- Lamm R., Miravalle R.J. A translocation tester set in *Pisum*. Hereditas. 1959;45:417-440.
- Mahama A.A., Deaderick L.M., Sadanaga K., Newhouse K.E., Palmer R.G. Cytogenetic analysis of translocations in *Soybean*. J. Hered. 1999;90(6):648-653.
- Menzel M.Y., Brown M.S. Genetic lengths and break points in twelve chromosomes of *Gossypium hirsutum* involved in ten reciprocal translocations. Genetics. 1978;88(3):541-558.
- Muravenko O.V., Fedotov A.R., Punina E.O., Fedotova L.I., Grif V.G., Zelenin A.V. Comparison of chromosome BrdU-Hoechst-Giemsa banding patterns of the *A<sub>1</sub>* and (*AD*)<sub>2</sub> genomes of cotton. Genome. 1998;41:616-625.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M. Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) × Hawaiian cotton (*G. tomentosum* Nutt. ex Seem.) *F<sub>1</sub>* hybrid hypoaneuploid chromosome substitution series. J. Cotton Sci. 2006;1:263-272.
- Saha S., Raska D.A., Stelly D.M., Manchali S., Gutierrez O.A. Hypoaneuploid chromosome substitution *F<sub>1</sub>* hybrids of *Gossypium hirsutum* L. × *G. mustelinum* Miers ex Watt. J. Cotton Sci. 2013;17: 102-114.
- Saha S., Stelly D.M., Raska D.A., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Makamov A., Gotmare V., Abdurakhmonov I.Y., Campbell B.T. Ch. 6. Chromosome substitutions lines: concept, development and utilization in the genetic improvement of Upland cotton. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). Plant Breeding. Croatia: In Tech, 2012:107-128.
- Saha S., Wu J., Jenkins J.N., McCarty J.C., Jr., Gutierrez O.A., Stelly D.M., Percy R.G., Raska D.A. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits. J. Cotton Sci. 2004;8:162-169.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J., Rakhmatullina E.M., Sharipova E. Ch. 10. Cytogenetic Collection of Uzbekistan. In: Abdurakhmonov I.Y. (Ed.). World Cotton Germplasm Resources. Croatia: In Tech, 2014:247-287. DOI 10.5772/58589.
- Sanamyan M.F., Petlyakova J.E., Sharipova E.A., Abdurakhmonov I.Y. Morphological characteristics and identification of new monosomic stocks for cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Adv. Biosci. Biotechnol. 2010;1:372-383.
- Sanamyan M.F., Rakhmatullina E.M. Cytogenetic analysis of translocations in cotton. Plant Breed. 2003;122:511-516.
- Sjödin J. Induced translocations in *Vicia faba* L. Hereditas. 1971;67: 155-180.
- Stelly D.M. Interfacing cytogenetics with the cotton genome mapping effort. In: Proc. of the Beltwide Cotton Conf. New Orleans, Louisiana, 10-14 January. 1993;1545-1550.
- Sybunga J., Wolters A.H.G. The classification of the chromosomes of rye (*Secale cereale* L.): a translocation tester set. Genetica. 1972; 43:453-464.
- Wang Y. A study on the Giemsa C-bands in the chromosomes of *Gossypium arboreum* L. Acta Genetica Sinica. 1985;12(4):285-288.

#### ORCID ID

M.F. Sanamyan orcid.org/0000-0003-1840-0240

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета по науке и технологиям и Министерства инноваций Республики Узбекистан, гранты Ф-5-31 и ОТ-А-КХ-2018-379.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.05.2019. После доработки 21.08.2019. Принята к публикации 22.08.2019.