

С.П.Білогородська-Череднічок,
Г.І.Ярмолюк, А.І.Бедренко

АКУМУЛЯЦІЯ ЕЛЕМЕНТІВ АПОМІКСИСУ У ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Апоміктичне розмноження використовується для закріплення ефекту гетерозису і для відновлення сортів, які вироджуються, а також з метою введення окремих адаптивних змін.

Апоміксис у покритонасінних - це наслідок прогресуючого ускладнення фенотипічних умов життя, яке призводить до редукції гаметофіту і втраті статевого розмноження (1).

Апоміксис успішно вирішує важливе завдання, забезпечує стабільний та високий коефіцієнти насінневого розмноження і зберігає його переваги (2). Апоміктам властиві: генетична однорідність, велика життєздатність та конкурентноспроможність, а також висока насіннева продуктивність.

Через відсутність генетичного розщеплення врожайність апоміктів завжди залишається високою в ряді наступних поколінь (3).

Експериментальне створення апоміктичних форм відкриває великі перспективи перед селекцією та насінництвом. Можливість експериментального створення регулярного апоміксису культурних форм стримується відсутністю загальної теорії апоміксису. І тільки після широкого вивчення генетичних факторів Пауерса з'явилась можливість створення апоміктичних сортів.

Вчені стверджують, що регулярне апоміктичне розмноження залежить від певних співвідношень різноманітних елементів апоміксису (5, 6).

Апоміксис вважають генетично детермінованим процесом, що контролюється більшою мірою рецесивними генами та характеризується простим успадкуванням та облігатною експресією (3).

Перші відомості про розмноження апоміктичним шляхом диких видів роду *Beta* належать К.Барока.

Голландські вчені Г.Клей та Г.Бок провели схрещування цукрових буряків з диким апоміктичним видом *Beta*

intermedia. На думку польських дослідників, най-більш характерною рисою рослини *Beta lomatogona* є утворення апоспоричних зародкових мішків (4).

Появу однорідного потомства цукрових буряків Н.В.Фаворський (1928 р.) пояснив апоміксисом, але при цитоембріологічному вивченні матеріалу, проведеного Є. Артшвагером (1927 р.), не було знайдено ніяких порушень в мейозі та ембріогенезі, які вказували б на апоміксис (5).

Н.Е.Зайковська (1974 р.) вперше знайшла апоміксис при цитоембріологічному вивченні селекційних матеріалів з генною чоловічою стерильністю (ГЧС) та анеуплоїдів (6).

В 80 роки Е.І.Ширяєва та Г.І.Ярмолюк знайшли апоміксис серед дигаплоїдних матеріалів та Інцухт-ліній.

В 90 роки Г.І.Ярмолюк та С.П.Білогородською-Череднічок були продовжені дослідження на самофертильних лініях А.І.Бедренко, які спрямовані на розробку методів одержання, стабілізації та пошуку нових елементів апоміксису (7).

Дослідя проводились на однонасінних диплоїдних самофертильних лініях сорту Ялтушківської станції (18-1291), створених А.І.Бедренко та переданих нам для вивчення в 1991 р., серед яких раніше (1984 р.) цитоембріологічно Е.І.Ширяєва виділила 6 номерів з нуцелярними зародками (від 3,0 до 14,0 %).

Використовувались різні способи запилення: вільне, примусове, самозапилення (під індивідуальними ізоляторами кастрацію з наступним цілеспрямованим запиленням і без запилення (безпилковий режим). Цитоембріологічні дослідження проводили з допомогою методики прискореного вивчення ембріонального розвитку насіння на мікроскопі МБС-1 із збільшенням ($8^x \times 4^x$) та $8^x \times 2^x$.

Мейоз і ступінь дефектності пилку вивчали на мікроскопі із збільшенням $10^x \times 90^x$, $15^x \times 90^x$ і $7^x \times 40^x$ (методика Г.І.Ярмолюк та С.С.Хохлова). Для виділення апоміктичних біотипів застосували гібридологічний аналіз, а також метод синтезу.

Одним із основних є цитоембріологічний метод, який дозволяє точно визначити механізми, які перешкоджають заплідненню. В 1984 р. Е.І.Ширяєва виділила 6 номерів з

адвентивною ембріонею (табл. 1) серед самофертильних ліній
А.І.Бедренко.

Таблиця 1
Характеристика ліній з адвентивною ембріонею

Індукт-ліній	Ембріологічний аналіз	
	утворення двох зародків, %	нуцелярна ембріонія, %
$\frac{93}{84}$ T ₄ 1 ¹ 1 ЯоС-К	-	3,0
$\frac{103}{84}$ T ₄ 1 ¹ 1 Яо С-К	1,9	5,2
$\frac{131}{84}$ T ₂ 1 ¹ 2 Яо С-К	-	14,0
$\frac{190}{84}$ T ₂ 1 ¹ 2 Яо	-	13,7
$\frac{191}{84}$ T ₂ 1 ¹ 2 Яо	-	5,2
$\frac{182}{84}$ T ₄ Яо	-	13,9

Як видно з даних таблиці 1, адвентивних зародків у цих ліній було від 3, до 14 %.

Цей матеріал використали для подальшого цитоембріологічного та генетичного вивчення з метою створення форм із стійким апоміксисом.

У таких культур як сорго, цитрусові, малина, манго уже створені за допомогою синтезу складні гетерозиготні апоміктичні клони, які з успіхом використовуються в промислових посівах, як нові апоміктичні сорти.

На протязі 1993-1996 років нами проведено синтез ліній з елементами апоміксису, а також схрещування між собою відібраних ліній за комплексом ознак.

В результаті синтезу зав'язування насіння в ізоляторах залишалось високим (80-95 %), якість пилку не поліпшувалась;

разом з дрібним, стерильним пилок (11,6-14,5 мікронів), зустрічались надто великі пилкові зерна (28,0-36,2 мікронів), а також нередукований пилок.

Відомо, що випадіння редуційного ділення в анафазі I є одним з елементів апоміксису і головним фактором при переході на апоміктичний спосіб розмноження. В 1995 р. у 10 % ліній поряд з дрібним, стерильним пилок виявлена значна кількість (від 3 до 10 %) дуже великих нередукованих пилкових зерен асиметричної, еліпсоїдної та арахісоподібної форм.

Окремі номери характеризувались високим зав'язуванням насіння при безпилковому режимі (табл. 2).

Таким чином, при синтезі спостерігається тенденція елементів апоміксису. Якщо у 6 номерів (1984 р.) найбільша кількість апоміктичних зародків не перевищувала 14,0 %, то в результаті відбору 1991-1996 рр. здатність утворювати апоміктичні зародки досягає у окремих субліній 50-70 %.

Для виявлення апоміктичних зародків провели гібридологічний аналіз насіння від примусового запилення з червоними столовими буряками (Bordo).

Співвідношення гомо- та гетерозигот при гібридологічному аналізі було 1:5, тобто 1 частка зелених зародків та 5 часток з рожевим гіпокотилем. Зелені зародки відтворювали фенотип вихідної материнської лінії і мали диплоїдний набір хромосом ($2n = 18$). Забарвлені в червоний колір рослини виникали від заплідненої яйцеклітини. Зелені рослини утворились апоміктичним шляхом з клітин нуцелуса чи інтегументів, або шляхом апоспорії.

Апоміктичні лінії характеризувались порушеннями мейозу, починаючи з кон'югації хромосом, в результаті чого на стадії діакінезу і метафази - I поряд з бівалентами утворювались уніваленти і поліваленти (від 7,7 до 19,8 %). Спостерігався нерівномірний розподіл хромосом до полюсів в анафазі I і II, утворення мостів, появи хромосом, які відстають у розвитку, та викинуті в цитоплазму (від 4,7 до 26,3 %).

За даними тетрадного аналізу 1/3 номерів мала аномальні тетради і поліади (від 3,5 до 23,2 %). Крім того, на стадії тетрад спостерігались поодинокі випадки цитоміксису та елімінації тетрад. Наявність пентад і гексад досягала у окремих номерів 17,4 % (рис.1).

Таблиця 2

Кількість апоміктичних зародків в процесі ембріогенезу на 28 день
стадії розвитку зародка

Матеріали	Плід-ність	Спосіб заплідненя	Кількість зародків, шт.	Стадії розвитку зародка на 28 день після заплідненя					Апоміктичні зародки			
				Гідність заплідненя	Огарето-плідність зародка	Зародок на куля	Зародок на 1/4 і 1/2 зародкового мішка	Зародок на 3/4 зародкового мішка	Повністю розвинутий зародок	Богові зародки	Середнє положення зародку	Утворення зародка
Лінія 42/937		самозаплідненя безпилковий режим	200	1,4	3,4	2,6	7,2	41,8	-	42,8		
			45	-	-	-	-	-	-	-		
Лінія 60/939		самозаплідненя безпилковий режим	184	3,5	8,7	3,2	14,5	30,5	1,8	36,6		1,2
			53	72,0							28,0	
Лінія 12/936 /мутация мікропіле/		самозаплідненя безпилковий режим	234	6,7	2,9	1,8	20,1	24,8	2,1	21,6		
			43									
Лінія 56/935		самозаплідненя безпилковий режим	259	0,8	1,4	20,1	9,4	27,8		40,1	0,8	
			45	61,0						39,0		
Лінія 49/930		самозаплідненя безпилковий режим	296	12,3	8,1	6,4	7,2	15,0	0,8	49,4		0,8
			55									
Лінія 21/931		самозаплідненя безпилковий режим	351	4,8	3,6	1,6	11,8	23,4		49,1	0,6	2,2
			47	58,0						42,0		
Лінія 53/932		самозаплідненя безпилковий режим	219	11,3	3,9	1,5	4,8	32,4		44,2		
			49	60,0						40,0		

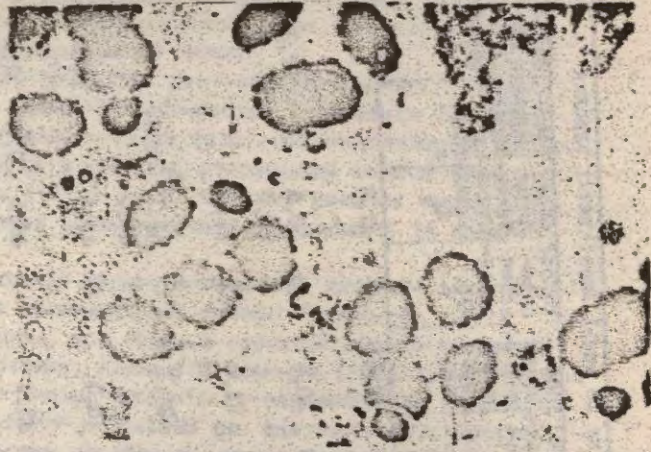


Рис. 1. Пентади, що утворились внаслідок порушень мейозу.



Рис. 2. Апоміктичний зародок у вигляді "шара", що утворився в мікропілярній частині зародкового мішка над половим зародком у формі "булави".



Рис. 3. Апоміктичний зародок, що утворився в середині зародкового мішка.



Рис. 4. Апоміктичний зародок розвернутий до мікропіле.

Порушення в мейозі приводять до утворення стерильного пилку, мікронуклеусів та дуже великих пилкових зерен. Аналізи на пилковий тест показали, що 50 % субліній мали дуже високу стерильність пилку (від 50 до 100 %), біля 30 % номерів від 3 до 49 %. Редукція андроцею та гінецею свідчить про високу ступінь апоміктизації. Знайдені рослини цукрових буряків з редукцією клітки у вигляді атрофії андроцею. У таких рослин, як правило, спостерігалось утворення матроклітинних зародків.

Ембріологічний метод показав, що у цукрових буряків з елементами апоміксису, крім нормальних зародкових мішків *Polygonum*-типу, формувались недиференційовані зародкові мішки, а також мішки, у яких яйцевий апарат бідний нуклеоплазмою.

Адвентивні (нуцелярні і інтегументальні) зародки виникали із збагачених ДНК ініціальних клітин, які розміщені з країв нуцелуса, або з багатих ДНК соматичних клітин інтегументів.

Нуцелярні зародки не мали підвіски і формувались поблизу мікропіле (рис. 2).

Перетворення "самоциту" у власне зародок проходило без послідовного клітинного поділу. Спочатку розвивались зародки неправильної форми і морфологічно невизначні. Наступні етапи органогенезу були подібні до фаз розвитку статевих зародків.

При нуцелярній ембріонії зародки ростуть і розвиваються, використовуючи живильні речовини нуцелуса. На всіх ступенях розвитку нуцелярні зародки не утворюють підвісок. При інтегументальній ембріонії зародки розміщувались в середині (рис. 3), зустрічалось порушення полярності, коли сім'ядолі звернуті в мікропілярну сторону (рис. 4).

За даними цитоембріологічного аналізу біля 60 % рослин мали від 2,6 до 72,4 % нуцелярних і інтегументальних зародків. До 4,0 % рослин поряд з амфіміктичними утворювали апоміктичні зародки із клітин антипод (апогаметія), або із соматичних клітин нуцелуса чи інтегументів.

Із даних таблиці 2 видно, що в дослідженнях переважає адвентивна ембріонія.

Акумуляція цієї ознаки на протязі кількох років дозволила збільшити кількість адвентивних зародків в потомстві

них номерів від 31,8 до 49,1 %.

Результати наших досліджень свідчать: - для утворення і розвитку апоміктичних зародків необхідне запліднення центральної клітини зародкового мішка і утворення ендосперму,

- самофертильні форми цукрових буряків з поглибленням індухту характеризуються порушеннями на різних стадіях мейозу, особливо в I і II анафазах;

- для утворення і розвитку апоміктичних зародків необхідне запліднення центральної клітини зародкового мішка і утворення ендосперму;

- в результаті застосування методу скрещування ліній з елементами апоміксису та відбору, здатність утворювати апоміктичні зародки збільшується, досягаючи у окремих ліній 50-70 %.

Література

1. Хохлов С.С. Исторические предпосылки и эволюционное значение апомиксиса покрытосеменных // Доклады АН СССР, новая серия. - 1946. - т. 52. - № 9. - С. 811-814.

2. Oz iass Akins F., Hanna W.W. Molecular characterization of an apomictic back cross hybrid derived from *Pennisetum glaucum* and *P. Squamulatum* // 9. Cell Biochem. 1991. Supplem. 15.a -P. 137.

3. Франке Р. Апомиксис и полиплоидия // С.-х. биология. - 1988. - № 4. - В. 99-108.

4. Filutewic A., Dalke L. Mieszance buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) Z. Beta lomatogona F. et M. // Hod. Rosl. Akl. i Nas. - 1969. - T. 13, z. 3. - S. 257-265.

5. Knapp E. Apomixis bei der Zuckerrübe? // Pflanzenzüchtung. - 1975. - 7. - S. 1-9.

6. Зайковская Н.Э., Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Апомиксис у сахарной свеклы // III съезд ВОГиС. Тез. докл. - Л. - 1977. - Ч.1. - С. 184-186.

7. Белгородская-Чередицек С.П. Экспериментальный апомиксис у сахарной свеклы // Пути повышения эффективности свеклосахарного производства России в условиях рыночной экономики. - Рамонь. - 1996. - Ч.1. - С. 2-3.