

УДК 633.63: 631.52  
© 2010

*М.В. Роїк,*  
*академік УАН*  
*Н.С. Ковальчук*  
*О.А. Яцева*  
*Інститут*  
*цукрових буряків*

## АПОМІКСИС У ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

**Застосовано метод безпилкового режиму в поєднанні з контрольованими умовами росту та розвитку рослин і отримано насіння зі 150 селекційних ліній. З використанням комп'ютерних програм аналізатора плоідності «Partec» досліджено зв'язок між міксоплоїдією клітинних популяцій і апоміктичним зав'язуванням насіння.**

Останнім часом увагу спеціалістів різних напрямів біологічної науки привертає апоміктичний спосіб розмноження культурних рослин, який сприяє довготривалому збереженню бажаних ознак, дає змогу копіювати цінні генотипи і фіксувати ефект гетерозису. Апоміксис — спосіб насінневого розмноження без запліднення, за якого зародок розвивається з клітин гаметофіту при різноманітних порушеннях статевого процесу. Він забезпечує відносну константність потомства, стабільність підтримки та розмноження сортів. Використання апоміксису дає можливість поліпшити якість насіння і може вплинути на економічний ефект цукрового виробництва. Проведення цитоембріологічних досліджень, розробка і освоєння методів діагностики цього явища є необхідною умовою для розкриття його природи та механізму апоміктичного розмноження рослин [1].

Перші свідчення про появу апоміксису в *Beta vulgaris* наведено Н.В. Фаворським (1928), пізніше — Леван (1945), Крауз (1961). Більше ніж через 30 років автор [8] зазначав, що на всіх плоідних ступенях різних видів секції *Corollinae*, за винятком диплоїдних, наявне апоміктичне розмноження. Інші вчені відзначають апоміктичний спосіб розмноження у гібридів з ЦЧС (4n, 5n, 6n), отриманих при схрещуванні рослин цукрових буряків і рослин *B. intermedia* [8, 9, 11, 12]. Деякі дослідники наголошують, що лише *B. trigina* секції *Corollinae* розмножуються апоміктично. Автори отримали тетраплоїдні гібриди між ЧС-4n рослинами цукрових буряків і тетраплоїдними рослинами від *B. lomatogona*, схильні до апоміктичного розмноження [10]. Про отримання насіння без запліднення в пента- і триплоїдних багатонасінних формах з ЦЧС повідомляє автор [2].

Упродовж багатьох років вважалося, що апоміктичний спосіб розмноження у природних умовах у цукрових буряків, як і в багатьох культур, зустрічається дуже рідко. Дослідники апоміксису вважають, що створення гібридів цукрових буряків із залученням пилкостерильних апоміктичних ліній може докорінно змінити процес селекції, зокрема виключити досить трудо-

містку ланку — створення ліній закріплювачів стерильності [3]. Доведено, що насінництво апоміктичних ліній істотно спрощено, оскільки розмноження не потребує просторової ізоляції. Проте у вітчизняній селекції не створено таких вихідних матеріалів. Необхідно досліджувати в експериментальних моделях також різні селекційно-генетичні чинники формування апоміктичного потомства, бо генетична структура насінини і формування зародка надалі залежать від типу апоміксису (диплоспоріальний або аспоспоріальний).

Нині пилкостерильні лінії з апоміктичним розмноженням насіння отримали автори [3]. Дослідники апоміксису зазначають, що зміни в апоміктичному потомстві і поява багатонасінних рослин у потомстві роздільноплідних стерильних ліній цукрових буряків залежать від епігенетичної мінливості.

Слід визнати, що автор [1] уперше отримав ряд гібридних комбінацій з апоміктичних ліній і багатонасінних запилювачів. Лінії рослин з ЦЧС були запилені пилком дикого виду *Beta corolliflora*, опроміненим гамма-променями. Також йому вдалося досягти закріплення гетерозису в гібридів 3-го покоління (F<sub>3</sub>) при збереженні високої продуктивності і роздільноплідності.

**Мета досліджень** — вивчення умов індукції апоміктичного способу розмноження, пошук апоміксипродюсерів та створення методів їх діагностики і добору в генетично різних селекційних матеріалах цукрових буряків.

При цьому планується вивчити стресові фактори індукції апоміксису в різних формах цукрових буряків; установити природу міксоплоїдії клітинних популяцій апоміктичних потомств A<sub>1</sub> і їх зв'язок з репродуктивними ознаками; визначити особливості ембріології та форми індукваного апоміксису в цукрових буряків.

**Методи досліджень.** Як експериментальний матеріал взято 150 самозапильних ліній і простих гібридів, створених на основі селекційних матеріалів різного генетичного походження, стійких до ризоманії. Дослідження проводили в умовах контролю у теплиці Ялтушків-

**1. Характеристика вихідних ліній за типом стерильності**

Досліджувані лінії, шт.	Проаналізовано насінників, шт.	Фенотипи рослин за ЦЧС, %		
		ЧС-0 P±mp	ЧС-I P±mp	ЧС-II P±mp
150	7162	80,88%±0,46	19,05%±0,46	0,07%±0,25

**2. Утворення апоміктичних зародків залежно від вихідних матеріалів**

Селекційний матеріал	Кількість проаналізованих рослин, шт.		Зав'язалось насіння (у середньому на 1 рослину, г)
	загальна	з насінням	
Самозапильні лінії І <sub>3</sub> —І <sub>5</sub>	3339	727	0,39
Прості гібриди (F <sub>1</sub> )	3832	1455	0,74

ської ДСС. Спостереження і обліки вели впродовж усього періоду цвітіння.

Оцінку рівня генома клітинних популяцій апоміктичного потомства насіння першої генерації за співвідношенням фракції клітин різного ступеня плідності здійснювали методом флуоресцентної цитофотометрії з використанням комп'ютерної програми аналізатора плідності (АП) «Partec» [5]. Аналіз гістограм ядерної ДНК проводили за характером міксоплоїдії і співвідношенням фракції ди-, три-, тетра- і гаплоїдних клітин. На насінниках визначали особливості дегенерації мікроспор у мікроспогогенезі і гаметогенезі.

**Результати досліджень.** Аналіз вихідних ліній, проведений за типом стерильності (класифікація Оуена), показав, що понад 80% їх були повністю стерильними, 19% — стерильними І типу (табл. 1).

Наступні дослідження проводили лише з біотипами ЧС-0-типу, а рослини ЧС-I-типу і ЧС-II було вибракувано.

Установлено чітку диференціацію селекційних матеріалів за кількістю утворених апоміктичних зародків і наступного формування насіння. У простих гібридах ці показники майже вдвічі перевищували відповідні показники в самозапильних лініях (табл. 2)

Одержаний насіннєвий матеріал перевіряли

за плідністю з використанням методів флуоресцентної цитофотометрії (табл. 3).

За результатами досліджень, рослин А<sub>1</sub> диплоїдного рівня генома — лише 13,12% (табл. 3).

Співвідношення клітин за плідністю змінювалося залежно від структури міксоплоїдної популяції. Кількість міксоплоїдів, де пік ДНК на каналі 200 од. був більшим диплоїдного піку ДНК на каналі 100 од., становила 56,26% усього проаналізованого матеріалу. Міксоплоїди, у яких пік ДНК на каналі 100 од. був більшим за середнє значення інтенсивності флуоресценції на каналі 200 од., становили 25,37%. Було виявлено рослини, де клітинна популяція включала клітини за плідністю 1,5х; 3х; 6х, їх кількість становила 1,17%. Лише 2 рослини А<sub>1</sub> були повністю триплоїдної форми. Щоб пояснити природу формування триплоїдних зародків рослин А<sub>1</sub>, необхідно продовжити дослідження їхнього ембріонального розвитку.

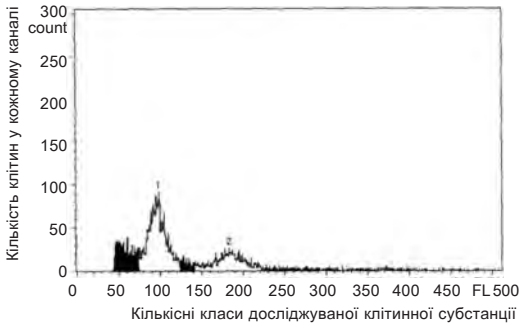
Аналіз гістограм ядерної ДНК АП «Partec» свідчить про те, що для контрольних рослин цукрових буряків диплоїдної форми пік ДНК відповідав 97 од. за коефіцієнтом варіації CV — 8,5% на каналі 100 та класу клітин з подвійним умістом ядерної ДНК 183,04 од. на каналі 200 (рис. 1).

Міксоплоїдному стану генома х; 2х; 4х відпо-

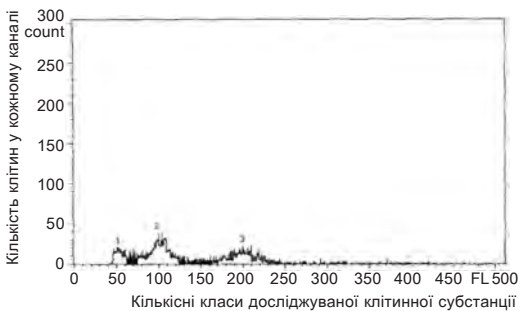
**3. Аналіз клітинних популяцій за плідністю на буряках першого року вегетації у апоміктичних пилкостерильних ліній з використанням АП «Partec» (Ялтушківська ДСС, 2009 р.)**

Кількість рослин, шт.	Розподіл за кількісним умістом ядерної ДНК					
	2х, % P±mp	3х, % P±mp	Міксоплоїди, %			
			1,5х;3х;6 P±mp	х; 2х; 4х P±mp	2х>4х; 8х P±mp	4х>2х; 8х P±mp
343	13,12±1,82	0,58±0,41	1,17±0,53	3,50±0,99	25,37±2,40	56,26±2,67

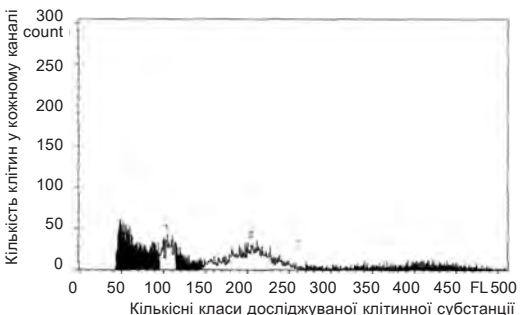
Примітка. 1,5х; 3х; 6х — міксоплоїдна популяція із середнім значенням інтенсивності флуоресценції на каналах 75; 150; 300; х; 2х; 4х — міксоплоїдна популяція із середнім значенням інтенсивності флуоресценції на каналах 50; 100; 200; 2х; 4х; 8х — міксоплоїдна популяція із середнім значенням інтенсивності флуоресценції на каналах 100; 200; 400 од.



**Рис. 1. Диплоїдний рівень генома цукрових буряків, визначений на АП «Partec» з інтенсивністю флуоресценції 97 і 183,04 од.**



**Рис. 2. Гістограма ДНК міксоплоїдної популяції клітин листків ЧС форми цукрових буряків, визначена на АП «Partec» за інтенсивністю флуоресценції 53,29; 100,25; 199,32 од.**



**Рис. 3. Міксоплоїдний стан генома клітин листків цукрових буряків А<sub>1</sub>, інтенсивність флуоресценції 105,44; 203,28 од.**

відає популяція клітин із середнім значенням інтенсивності флуоресценції на екрані АП «Partec» 53,2; 100,25; 199,32 од. (рис. 2).

Масова частка клітин на каналі 200 од. становила 31,26% і втричі перевищувала їхню кількість з диплоїдним рівнем генома на каналі 100 — 10,11%.

Популяція клітин листків цукрових буряків, якій відповідає структура за рівнем генома 2х; 4х; 8х, має середнє значення інтенсивності флуоресценції 105,44 од. на каналі 100 при CV — 7,82% і 203,28 — на каналі 200 од. при CV — 11,44% (рис. 3).

Проведений цитогенетичний аналіз рослин А<sub>1</sub> з використанням нового методу флуоресцентної цитофотометрії свідчить про те, що поряд із домінуючою фракцією клітин, трапляються клітини, де число хромосом у ядрах більше основного в 2—3 рази. Одним зі шляхів виникнення міксоплоїдії клітин, мабуть, є ендомітоз (редуплікація хромосом, що не супроводжується каріокенезом). В іншому випадку утворюються ендополіплоїдні клітини, у яких число хромосом збільшено в 2—3 рази порівняно з основним набором. Використання нового методу, аналізу плоїдності в лінії з ЦЧС, дало можливість зафіксувати другий шлях утворення поліплоїдних клітин — редукцію числа хромосом у соматичних клітинах, у результаті яких утворюються ендогоплоїдні клітини. Нині цю проблему нестабільності генома вивчають інтенсивно в різних напрямках біологічної науки. Відзначають, що при збільшенні кількості міксоплоїдності виникає ймовірність потрапляння поліплоїдних клітин на зародковий шлях і формування поліплоїдних мега- і мікроспор із соматичних клітин [4].

Ідея про зв'язок міксоплоїдії і гамет із соматичним числом хромосом була викладена ще в 30-х роках минулого століття. Уперше взаємозв'язок між мінливістю ядерних ознак у популяціях клітин і мінливістю репродуктивних ознак рослин був доведений у дослідженнях [7]. Установлено, що в умовах безпилкового режиму потомство рослин цукрових буряків може бути представлено гаплоїдами, дигаплоїдами та міксоплоїдами.

Слід зазначити, що насіння, утворене на рослинах А<sub>1</sub>, має високу схожість, що підтверджено в дослідах, проведених нами на Ялтушківській ДСС.

## Висновки

Уперше на основі широкомасштабних наукових досліджень визначили параметр стресових факторів для апоміксису в цукрових бу-

ряків. Визначено придатність нового методу флуоресцентної цитофотометрії для вивчення зв'язку міксоплоїдії клітинних популяцій з

утворенням зародків і насіння. Характер міксоплоїдії у пилкостерильних ліній і простих гібридів цукрових буряків ЯДСС залежав від структури клітин за ступенем плідності.

Виділений новий вихідний матеріал потребує і надалі глибокого теоретичного й практичного вивчення з використанням ембріологічних та цитогенетичних методів.

## Бібліографія

1. Богомолов М.А. Особенности использования апомиксиса у сахарной свеклы при создании нового исходного материала/М.А. Богомолов//Сах. свекла. — 2008. — № 5. — С. 18—20.
2. Захариев А. Состояние проблемы апомиксиса у сахарной свеклы и возможности его использования в селекции/Захариев А.//Verbesserung der Keimfähigkeit monokarper, poliploider Zuckerruben durch genetische, züchterische und aufbereitungstechnische Methoden sowie Züchtung auf Beregnungseigung bei Zuckerruben. — Akademie der landwirtschaftswissenschaften der deutschen demokratischen republic, 1976. — S. 77—93.
3. Малецкая Е.И. Экспрессия признака ЦМС в зиготических и апозиготических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)/Е.И. Малецкая, С.С. Юданова, С.И. Малецкий//Эпигенетика растений: Сб. науч. тр. — Новосибирск, 2005. — С. 223—234.
4. Малецкий С.И. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток и ее влияние на репродуктивные признаки у покритосеменных растений/С.И. Малецкий, Я.С. Колодяжная//Успехи совр. генетики. — 1999. — 119, № 2. — С. 128—143.
5. Роїк М.В. Аналіз мінливості рівня плідності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технологій аналізатора плідності «Partec»/М.В. Роїк, Н.С. Ковальчук, Л.В. Алексійчук. — К., 2006. — С. 39.
6. Ширяева Э.И. Методические указания по цитозмбриологическим исследованиям в селекции сахарной свеклы/Ширяева Э.И. — К., 1984. — С. 61.
7. Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками: автореф. дис. на соиск. науч. степ. канд. биол. наук/С.С. Юданова. — СПб: ГНЦ ВНИИР им. Вавилова, 2004. — 19 с.
8. Barocka K.-H. Die Sektion Corollinae der Gattung Beta L.Z. Pflanzenzucht, Hamburg 56, 1966. — S. 379—388.
9. Owen F.V. Cytoplasmikaly inherited male sterility in sugar beet//Agric. Res. — 1945. — V. 71(10). — P. 423—440.
10. Cleij de Bock T.S.M., Lekkerkerker B. Crosses between Beta intermedia Bunge and B. vulgaris L. Euphytica. — Wageningen. — 1968. — № 17. — S. 11—20.
11. Filytowicz A. Dalke Hybrides interspecificues dans la Section Corollinae du genre Beta 32 Congres dhaver, Session 1, Rapport 1, 1969.
12. Levan A. Hereditas, Lung 31, 1945. — S. 399—400.
13. Krause A., Arsser K. Vet Land Uajck. — 1961. — S. 87—98.