

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ КАДРОВОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МОСКОВСКАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
имени К.А. ТИМИРЯЗЕВА

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

на тему: **Мейоз моносомно дополненной линии культурного
томата с хромосомой 2 *Solanum lycopersicoides***

Исполнитель: студент 505 группы
агрономического факультета

Князев Андрей Николаевич

Руководитель: доцент Соловьев А.А.

Москва 2003

<http://yadyra.ru>

Оглавление

Оглавление	2
Введение	3
1. Краткий литературный обзор	3
1.1. Биологические и морфологические особенности	3
1.2. Биосистематика томата	4
1.3. Использование анеуплоидов	6
1.3.1. Замещенные и дополненные линии	7
1.3.2. Краткая характеристика дополненных линий некоторых культур	8
1.4. Дополненные линии томата с хромосомами <i>S. lycopersicoides</i>	9
1.5. Мейоз у отдаленных гибридов и анеуплоидов	10
1.6. Пахитенный анализ	15
1.6.1. Характеристика пахитенных хромосом культурного томата	17
1.6.2. Характеристика пахитенных хромосом видов – сородичей культурного томата	22
2. Экспериментальная часть	23
2.1. Цель	23
2.2. Задачи	23
2.3. Материалы	23
2.4. Методы	24
2.5. Результаты	26
2.5.1. Анализ мейоза моносомно дополненной линии	26
2.5.2. Пахитенный анализ моносомно дополненной линии	32
Выводы	36
Список литературы	37

1.КРАТКИЙ ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биологические и морфологические особенности

Томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - травянистое растение, как правило, выращиваемое как однолетняя культура, но способное расти в течение нескольких лет.

Стебли томата сильно опушены, ветвление симподиальное. Различают следующие типы куста: индетерминантный и детерминантный. Существуют и промежуточные формы — полудетерминантные. Листья непарноперистые, рассеченные на доли, с более или менее морщинистой поверхностью.

Цветки собраны в соцветие завиток, называемое в практике кистью. Цветки обоеполые, каждый состоит из чашечки, венчика, тычинок и пестика. Чашечку образуют сросшиеся у основания чашелистики. У культурных форм томата венчик имеет пять и более лепестков, которые срастаются у основания, образуя короткую трубочку. Тычинки удлиненные, заостренные на конце и срастаются краями, образуя тычиночную трубку, окружающую пестик. У основания тычиночная трубка срастается с нижней частью лепестков, образуя короткую трубочку. Пыльцевые зерна различных сортов имеют округлую форму.

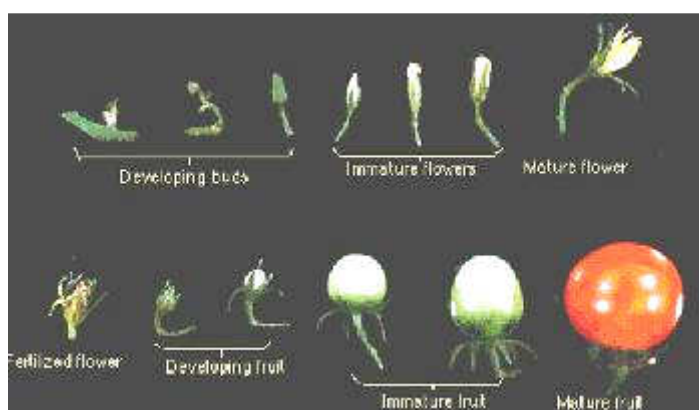


Рис. 1 Схема развития плода.

Плод - многогнездная многосемянная ягода. Размер и форма плодов зависят не только от сортовых различий, но в значительной и от условий

выращивания - на богатой влажной почве они более крупные и уплощенные, чем на бедной.

1.2 Биосистематика томата

В селекции культурного томата в основном используются виды рода *Lycopersicon*, которые относительно хорошо скрещиваются с культурным томатом.

Lycopersicon esculentum Mill. Благодаря своей ценности как сельскохозяйственной культуры этот вид широко распространен по всему миру. Первоначальное место доместикации этого вида точно не известно, хотя большинство фактов свидетельствует в пользу Мексики.

Все представители *Lycopersicon*, как правило, являются самосовместимыми. Именно поэтому в селекции культурного томата в основном используются виды рода *Lycopersicon*. Например, *L. chilense* является носителем генов устойчивости к ВТМ, возбудителям болезней увядания. *L. hirsutum* помимо устойчивости к ВТМ является носителем гена Cf-4 - устойчивости к кладоспориозу, генов устойчивости к альтернариозу и септориозу. Вид *L. chesmanii* содержит в плодах много витамина С и сахара. *L. humboldtii* был использован для создания сортов с высоким содержанием сухого вещества в плодах, а также является источником устойчивости к мозаике и фитофторозу. Однако большое значение в качестве источников ценных признаков имеют виды рода *Solanum* (Жученко, 1973; Гавриленко, 1999).

Solanum lycopersicoides Dup. Этот вид томата встречается в местах, расположенных на больших высотах в южной части Перу и на севере Чили, примерно на высоте 3000 м над уровнем моря.

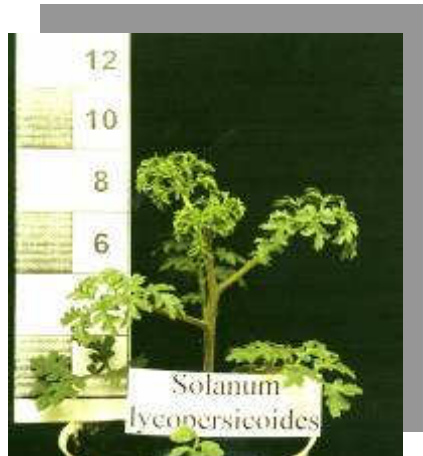


Рис. 2 Внешний вид *Solanum lycopersicoides*

Он занимает очень засушливые местообитания, кроме того переносит низкие температуры. Листья зубчатые, похожие на папоротник. Венчик ярко-желтый, но пыльники при созревании белые. Плоды *S. lycopersicoides* при созревании приобретают черную окраску.

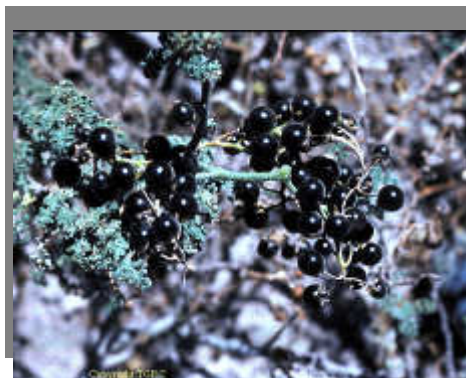


Рис. 3 Плоды *Solanum lycopersicoides*

S. lycopersicoides - единственный вид рода *Solanum*, который успешно скрещивается с томатом. Первые гибриды *L. esculentum* X *S. lycopersicoides* были получены методом эмбриокультуры, так как первоначально имелись трудности при проращивании мелких зрелых семян.

Одним из наиболее представляющих интерес для селекции томата признаков *S. lycopersicoides*, является холодостойкость. Кроме того, он обладает устойчивостью к некоторым болезням и вредителям.

Robinson, Phills (1977) сообщают, что как *S. lycopersicoides*, так и межродовой гибрид мощно растут и обильно цветут при +10°C, тогда как растения культурного томата в этих условиях были низкорослыми,

хлоротичными и формировали всего несколько стерильных цветков. В отношении этого вида также отмечается, что он обладает незначительной морозостойкостью (Robinson, Phills, 1977, - по Гавриленко, 1999). Стерильность межродового гибрида является проблемой при попытке переноса генов, отвечающих за ценные признаки.

Хотя *S. lycopersicoides* является самым отдаленным из родственных видов, которые скрещиваются половым путем с томатом, были получены и более отдаленные гибриды, но путем слияния протопластов, как, например томата и картофеля, и были успешно регенерированы гибридные растения (Melchers, Sacristan, Holder, 1978; Shepard et al., 1983, - по Гавриленко, 1999).

В то же время обсуждается проблема интрогрессии хозяйственно ценных признаков *S. etuberosum* в геном культурного томата путем получения межродовых соматических гибридов (Gavrilenko, 2001). Большинство отдаленных межродовых гибридов обладают низкой жизнеспособностью и высокой стерильностью. В связи с этим более продуктивным приемом в селекции культурного томата может быть широкое использование анеуплоидных растений, в том числе использование дополненных форм, отдельной (отдельными) хромосомой дикого вида.

1.3 Использование анеуплоидов

Анеуплоиды - организмы, имеющие в основном наборе увеличенное или уменьшенное, но не кратное гаплоидному число хромосом (Гуляев, 1984). К анеуплоидным организмам относят следующие клетки или организмы: моносомы ($2n-1$), нуллисомы ($2n-2$), трисомы ($2n+1$), тетрасомы ($2n+2$), двойные трисомы ($2n+1+1$) и т.д., а также организмы дополненные чужеродными хромосомами - моносомно дополненные (МДЛ) - с одной чужеродной хромосомой, или дисомно дополненные линии (ДДЛ) - с парой гомологичных хромосом от другого вида.

Анеуплоиды могут возникать спонтанно при неправильном расхождении хромосом во время деления клеток. В результате образуются

дочерние клетки с дупликациями или нехватками по отдельным хромосомам. При слиянии возникших на этой основе гамет получаются анеуплоидные организмы. При отдаленной гибридизации в результате нарушений мейоза частота анеуплоидов значительно выше.

Трисомики и моносомики разделяют на три группы: первичные, вторичные и третичные. Первичные трисомики - клетки или организмы, у которых добавочной хромосомой служит одна целая хромосома, имеющая гомологичную хромосому в гаплоидном наборе. Вторичные трисомики - добавочная хромосома у таких организмов состоит лишь из удвоенного плеча одной хромосомы, и эти одинаковые плечи расположены по обе стороны от центромеры. Такая хромосома называется еще изохромосомой. Третичные трисомики - добавочная хромосома состоит из двух разных плеч разных хромосом гаплоидного набора (Гуляев, 1984).

С помощью анеуплоидов можно решать такие недоступные ранее вопросы как: установление групп сцепления генов, локализацию генов в определенной хромосоме, осуществлять замещение одних хромосом другими и др.

1.3.1 Замещенные и дополненные линии

Замещенные линии - линии, у которых проведена замена какой-либо хромосомы одного сорта (вида) соответствующей хромосомой другого сорта (вида) (Гуляев, Мальченко, 1975).

Замещение хромосом проводится с двумя целями: во-первых, для того чтобы установить роль отдельных хромосом данного сорта (вида) при перенесении их в другой сорт (вид), что производится обычно с помощью моносомиков, и, во-вторых, для перенесения определенной хромосомы, обуславливающей болезнестойчивость или какой-либо другой ценный признак, сорту, обладающему другими нужными признаками. Так, например, в настоящее время создано и поддерживается более 60 замещенных линий мягкой пшеницы с хромосомами 14 видов трибы *Triticeae*.

К сожалению, замещенные линии, по сравнению с исходными сортами, менее урожайны, более позднеспелы, менее фертильны и т.д., поэтому они не могут быть сортами и чаще они являются источниками хозяйственно ценных свойств и признаков.

Дополненные линии - линии, имеющие в своем геноме чужеродную хромосому (хромосомы). В зависимости от количества чужеродных хромосом, перенесенных в геном, дополненные линии классифицируют как моносомно, дисомно, трисомно дополненные линии и т.д.

Дополненные линии получены у многих сельскохозяйственных культур — пшеницы, томатов, картофеля, риса и др. Как правило, большинство дополненных линий являются моносомными. Они имеют важное значение в изучении частной генетики культурных растений, а также их используют для передачи генов устойчивости к болезням из другого вида, создания хромосомных маркеров и конструирования геномных библиотек.

1.3.2 Краткая характеристика дополненных линий некоторых культур

У мягкой пшеницы известны моносомно ($2n=43$) и дисомно ($2n=44$) дополненные линии. Все они менее фертильны и плодовиты, чем исходные сорта, нередко имеют аномалии в развитии вегетативных и генеративных органов.

Добавление разных хромосом ржи, пырея, эгилопса, ячменя специфично меняет фенотип растения пшеницы: высоту растения, форму куста, тип колоса, устойчивость к заболеваниям, устойчивость к неблагоприятным условиям и другие свойства. Поэтому дополненные линии используют в геномно-хромосомном анализе для выяснения того, какие гены несут дополнительные чужеродные хромосомы и как они взаимодействуют с геномом пшеницы.

В 90-х годах в Японии были получены моносомно дополненные линии риса *Oriza sativa* с хромосомами *Oriza punctata*, которые были

идентифицированы с помощью гибридизации *in situ* и RFLP маркеров, а также моносомно дополненные линии *Oriza sativa* с хромосомами *Oriza officinalis*, которые передавали устойчивость к вирусам - RTBV и RTSV.

1.4 Дополненные линии томата с хромосомами *S. lycopersicoides*

Виды *Solanum lycopersicoides* и *Lycopersicon esculentum* хорошо скрещиваются, но практически невозможно получить плодовые гибриды, что связано с наличием барьеров несовместимости и стерильности.

Обычный способ получения моносомно дополненных линий - это половая гибридизация, получение амфидиплоидов и нестабильных гибридов (сесквидиплоидов) и возвратное скрещивание на диплоиды, который применяется для всех видов с половой совместимостью. Объединение хромосом более удаленных родственных видов и даже неродственных видов возможно путем слияния протопластов. Таким способом были получены дополненные линии *Lycopersicon peruvianum* с хромосомами от *Solanum tuberosum* и *Solanum tuberosum* с хромосомами от *L. esculentum*.

Дикие родственные виды культурного томата *L. esculentum* Mill, несут устойчивость к 42 болезням, к различным сосущим вредителям и абиотическим факторам. И немаловажно, что возможна интрогрессия ценных генов от всех 9 диких видов *Lycopersicon* через обычные скрещивания, хотя часто они сопровождаются определенными трудностями (Жученко, 1973)

Моносомно дополненные линии томата, которые получили Rick и Chetelat (1987) и были использованы в нашей работе, синтезировались следующим образом: гибриды F₁ между томатом и пасленом подвергали колхицинированию и полученный амфидиплоид скрещивали с культурным томатом, после чего тройной нестабильный гибрид (сесквидиплоид), чтобы преодолеть мужскую стерильность, скрещивали с так называемой линией - посредником. Линию-посредник получали путем многократного беккроссирования *L. pinellii* с культурным томатом, что и позволило синтезировать 11 дополненных линий (кроме 6-й хромосомы).

Следует сказать, что большая часть потомства от скрещиваний сесквидиплоидов с линиями посредниками, была диплоидной (58%), хотя значительной была и та часть растений, которая несла лишнюю хромосому от *S. lycopersicoides*. Частота переноса хромосом не константна и варьировала от 0% до 24% в зависимости от хромосомы (Chetelat and all, 1998).

В опытах с дополнением в геном картофеля *S. tuberosum* ($2n=4x=48$) хромосом *L. esculentum* RFLP-анализ показал дисомное дополнение 10-й хромосомой. GISH-окрашивание выявило, что наряду с 4-мя геномами картофеля имеются две чужеродные хромосомы томата, причем одна из них меньше другой. Конъюгация хромосом доказывает их гомологию. С использованием FISH обнаружены неизмененные субтеломерные и теломерные последовательности, при утрате интерстициального участка (Garriga-Caldere et al., 1999). Моносомно дополненные линии картофеля с 6-ой хромосомой томата использовались для определения местоположения и молекулярного размера теломерной повторности pAtT4 из *Arabidopsis thaliana* и томат специфичной теломерной повторности TGR1 (Hiaobo, Fransz, 1999).

1.5 Мейоз у отдаленных гибридов и анеуплоидов

Для мейоза характерна длительная и сложная профазы, которая в свою очередь подразделяется на ряд стадий. В лептотене хромосомы реплицированы, но имеют вид тонких, одиночных нитей, заполняющих все ядро. На стадии зиготены начинается конъюгация гомологичных хромосом и образуется синаптонемный комплекс. После окончания конъюгации хромосом в пахитене биваленты начинают утолщаться и укорачиваться. В пахитене каждой хромосоме присущи определенные размеры и расположения хромомер, что позволяет составлять цитологические карты и использовать их для генетического анализа. Синаптонемный комплекс (СК) в пахитене достигает наибольшего развития, и все его элементы становятся наиболее плотными. В диплотене гомологичные хромосомы, входящие в

бивалент, начинают расходиться в области центромер. По мере расхождения гомологов в бивалентах более четко проявляются хиазмы - места перекреста гомологичных хромосом, входящих в бивалент. В период расхождения гомологов СК исчезает из тех частей бивалента, где оно произошло, а сохраняется лишь там, где хромосомы удерживаются вместе. Эти места соответствуют хиазмам. На следующей стадии - диакинезе биваленты укорачиваются, число хиазм уменьшается. Ядерная оболочка еще сохраняется, но биваленты как правило теряют с ней связь. Так заканчивается профазы первого деления мейоза. Вслед за этим исчезают ядерная оболочка, ядрышко и начинается перемещение бивалентов в экваториальную плоскость клетки.

В метафазе-I появляется веретено, и каждый бивалент располагается в экваториальной зоне. Поскольку бивалент имеет две центромеры, то их ориентация отличается от метафазы митоза. Обе центромеры устанавливаются симметрично по отношению к экваториальной плоскости и направлены к разным полюсам. Центромерами хромосомы прикрепляются к веретену. На этом заканчивается подготовка хромосом к расхождению.

В анафазе-I гомологичные хромосомы расходятся к разным полюсам. Каждый бивалент после полного исчезновения хиазм распадается на две дихроматидные хромосомы, одна из которых идет к одному полюсу, другая — к противоположному. От каждой пары гомологов на полюсе оказывается по одной удвоенной хромосоме, а в совокупности - гаплоидное их число, то есть число хромосом уменьшается вдвое. В первом делении мейоза центромеры не делятся, как это было в митозе, поэтому каждая хромосома гаплоидного набора состоит из двух хроматид.

В телофазе-I формируется ядерная оболочка, но дихроматидные хромосомы не конденсируются. Образуются две клетки, ядра которых содержат вдвое меньше хромосом, чем ядро исходной клетки. Затем после непродолжительной подготовки к следующему делению, то есть интеркинеза, в котором не происходит удвоения хромосом, обе клетки,

обычно синхронно вступают во второе деление мейоза. Последнее мало отличается от митоза по своему механизму, но имеет некоторые особенности.

Профаза-II может быть очень короткой и редко обнаруживается на препаратах. Во время этой стадии происходит подготовка ко второму делению. В метафазе-II удвоенные хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости веретена деления. Центромеры делятся, как во время митоза. Каждая хроматида становится самостоятельной.

В анафазе-II к полюсам расходятся хроматиды. У гетерозигот они не идентичны, как в митозе, потому что участвовали в кроссинговере. Итак, хроматиды, которые наблюдались еще в первом делении мейоза, расходятся к полюсам только во втором делении. На каждом полюсе клетки оказывается гаплоидное число монохроматидных хромосом.

В телофазе-II формируются гаплоидные ядра, происходит цитокинез. После двух делений из одной клетки с диплоидным набором хромосом образуются четыре - с гаплоидным (Паушева, 1988).

В настоящее время существует много работ, посвященных изучению особенностей течения мейоза у отдаленных гибридов, но в большей степени пшеницы. Так под влиянием генотипа и внешних условий у константных сортов мягкой пшеницы могут возникать отклонения от нормальной бивалентной конъюгации, которые заключаются в образовании унивалентов и мультивалентов. В метафазе-I у таких форм может наблюдаться неправильная ориентация бивалентов, и не все биваленты могут быть закрытого типа (т.е. кольцеобразные, имеющие минимум две хиазмы). Наличие открытых бивалентов не нарушает общего течения мейоза, но указывает на ослабление конъюгации. Обычно у растений пшеницы в M-I мейоза встречается максимум 5 открытых бивалентов, а униваленты наблюдаются довольно редко.

Нарушения в анафазе-I мейоза мягких пшениц сводятся к задержке одного или нескольких унивалентов на экваторе клетки. Эти униваленты могут остаться в цитоплазме и образовать микроядро в диаде. Униваленты могут

позднее отойти к одному из полюсов. Отставшие в АI униваленты могут преждевременно расщепиться на хроматиды, и отойти к полюсам, а затем образовать микроядра в диадах и тетрадах. Вследствие этих нарушений гамета или приобретает или теряет хромосому. В АI могут образовываться мосты. Их образование может быть вызвано слипанием концов хромосом или задержкой терминализации хиазм. Кроме того, у отдаленных гибридов в АI мейоза может нарушаться функция веретена и вместо двухполюсного деления образуется трехполюсное.

Первое деление мейоза заканчивается образованием диад. У мягких пшениц во время этой стадии встречается два типа нарушений: наличие микроядер в цитоплазме и крайне редко - одна или несколько хромосом могут отделиться перегородкой и дать вместо диады триаду с микроклеткой.

Во втором делении мейоза на стадии метафазы-II у отдаленных гибридов наблюдаются следующие отклонения от нормы: отставание хромосом, образование двух веретен в одной клетке, иногда под углом 90° друг к другу, расщепление веретена. Может наблюдаться асинхронность деления в пределах одной материнской клетки пыльцы: В одной клетке хромосомы находятся на стадии метафазы-II, а во второй-АII или ТII.

В анафазе-II могут быть отставания хромосом, мосты с фрагментами и без них, а так же нарушения функций веретена, которые приводят к возникновению трехполюсных митозов и образованию двух веретен в одной клетке.

На заключительной стадии мейоза образуются тетрады. У отдаленных гибридов отставшие хромосомы могут образовывать микроядра, а в результате нарушений функций веретена могут появиться полиады. Наличие микроядер в тетрадах и полиадах приводит к возникновению гамет с несбалансированным числом хромосом, часть из которых дает стерильную пыльцу, часто различающуюся и по размерам (Ячевская и др., 1990).

Следует упомянуть и характерную особенность в протекании мейоза у отдаленных гибридов - мозаичность спорогенной ткани (Орлова, 1977 - по

Ячевской и др., 1990) - когда в пределах одного пыльника может возникнуть различное число материнских клеток пыльцы с варьирующим числом хромосом. Данное явление хорошо выражено у гексаплоидных и октаплоидных тритикале. Так, у октаплоидных тритикале мозаичные МКП составляли 28 – 73%, а у гексаплоидных (первичных и вторичных) 5 – 56% соответственно (Шкутина и Хвостова, 1971 - по Ячевской и др., 1990).

При отдаленной гибридизации может иметь место еще один тип нарушений - цитомиксис. Это явление характеризуется процессом миграции целого ядра или его части с некоторым количеством цитоплазмы из одного микроспороцита в другой. Иногда сразу в нескольких материнских клетках пыльцы может наблюдаться цитомиксис. Наиболее часто он наблюдается в лептотене и пахитене и уменьшается к поздней профазе, но может наблюдаться и на стадиях МI и АI мейоза.

Цитомиксис встречается не у всех гибридов. Он приводит к стерилизации спорогенных клеток и усложняет картину нарушений мейоза. Цитологическое изучение у дополненных форм, как правило, ограничивается подсчетом числа хромосом, вследствие этого большой интерес представляет изучение поведения дополнительной хромосомы в течение всего мейотического деления (Ячевская и др., 1990).

1.6 Пахитенный анализ

Морфология хромосом томатов *L. esculentum* Mill, и некоторых диких видов в стадии пахитены была описана многими авторами (Lesley, 1935; Lesley, 1938; Brown, 1949; Barton, 1950; Gottschalk, 1951, 1954, - все по Жученко, 1973).

Однако именно Б. Мак-Клинтон в 1929 г. обнаружила гетерохроматиновые участки - темноокрашенные утолщения в хромосомах материнских клеток пыльцы на стадии пахитены на кукурузе. Размер узелков составляет 0,3 – 3,3 мкм. Сейчас известно, что в основе структуры ДНК в узелках лежат тандемные повторы фрагмента длиной 180 пар нуклеотидов.

Повторы прерываются инсерциями ретротранспозонов. В узелке хромосомы 9 кукурузы до 30% ДНК представлена копиями этого транспозона. Кроме того, обнаружены еще тандемные повторы TR1, имеющие длину 350 п. н. (Ananiev et al., 1998 – по Жимулеву, 2002).

Вопрос идентификации хромосом на стадии пахитены является ключевым во всех цитогенетических исследованиях, в том числе в выяснении основных признаков генома томатов, особенно учитывая, что митотические хромосомы томата идентификации не подлежат.

Barton D.W. (1970) установил, что пахитенные хромосомы разных видов томатов характеризуются специфической морфологией, которая определяется формой, величиной и положением центромеры, величиной и структурой хромомер хроматических зон, величиной и структурой ахроматических зон, величиной теломер. Каждая хромосома дифференцирована по длине на хроматические (окрашенные) зоны и ахроматические (неокрашенные) зоны. При этом хроматические зоны расположены по обе стороны центромеры, а ахроматические занимают остальную часть хромосомы. Теломеры бывают ярко выраженными и менее заметными. Исключение составляет короткое плечо второй хромосомы не имеющее ахроматической части. Хроматическая зона каждой хромосомы состоит из темноокрашенных хромомер с наличием или без ахроматических сегментов между ними.

У некоторых хромосом хромомеры регулярно чередуются с ахроматическими сегментами, а у других образуют сплошной хроматин, хотя компактность расположения хромомер зависит не только от особенности строения хромосомы, но и от степени хроматизации межхромомерных участков и спирализации хромосом. Хромомеры различаются как по величине, так и по интенсивности окрашивания. Они часто обнаруживаются в ахроматической зоне хромосом, а также в зоне перехода хроматической в ахроматическую. Этот переход бывает постепенным или резким, когда ахроматическая зона начинается от хроматической и в отсутствие каких-либо хромомер.

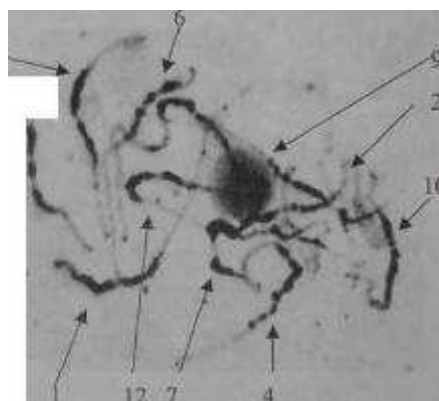


Рис. 4. Пахитенные хромосомы томата (С. М. Rick, 1978 - по Griffiths et al., 1997)

Исследованиями многочисленных авторов установлено, что все виды томатов, в том числе и культурный вид, являются диплоидными (хромосомный набор $2n=24$), хотя известны случаи появления гаплоидов, полиплоидов и трисомиков (Lindstrom, 1929; Rick, 1945- по Жученко, 1973), а также возможно их искусственное получение (Lindstrom, 1932; Upcott, 1955; Rick, Khush, 1969; Гареев, 1971- по Жученко, 1973). Однако по данным Р. Banks был обнаружен сорт Flora-Dade с 26 хромосомами (13 бивалентов в MI). Подтверждением этого также являлись цитологические исследования популяции, обработанной химическими реагентами, которые показали наличие тетраплоидов с хромосомным набором $2n=52$, триплоидов ($2n=39$) и трисомиков ($2n=27$). Родительские сорта Walter и Флорида также имели 26 хромосом. Других форм из рода *Lycopersicon* с хромосомным набором $2n=26$ не найдено.

Еще в 1935 г. анализ кариотипов нескольких сортов культурного томата показал, что они отличаются по размеру спутника ядрышкоорганизующей второй хромосомы, и это различие можно наблюдать в гетерозиготном потомстве (Lesley, 1935- по Жученко, 1973).

Однако структура пахитенных хромосом томатов и, в частности, *L. esculentum* Mill., сложнее, чем соматических, и имеет более ярко выраженные маркеры, что позволяет использовать их при проведении цитогенетических

исследований.

1.6.1. Характеристика пахитенных хромосом культурного томата

Хромосома 1 является самой длинной хромосомой кариотипа. Хроматические зоны длинного и короткого плеч почти равные по длине и, в свою очередь, почти такой же длины, как ахроматическая зона короткого плеча. Ахроматическая зона длинного плеча является основным компонентом этой хромосомы и не имеет видимых хромомер на протяжении всей длины, исключая короткую зону перехода в хроматическую. Теломера длинного плеча неясная. Данные согласуются с описанием Barton (1950) и Gottschalk (1958). Ramanna, Prakken (1967) отмечают, что ахроматическая часть короткого плеча первой хромосомы начинается четкой хромомерой, а по остальной длине авторы наблюдали очень маленькие, светлые хромомеры (Жученко, 1973).

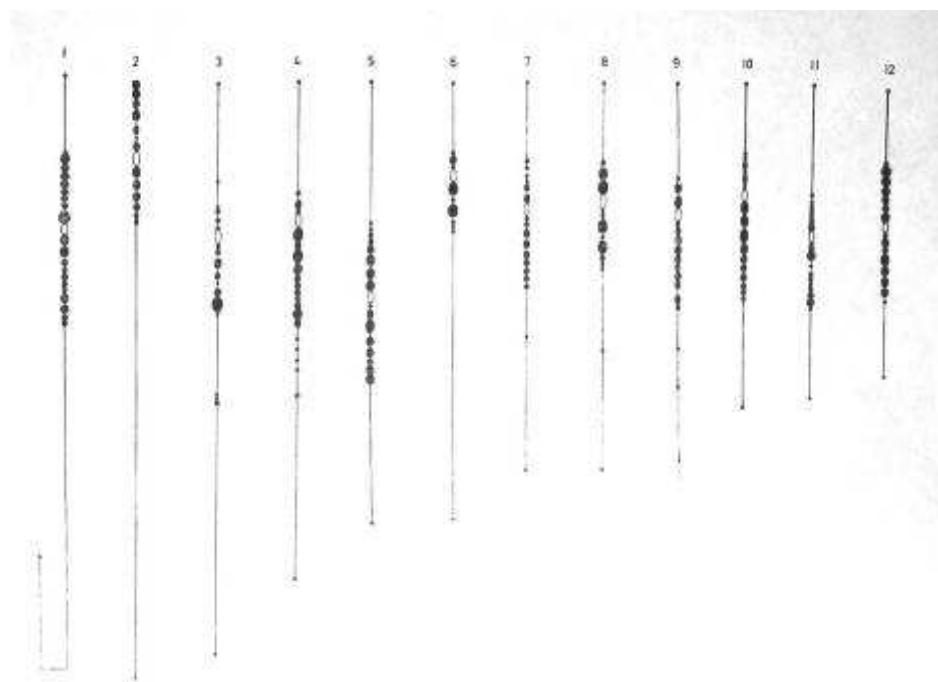


Рис. 5. Пахитенная карта хромосом.

Хромосома 2 является ядрышкоорганизующей, или спутничной. Короткое плечо ее полностью состоит из хроматина и связано с ядрышком. Проксимальный конец этого плеча начинается большой хромомерой. По

данным Ramanna, Prakken (1967), хроматическая часть длинного плеча начинается маленькой хромомерой, далее следует другая, более крупная хромомера, затем небольшой, светлый промежуток и, наконец, маленькие хромомеры. Длинная ахроматическая часть длинного плеча лишена хромомер, за исключением теломеры. Согласно данным Barton (1950), в ахроматической части длинного плеча на небольшом расстоянии от хроматической части имеется небольшая хромомера, которая в светлых препаратах незаметна. Согласно данным Жученко (1973), короткое плечо более компактное, хроматин темнее, тогда как хроматин длинного плеча более рыхлый и заканчивается крупной хромомерой. В стадии пахитены хроматин состоит только из 3 хромомер. В ахроматической части обнаруживаются до 4 хромомер более или менее одинакового размера, расположенных близко друг к другу.

Хромосома 3 – асимметричная. На коротком плече ахроматическая зона более длинная, чем хроматическая. Последняя состоит из 3 хромомер, близко расположенных друг к другу, из которых средняя крупнее. В ахроматической части обнаруживается одна небольшая хромомера. Хроматическая зона длинного плеча непрерывная и длиннее, чем соответствующая у короткого плеча. В ахроматической части длинного плеча обнаруживается гроздь хромомер различной величины и степени окрашивания (Жученко, 1973). Эти данные в отношении морфологии 3-й хромосомы согласуются с данными Barton (1950), Ramanna, Prakken (1967).

Хромосома 4 – асимметричная, средней длины. Хроматические части сильно асимметричны. Хроматическая часть короткого плеча, по Barton (1950), состоит из 3 хромомер, плотно прижатых друг к другу, средняя из которых крупнее. Ramanna, Prakken (1967) обнаружили только две хромомеры, расположенные рядом по длине хромосомы. Хроматическая зона длинного плеча непрерывна, но четко разделена на хромомеры и резко обрывается при переходе в ахроматическую. В ахроматической части длинного плеча, по данным Ramanna, Prakken (1967) видна одна хромомера, а по

Barton (1950) - несколько.

Хромосома 5 – симметричная, средней длины. Хроматические части слегка асимметричны. Эти признаки делают ее трудно отличимой от хромосом 11 и 12. Только различие в хромомерных моделях и в общей длине позволяет идентифицировать эти хромосомы (Жученко, 1973).

Хромосома 6 – асимметричная, средней длины. Впервые она была идентифицирована Brown (1949) как хромосома с короткой хроматической зоной. Окрашенная часть этой хромосомы состоит из 3 участков. Первый расположен в коротком плече, а два - в длинном. Последние два разделены маленькой хромомерой. Хроматическая часть короткого плеча состоит из нескольких хромомер различной величины. Ахроматическая зона короткого плеча короткая и кончается крупной теломерой, тогда как соответствующая зона длинного плеча намного длиннее (Жученко, 1973).

Хромосома 7 по структуре очень сходна с хромосомой 8, асимметричная, средней длины. Хроматические части обоих плеч почти симметричны. Хроматин короткого плеча компактный, но в нем вырисовывается хромомерная структура. В дистальных концах хроматических зон и в проксимальном конце хроматической зоны короткого плеча выявляется по одной характерной хромомере. В первой 1/4 части ахроматической зоны длинного плеча выявляется слабоокрашенная хромомера.

Хромосома 8 – асимметричная, окрашенные зоны почти равные. Хроматическая часть короткого плеча состоит из трех хромомер. Первые две – ближе к центромере, крупнее, почти равной величины, а третья – меньше. Последняя – отделяется от этих двух хромомер небольшим ахроматическим интервалом. В центре ахроматической части длинного плеча обнаруживается одна ярко выраженная хромомера. Такое описание хромосом 7 и 8 соответствует данным Barton (1950), Ramanna, Prakken (1967), Rick (1967).

Хромосома 9 – асимметричная, по общей длине сходна с хромосомами 7 и 8, но отличается главным образом тем, что имеет большую разницу между

размерами хроматических зон длинного и короткого плеч. Кроме того, на дистальном конце хроматической зоны длинного плеча расположена отличительная большая хромомера. В ахроматической части длинного плеча отмечаются 1 – 2 маленькие, интенсивно окрашенные хромомеры. Хроматическая зона короткого плеча на хорошо дифференцированных препаратах характеризуется двумя крупными хромомерами, разделенными небольшим ахроматическим интервалом, хотя в исследованиях Rick (1967) в дистальной части обнаруживается еще одна хромомера, меньшая по размеру.

Хромосома 10 – короткая, асимметричная. Окрашенные зоны асимметричные. Хроматическая зона длинного плеча почти такой же длины, как ахроматическая, и состоит из отдельных хромомер, размер которых к дистальному концу уменьшается.

Хромосома 11 – короткая, симметричная. Окрашенные части асимметричные. Хроматическая зона короткого плеча в проксимальной части начинается крупной хромомерой, за которой следуют несколько других, меньшего размера хромомер. В хроматической части длинного плеча имеется разрыв, в пределах которого проявляется маленькая хромомера.

Хромосома 12 – является самой короткой хромосомой набора, симметричная, хроматические части также симметричные. В ахроматической зоне длинного плеча находится маленькая хромомера, позволяющая идентифицировать плечи хромосомы.

Согласно наблюдениям, помимо хромосом типичной структуры, иногда встречаются и такие, которые из-за специфической морфологии вызывают затруднения, в поисках гомологов какой-либо из хромосом, описанных 12 типов. Среди них:

1) хромосома, короткое плечо которой состоит из одинаковых по величине хроматической непрерывной зоны и ахроматической, без видимых хромомер. Второе плечо начинается двумя хромомерами одинаковой величины, за которыми следуют еще две хромомеры меньшего размера. Хромомеры разделены почти одинаковым ахроматиновым интервалом;

2) хроматин обоих плеч хромосомы состоит из отдельных хромомер, разделенных ахроматином. В коротком плече были обнаружены 3 хромомеры, а во втором – 7;

3) хроматин короткого плеча состоит из 4 – 5 тесно сжатых хромомер, а длинного плеча – из короткого непрерывного хроматина и трех одинаковых хромомер, разделенных одинаковым ахроматическим интервалом;

4) хроматин короткого плеча начинается крупной хромомерой, примыкающей к остальной его сплошной части. Центромерная зона сравнительно большая, а хроматин длинного плеча состоит только из 3 хромомер (средняя из которых – крупнее), расположенных на почти одинаковом расстоянии друг от друга; 5) хроматин короткого плеча сплошной и равен ахроматической зоне, тогда как хроматин длинного плеча разделен на 7 – 8 хромомер с небольшим ахроматическим интервалом между ними.

В целом результаты исследований Жученко (1973) по идентификации пахитенных хромосом *L. esculentum* Mill. Сорта Бируинца в сравнении с данными других авторов (Brown, 1949; Barton, 1950; Khush, Rick, 1967; Ramanna, Prakken, 1967; Hagemann, Snoad, 1971) показали единый план строения хромосом разных сортов культурного томата.

Большая часть фактического материала цитогенетических исследований, в том числе и кариологических, относится к культурному томату – *L. esculentum*. Mill., тогда как многие дикие виды и полукультурные разновидности томатов, являющиеся носителями генов хозяйственно-ценных признаков, остаются еще слабо изученными. В то же время вопросы совместимости диких видов с культурными томатами, разработка методов переноса целых хромосом или участков хромосом дикой формы в геном культурного сорта-реципиента требуют изучения особенностей кариотипов дикорастущих форм.

1.6.2. Характеристика пахитенных хромосом видов - сородичей культурного томата

По данным Humphrey (1936) (по Жученко, 1973), соматические хромосомы var. *pimpinellifolium* и var. *racemigerum* в целом сходны с хромосомами *L. esculentum* Mill, за исключением того, что хромосомы и спутники первых более мелкие. Принимая длину и объем хромосом генома *L. esculentum* Mill, за 100%, автор установил, что длина и объем хромосом генома *L. esculentum* var. *pimpinellifolium* составляет соответственно 84,7 и 75,5%.

Пахитена *S. lycopersicoides* сходна с пахитенной картой культурного томата. Различия обнаружены только для 4, 9 и 10 хромосом (Menzel, Margaret Y, 1998).

2. Экспериментальная часть

2.1. Цель

Целью исследования являлось изучение мейоза дополненной формы культурного томата и идентификация пахитенных хромосом *S. lycopersicoides* в дополненных линиях.

2.2. Задачи

1. Освоить методику приготовления постоянных препаратов мейоза.
2. Дать цитологическую характеристику всем стадиям мейоза моносомно дополненной линии.
3. Провести пахитенный анализ хромосом культурного томата.
4. Идентифицировать 2-ую хромосому *S. lycopersicoides* с помощью пахитенного анализа.

2.3. Материал

В работе по идентификации и цитологической характеристике дополненных линий использовали материал, любезно предоставленный Roger T. Chetelat из Центра генетических ресурсов томата (Калифорнийский Университет, США). Нами были получены семена расщепляющейся популяции дополненных линий, из которой необходимо было выделить растения с хромосомой 2 *S. lycopersicoides*. Схема создания дополненных линий представлена на рисунке 6.

L. esculentum (LL) x *S.lycopersicoides* (SS)

F1 (LS=2x)

КОЛХИЦИН

L. esculentum (LL) x амфидиплоид (LLSS=4x)

L. esculentum (LL) x *L. pennellii*

беккроссы с *L. esculentum* сесквидиплоид (LLS=3x) x линия-посредник
эмбриокультура

2n, 2n+1, 2n+2, 2n+3 и т.д.

дополненные линии

Рис. 6. Схема создания моносомно дополненных линий томата (по Chetelat, 1998)

2.4. Методы

Для изучения мейотического деления и подсчета числа хромосом у томата используют небольшие (0,1-0,25 мм) бутоны до их распускания (рис. 7).

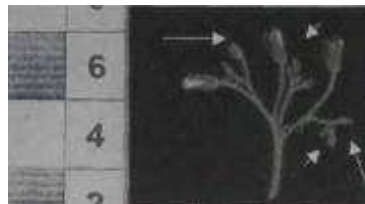


Рис. 7. Кисть томата (стрелками указаны фиксируемые бутоны).

2.4.1 Отбор материала для фиксации и его фиксация

При фиксации бутонов проводили оценку стадии развития бутонов приготовлением временных ацетокарминовых препаратов пыльников томата (Паушева, 1988). Отобранные бутоны фиксировали в уксусном спирте (3:1) и хранили в холодильнике при +4°C.

2.4.2 Приготовление, окрашивание и изучение препаратов

Приготовление постоянных препаратов из пыльников.

Для получения качественных препаратов предметные стекла

непосредственно перед приготовлением выдерживали в 96% спирте.

Зафиксированные пыльники промывали в проточной воде в течение 15 мин и помещали в 0,6% раствор ферментов в цитратном буфере на 2,5 ч при 37°C. Препараты готовили методом распластывания. Пыльник вынимали из ферментов и дробили его на предметном стекле препаровальными иглами под биноклем в капле 60% уксусной кислоты. Полученную суспензию окаймляли фиксатором 3:1 и затем добавляли каплю фиксатора в центр суспензии. Приготовленный препарат ополаскивали в 96% спирте. Контроль эффективности действия ферментов осуществляли под микроскопом по приготовленным препаратам.

Окрашивание материала

Высушенные приготовленные постоянные препараты окрашивали в 1% растворе красителя Гимза, приготовленном в фосфатном буфере (рН — 6,8). Время экспозиции для пыльников 25 мин.

Анализ препаратов

Изучение препаратов проводили с использованием микроскопа Axiolab Carl Zeiss. Для характеристики отдельных фаз мейотического деления использовали не менее 5 препаратов и анализировали не менее 70 клеток.

Для характеристики мейотического деления проводили анализ следующих стадий:

- пахитены - для идентификации хромосом культурного томата и хромосомы *S. lycopersicoides*;

- диакинеза – метафазы-I – для оценки частоты конъюгации хромосом;
- анафазы-I – для определения характера расхождения хромосом;
- анафазы-II – для определения характера расхождения хроматид;
- телофазы-II – тетрады – для характеристики сформировавшихся микроспор;

Для каждой стадии подсчитывали процент клеток с нормальным ходом мейоза и с нарушениями.

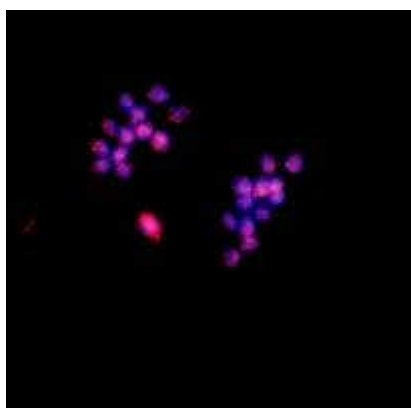
Отобранные пластинки фотографировали с помощью фотосистемы МС

80 DX фирмы Carl Zeiss. Проявление фотопленки и изготовление фотографий осуществляли по стандартным методикам.

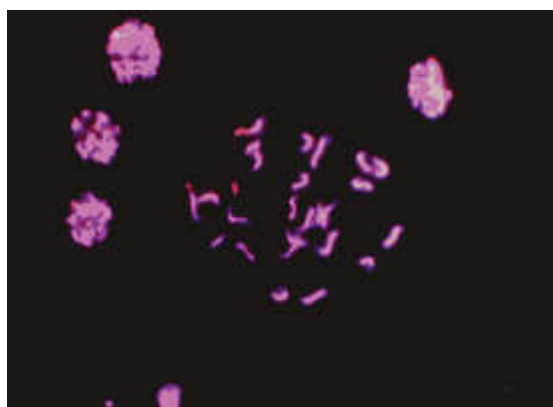
2.5. Результаты

2.5.1. Анализ мейоза моносомно дополненной линии

Прямым методом выделения моносомно дополненной линии культурного томата является подсчет числа митотических и мейотических хромосом. Для доказательства того, что лишняя хромосома действительно от другого вида была проведена геномная гибридизация *in situ*, которая показала, что имеется хромосома от *S.lycopersicoides*. Кроме этого вторая хромосома у томата - ядрышкообразующая. Визуализация ядрышкоорганизующего региона (ЯОР) методом FISH, проведенная на кафедре биотехнологии МСХА, убедительно показала, что дополненная – вторая хромосома.



А



Б

Рис. 8. А - Гибридизация *in situ* (GISH). Б - визуализация ЯОР методом FISH.

В метафазе-1 у дополненных форм в 64,8% клеток встречается отдельно лежащая хромосома (табл. 1). Ранее было показано, что дополненная хромосома 2 *S. lycopersicoides* может, конъюгировать с хромосомой культурного томата (с частотой 27,8%), а так же способна вызывать частичный асинdez и других хромосом (около 20% клеток имели три и более унивалентов) (табл. 2).

Таблица 1.

Характеристика метафазы-I моносомно дополненной формы

Проанализировано клеток, всего	Клеток с нормальным делением		Клеток с отдельно лежащей хр-ой	
	шт.	%	шт.	%
108	38	35,2	70	64,8

Таблица 2.

Частота встречаемости хромосомных ассоциаций
у моносомно дополненных линий в метафазе-I

Хромосомные ассоциации	11П+3I	11П+1Ш	12П+П	10П+5I	10П+1Ш+2I
Частота встречаемости, %	12,03	24,06	57,90	2,25	3,76

Вследствие этого в А-I мейоза моносомно дополненной формы наблюдаются отставания, тогда как клеток с нормальным расхождением хромосом было около 60%.



Рис. 9. Метафаза-I с отдельно лежащей хромосомой



А



Б

Рис. 10. Мост (А) и отставание (Б) в анафазе-I.

Таблица 3.

Характеристика анафазы-I моносомно дополненной формы

Проанализировано клеток, всего	Клеток с нормальным делением		Клеток с отставанием,		Клеток с мостами	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
130	76	58,6	53	40,65	1	0,75

Во втором мейотическом делении на стадии метафазы-II, когда дихроматидные хромосомы выстраиваются одновременно в экваториальной плоскости в обеих клетках микроспороцита наблюдались отдельно лежащие хромосомы (рис. 11). Частота таких клеток составила 15%, в остальных случаях материнские клетки пыльцы имели по 12 и 13 хромосом в каждой из плоскостей (табл. 3).



Рис. 11. Метафаза-II с отдельно лежащей хромосомой.

Таблица 3.

Характеристика метафазы-II моносомно дополненной формы

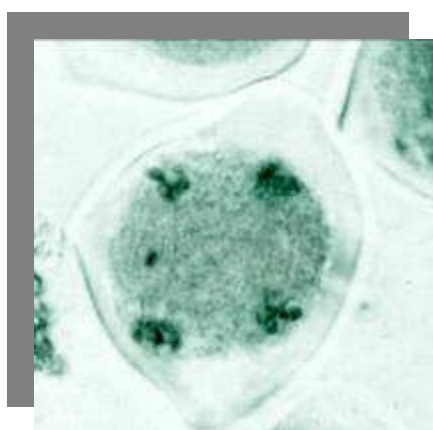
Проанализировано клеток, всего	Клеток с расхождением хромосом 12-:-13		Клеток с расхождением хромосом 12-:-12-:-1	
	шт.	%	шт.	%
20	17	85	3	15

Анафаза второго деления, где хроматиды расходятся к полюсам, протекает в целом нормально, лишь 18,3% клеток имеют нарушения в виде отставаний как одной, так и нескольких (рис. 12, табл. 4).

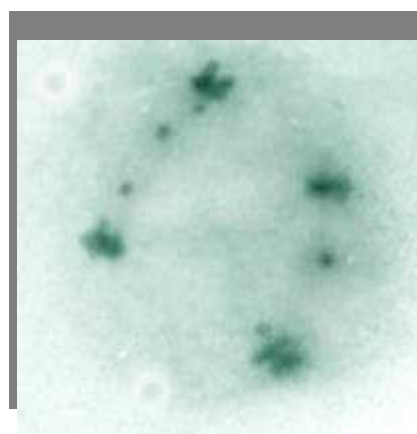
Таблица 4.

Характеристика анафазы-II моносомно дополненной формы

Проанализировано клеток, всего	Клеток с нормаль- ным делением		Клеток с отставанием,		Клеток с мостами	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
109	89	81,7	20	18,3	0	0



А



Б

Рис. 12. Отставания хромосом в анафазе-II. А - отставания в одной клетке, Б - отставания в двух клетках.

В телофазе-II образуются четыре гаплоидных ядра. На этой стадии мейоза дополненной линии была обнаружена отдельно лежащая хромосома (рис. 13).

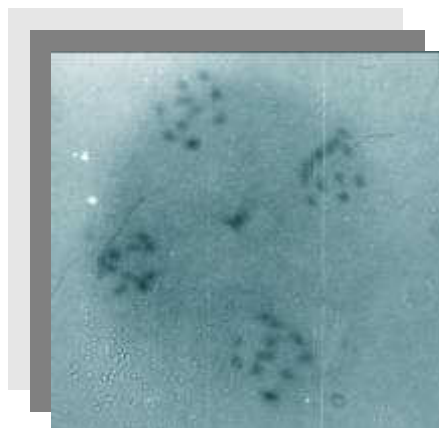


Рис. 13. Отдельно лежащая хромосома в телофазе-II.

На заключительной стадии мейоза между вновь образованными ядрами закладывается перегородка и возникает тетрада микроспор с гаплоидным числом хромосом в каждом ядре. Однако в 10,8 % случаях на этой стадии наблюдались пентады (рис. 14, табл. 5). При этом не обнаружено клеток с микроядрами, что обычно часто встречается у отдаленных гибридов.

Таблица 5.

Характеристика стадии тетрад моносомно дополненной линии

Всего	Кол-во тетрад		Кол-во пентад	
	шт.	%	шт.	%
111	99	89,2	12	10,8



А



Б

Рис. 14. Тетрада (А) и пентада (Б).

2.5.2. Пахитенный анализ

Проведен пахитенный анализ моносомного растения, где удалось идентифицировать 7 хромосом культурного томата и 2-ю хромосому *S. lycopersicoides*.

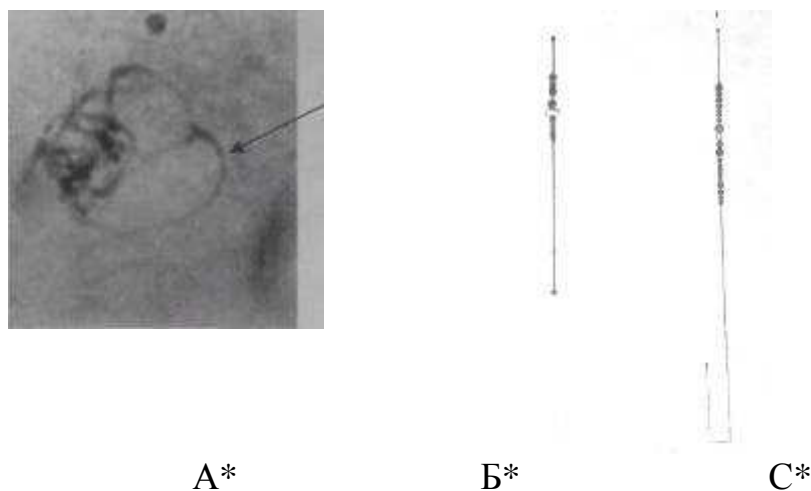


Рис. 15. Хромосома 1 в стадии пахитены (указана стрелкой). * - здесь и далее: А - фотография, Б - схема, В - карта.

Составленная схема хромосомы на рисунке 15 соответствует хромосоме 1 карты, т.к. имеет почти равные хроматические зоны длинного и короткого плеча. Ахроматическая зона длинного плеча не имеет хромомер, и значительно превышает по размеру все короткое плечо.

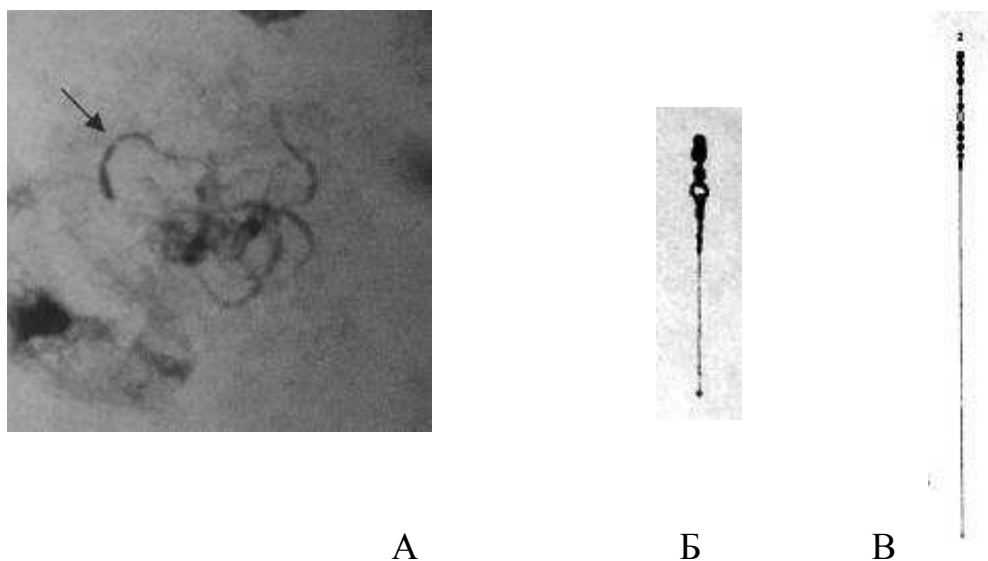


Рис. 16. Хромосома 2 в стадии пахитены.

Представленная на рисунке 16 хромосома имеет четко выраженное короткое плечо, полностью состоящее из гетерохроматина. Длинная

ахроматическая часть лишена хромомер. Это ясно указывает на то, что это хромосома 2.

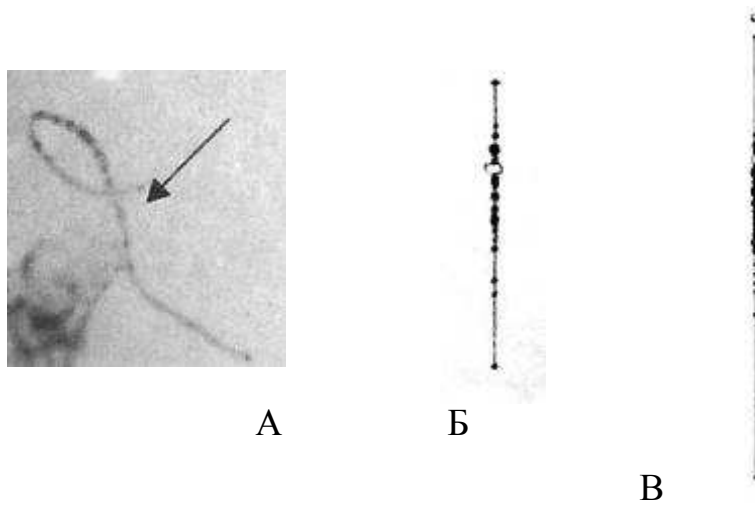
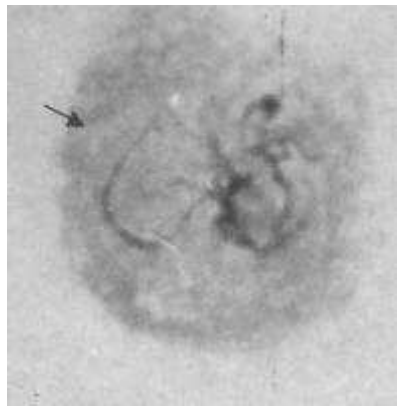


Рис. 17. Хромосома 4 в стадии пахитены.

На рисунке 17 представлена асимметричная хромосома, в коротком плече которой хроматическая часть состоит из 4-х хромомер, средняя из которых крупнее. Хроматическая часть длинного плеча непрерывна, но четко разделена на хромомеры. Это дает основание утверждать, что это - хромосома 4.



А



Б



В

Рис. 18. Хромосома 7 в стадии пахитены

Асимметричность хромосомы (рис. 18), симметричные хроматические части обоих плеч, слабоокрашенная хромомера в ахроматической зоне длинного плеча говорит нам о том, что это хромосома 7.



А



Б



В

Рис. 19. Хромосома 10 в стадии пахитены.

Хромосома на рисунке 19 определена как 10, т. к. хроматическая зона длинного плеча почти такой же длины как и ахроматическая, и состоит из отдельных хромомер, размер которых к дистальному концу уменьшается.

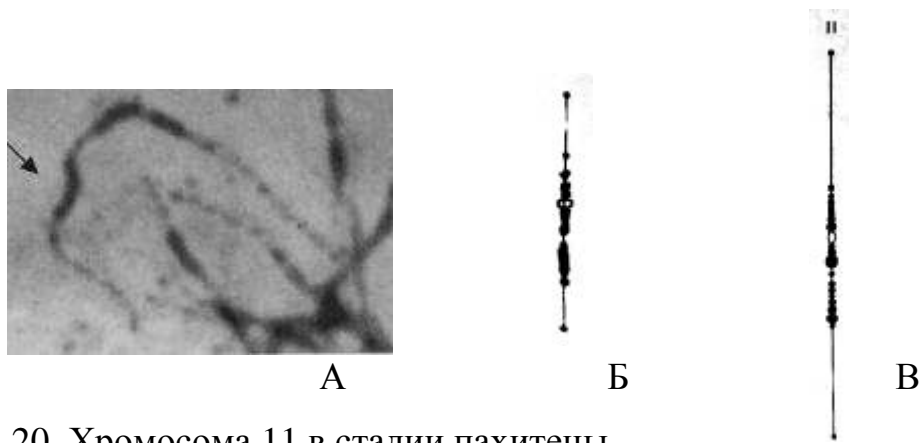


Рис. 20. Хромосома 11 в стадии пахитены.

Короткая, симметричная хромосома на рисунке 20 соответствует 11 хромосоме, т. к. она симметрична, хроматическая зона длинного плеча имеет разрыв, в пределах которого наблюдается маленькая хромомера.



Рис. 21. Хромосома 8 в стадии пахитены.

Асимметричная хромосома, хроматическая часть короткого плеча начинается с 2-х крупных хромомер (рис. 21) соответствует 8-ой хромосоме.

В результате проведенного анализа удалось показать факт конъюгации второй хромосомы культурного томата и *S.lycopersicoides* на стадии пахитены.

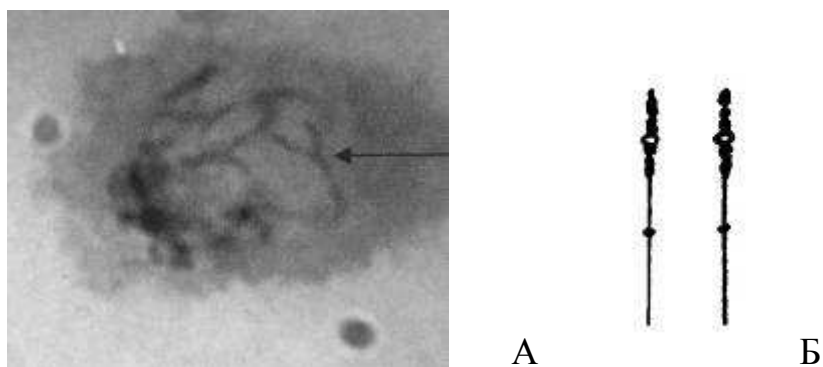


Рис. 22. Хромосома 2 культурного томата и *S.lycopersicoides* в стадии пахитены.

На рисунке 22 хромосомы (по хромомерному рисунку) соответствуют 2 хромосоме. Видно, что конъюгация отсутствует в коротком плече.

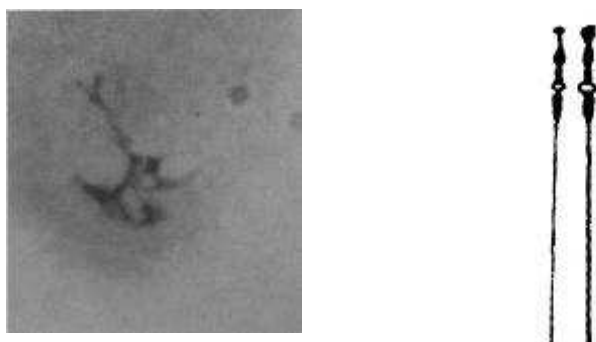


Рис. 23. Хромосома 2 культурного томата и *S.lycopersicoides* в стадии пахитены.

На рисунке 23 наблюдается конъюгация двух ядрышко образующих хромосом, одна из которых в коротком плече имеет меньшее количество гетерохроматина. Расхождение хромосом происходит в коротком плече.

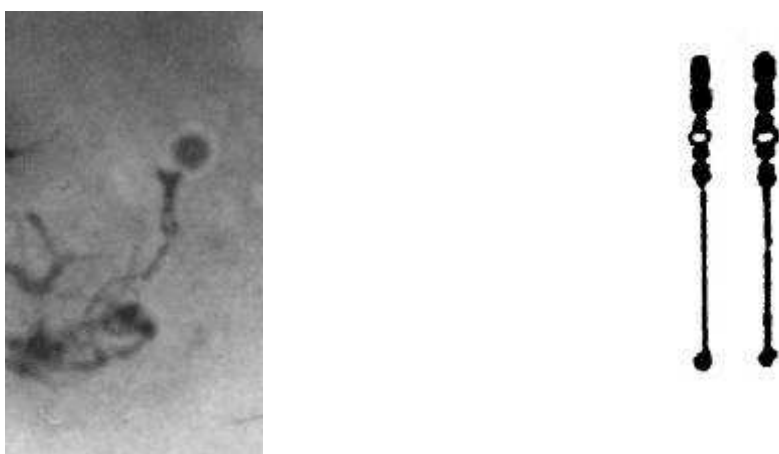


Рис. 24. Хромосома 2 культурного томата и *S.lycopersicoides* в стадии пахитены.

На рисунках 23 и 24 показана конъюгация двух 2-х хромосом. Четко видны различия в количестве хромомер короткого плеча на рисунке 24. На обоих препаратах расхождение хромосом наблюдается близ центромер.



Рис. 24. Хромосома 2 культурного томата и *S.lycopersicoides* в стадии пахитены.

Выводы

1. Мейоз моносомно дополненной линии культурного томата с хромосомой 2 *S.lycopersicoides* характеризуется достаточно высоким уровнем нарушений, которые проявляются на всех стадиях от профазы-I до тетрады.

2. С помощью пахитенного анализа идентифицировано 7 хромосом культурного томата - 1, 2, 4, 7, 8, 10, 11 - и хромосома 2 *S.lycopersicoides*.

3. Хромосома 2 *S.lycopersicoides* в отличие от хромосомы 2 культурного томата в коротком плече имеет меньшее количество хромомер, что позволяет идентифицировать ее на стадии пахитены. Выявлено, что хромосома 2 *S.lycopersicoides* конъюгирует на стадии пахитены с хромосомой 2 культурного томата с образованием тривалента, что согласуется с данными по частоте хиазмообразования в М-I. Синапсис обнаруживается только длинными плечами этих хромосом.

4. Наличие конъюгации между вторыми хромосомами *S.lycopersicoides* и *L. esculentum* свидетельствуют о частичной гомологии, а так же показывают возможность передачи генов от дикого вида культурному томату.

Список литературы

1. Гавриленко Т. А. Межродовая, межвидовая, внутривидовая гибридизация пасленовых на примере родов *Solanum* и *Lycopersicon* (генетические и биотехнологические аспекты). - Автореф. на соискание д.б.н.-СПб, 1999.
2. Генетика культурных растений: Зерновые культуры. - Л.: Агропромиздат, 1986.
3. Гуляев Г.В. Генетика. - М., 1984.
4. Гуляев Г.В., Мальченко В.В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции, семеноводству и семеноведению.— М.: Россельхозиздат, 1975.
5. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика. - Новосибирск, 2002.
6. Жученко А.А. Генетика томатов. - Кишинев: Штиинца, 1973.
7. Паушева З.П. Практикум по цитологии. - М, 1988.
8. Ячевская Г. Л., Иванова С. В., Наумов А. А. Особенности мейоза при отдаленной гибридизации. - М., 1990.
9. Anthony J. F. Griffiths, Jeffrey H. Miller, David T. Suzuki, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart. An introduction to genetic analysis. - New York, 1997.
10. Chetelat R. T., Rick C. M., Cisneros P., Alpert K. B., DeVerna J. W. Canada, 1998.
11. Garriga-Caldere F., Huigen D.G., Jacobsen E., Ramanna M.S. Origin of alien disomic addition with an aberrant homologue of chromosome-10 of tomato and its meiotic behavior in a potato background revealed through GISH // Teor. Appl. Genet. - 1999. -P.1263-1271.
12. Gavrilenko T.A., Thieme R., Rokka V.-M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their androgenetic regenerants. - Genetics, 2001,103, 213, 231-239.
13. Z. Xiao-bo, P. F. F. J. Wennekes, F. G. Caldera, M.S. Ramanna, P. Zabel, J. H. de Jong. Molecular cytogenetic analysis of repetitive sequences using a

monosomic addition containing tomato chromosome 6 in a tetraploid potato background. -Molecular cytogenetic analysis.

[//http://probe.nalusola.gov.8000/otherdocs/pg/pg5](http://probe.nalusola.gov.8000/otherdocs/pg/pg5).

14. Menzel, Margaret Y. Pachytene chromosomes of the hybrid *L. esculentum* x *S. lycopersicoides*. <http://probe.nalusola.gov.8000/otherdocs/tgs/voll1/vl1pl5b.html>