

Т.В. ЧУГУНКОВА,
І.І. ЛЯЛЬКО, О.В. ДУБРОВНА

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТЕТРАПЛОЇДНИХ ЗАПИЛЮВАЧІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ



Проведено цитогенетичний моніторинг та аналіз морфологічних особливостей рослин штучно створеної тетраплоїдної популяції (C₄) цукрових буряків. За якістю пилку виділено чотири типи тетраплоїдів. Показано, що насіння триплоїдних гібридів, одержане від запилення диплоїдів тетраплоїдними формами з I та II типом пилку, відрізнялося підвищеною енергією проростання та схожістю.

© Т.В. ЧУГУНКОВА, І.І. ЛЯЛЬКО, О.В. ДУБРОВНА, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 1

Вступ. Висока насіннева продуктивність триплоїдних гібридів цукрових буряків залежить від генетичних особливостей тетраплоїдних запилювачів, які значною мірою обумовлені характером формування вихідної популяції.

Штучне створення поліплоїдів традиційно здійснюється колхіцинуванням відселектованих диплоїдних матеріалів [1]. Останнім часом проводяться спроби отримання тетраплоїдів в культурі *in vitro* із застосуванням як колхіцину, так і антимікротрубочкових гербіцидів, таких як аміпрофосфатил, оризалін, пронамід та трифлурамін [2, 3]. Проте обмежена кількість отриманих базових рослин призводить до звуження генетичного різноманіття в популяції.

Відомим фактом є те, що штучно одержані поліплоїди повертаються до диплоїдного стану [1, 4]. У таких випадках поява диплоїдних та триплоїдних рослин призводить до генетичної незбалансованості у популяціях тетраплоїдів, що обумовлено порушеннями процесів мейозу і формування гамет у триплоїдних форм. Була виявлена пряма залежність між правильністю проходження мейозу, збалансованістю числа хромосом в гаметах, схожістю насіння і загальною насінневою продуктивністю [5]. У той же час селекційною практикою доведено, що добір за комплексом морфологічних ознак та постійний цитологічний контроль за рівнем плоідності рослин призводить до стабілізації та загального покращання тетраплоїдної популяції буряків.

Метою нашої роботи було цитогенетичне та морфологічне дослідження штучно створеної популяції поліплоїдних рослин цукрових буряків (C₄) та оцінка схожості гібридного насіння, отриманого за їхньої участі.

Матеріали та методи. Популяція тетраплоїдних рослин була отримана колхіцинуванням багатонасінневих самозапильних ліній цукрових буряків, відібраних за рядом господарсько-корисних ознак за загальноприйнятою методикою [1, 5]. У результаті чотирьох циклів добору отримали популяцію C₄ тетраплоїдного багатонасінневого запилювача.

Насінники аналізували за морфологічними ознаками, які корелюють з врожайністю та якістю насіння: формою насінника, щільністю розташування суцвіть на пагонах, характером росту квітконосних пагонів, пилкоутворюючою здатністю рослин.

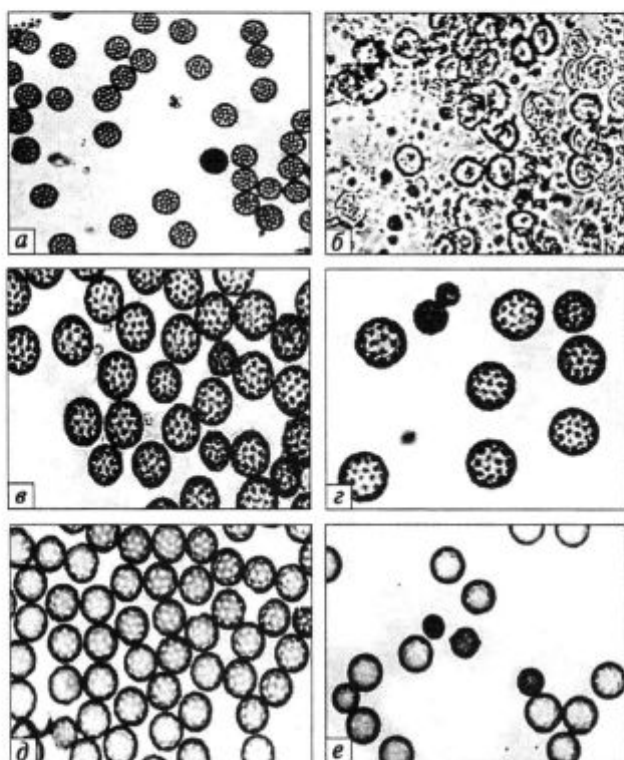


Рис. 1. Типи пилку рослин буряків: а — 2х; б — стерильний пилкок; в — 4х I типу; г — 4х II типу; д — 4х III типу; е — пилкові зерна рослин IV типу

Цитологічні препарати для підрахунку кількості хромосом у меристемі первинних корінців, а також визначення характеру порушень на різних стадіях мейозу готували за стандартною методикою [6] і аналізували під мікроскопом «Amplival» (Carl Zeiss, Jena, Німеччина). Загальне збільшення мікроскопа становило 100×16 . В польових умовах якість та морфологічні особливості пилку визначали за допомогою мікроскопа МБД-1. Пилкок забарвлювали 2%-вим ацетокарміном. Проводили штучне запилення чоловічостерильної (ЧС) форми пилком тетраплоїдних рослин різних

типів з наступною ізоляцією. Енергію проростання насіння триплоїдних гібридів визначали на 4-й день після висіву, а схожість — на 7-му добу в лабораторних умовах за трьохкратної повторності. Одержані дані обробляли статистично [7].

Результати досліджень та їх обговорення. На перших етапах роботи було отримано біля 100 тетраплоїдних рослин, які протягом кількох років розмножували шляхом вільного переапилення з одночасним доббором за рівнем плоїдності, якістю пилку та морфогенетичними ознаками. Постійні добори та браковка форм з диплоїдним, триплоїдним та анеуплоїдним числом хромосом дозволили підвищити кількість тетраплоїдних форм з 68 % в S_1 до 93 % в S_4 . Важливим етапом на шляху становлення популяції як тетраплоїдного запилювача була перевірка рівня плоїдності методом масового цитоаналізу насіння тетраплоїдів S_5 в лабораторних умовах. Аналізували від одного до трьох первинних корінців на клубочок. Цитологічний аналіз кількості хромосом у меристематичних клітинах корінців засвідчив, що створена популяція практично на 95 % складається з тетраплоїдів, загальна кількість триплоїдів та анеуплоїдів становила 4,9 % (табл. 1).

Відомо, що дозрілий пилкок цукрових буряків триядерний з двома серпоподібними сперміями, вегетативним ядром, з добре розвинутою екзиною [8, 9]. Фертильні пилкові зерна тетраплоїдів великі, їх розмір коливається від 25 до 50 мкм, на півсфері міститься 12–20 пор проростання. У той же час диплоїдні рослини мають значно менший за розміром пилкок (20–22,5 мкм) з 7–10 порами на півсфері (рис. 1, а). Пилкок триплоїдних та анеуплоїдних рослин представлений сумішшю фертильних та стерильних зерен у різних співвідношеннях. Серед фертильного пилку цих форм зустріча-

Таблиця 1

Результати цитологічного аналізу тетраплоїдів S_5

Проаналізовано всього	Тетраплоїди		Триплоїди та анеуплоїди		Диплоїди	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
2250 корінців	2135	$94,8 \pm 0,5$	109	$4,9 \pm 0,6$	6	$0,3 \pm 0,1$
1790 насінників	1608	$89,9 \pm 0,7$	178	$9,9 \pm 0,7$	4	$0,2 \pm 0,1$

ється пилком, морфологічно ідентичний пилку диплоїдних та тетраплоїдних рослин. Стерильні пилкові зерна також варіюють за розмірами залежно від стадії їх деградації і відповідають одно- або двоядерному пилку (рис. 1, б).

Виходячи із морфологічних особливостей пилкових зерен ди-, три- та тетраплоїдних рослин був проведений аналіз досліджуваної популяції за рівнем плоїдності у польових умовах під час масового цвітіння буряків.

З'ясовано, що тетраплоїди складали 89,9 % (табл. 1). Серед досліджених насінників було виявлено 0,2 % диплоїдів із 100%-вою фертильністю, а також 9,9 % рослин, які характеризувалися невірним розміром пилком або мали значну кількість стерильних пилкових зерен. Такі форми були віднесені нами до триплоїдів. Різницю між кількістю тетраплоїдних форм, визначених у лабораторних та польових дослідженнях, можливо пояснити тим, що при визначенні рівня плоїдності за морфологією пилкових зерен до триплоїдів та анеуплоїдів могли бути віднесені рослини з невірним пилком, які за результатами цитологічного аналізу первинних корінців ідентифікувалися як тетраплоїди.

Слід зазначити, що фертильність пилку більшості тетраплоїдних рослин дослідженої нами популяції була високою. Разом з тим варіювання пилкових зерен за розмірами та особливості процесу мейозу у різних рослин дозволили виділити чотири типи тетраплоїдів.

До першого типу були віднесені рослини з великими (біля 50 мкм), вирівняними пилковими зернами, кількість яких складала 98 % (рис. 1, в). Кількість рослин з даним типом пилку в проаналізованій популяції становила більше 70 %.

Тетраплоїди другого типу мали до 85 % великих пилкових зерен (рис. 1, г). Поряд з ними

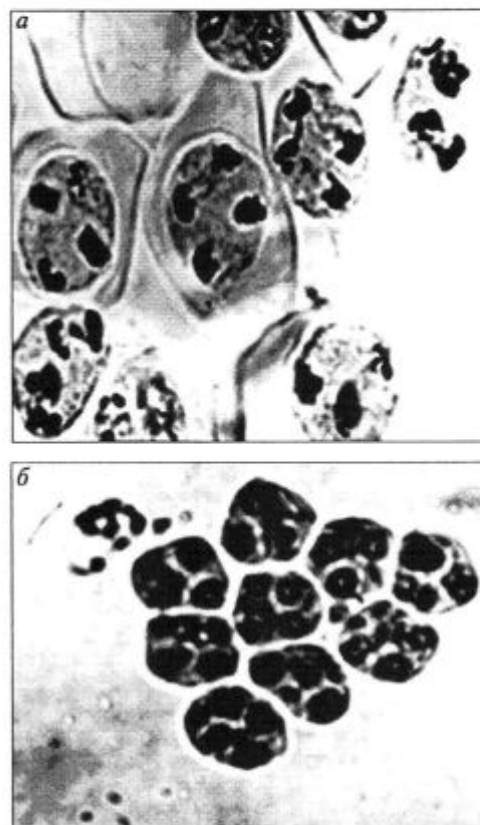


Рис. 2. Порушення мейозу у тетраплоїдних рослин: а — на стадії анафази II; б — тріади та пентади на стадії тетрад

зустрічалась невелика кількість (до 10–12 %) маленьких зерен диплоїдного типу і окремі незабарвлені стерильні пилкові зерна. Такі генотипи відзначалися з частотою 15 %.

Третій тип складали тетраплоїдні рослини з середніми за величиною (біля 30 мкм) пилковими зернами (рис. 1, д). Їх кількість коливалась від 60 до 70 %. Поряд з таким пилком у різних співвідношеннях зустрічалися великі (біля 50 мкм і більше), маленькі (диплоїдного

Таблиця 2

Частота порушень мейозу на стадіях AI і AII у рослин буряків різної плоїдності, %

Плоїдність рослин	Кількість, шт.		Анафаза I		Анафаза II	
	проаналізованих рослин	досліджених клітин	без порушень	з порушеннями	без порушень	з порушеннями
2x	18	1100	98,3 ± 0,4	1,7 ± 0,4	97,2 ± 0,5	2,8 ± 0,5
3x	15	900	31,1 ± 1,5	68,9 ± 1,5	22,2 ± 1,4	77,8 ± 1,4
4x	21	1150	91,8 ± 0,8	8,2 ± 0,8	90,8 ± 0,9	9,2 ± 0,9

Таблиця 3

Енергія проростання та схожість насіння
триплоїдних гібридів, %

Комбінація схрещування	Кількість проаналі- зованого насіння, шт.	Енергія проростання	Схожість
2х ЧС × 4х I тип	300	96,6 ± 1,0	96,6 ± 1,0
2х ЧС × 4х II тип	300	91,3 ± 1,6	96,6 ± 1,0
2х ЧС × 4х III тип	300	51,0 ± 2,9	81,6 ± 2,2

типу) та стерильні пилкові зерна. Такий тип пилку був ідентифікований у 12 % рослин.

До четвертого типу були віднесені рослини, у яких спостерігалось значне варіювання пилку за розміром (рис. 1, е). При домінуванні середніх за розміром пилкових зерен у таких рослин виявлені надвеликі (> 55 мкм), маленькі (диплоїдного типу) і до 20–25 % стерильних пилкових зерен. Частота зустрічальності таких біотипів була на рівні 3 %. Рослини цього типу, як правило, вибраковували.

У зв'язку з тим, що дегенерація пилку може проходити як на різних стадіях мейозу, так і під час формування гамет, значна частина досліджень була присвячена вивченню саме цих стадій у рослин різного рівня плоїдності. Аналізували мета- та анафази 1-го і 2-го мейотичного поділу та стадію тетрад мікроспор (рис. 2, а, б).

Як засвідчив аналіз, мейоз у тетраплоїдів і диплоїдів проходить без порушень у більшості випадків [10]. У 90 % материнських клітин спостерігали кон'югацію хромосом бівалентами. Поряд з цим зустрічали уні-, три- і квадриваленти. Подібні конфігурації хромосом у метафазі I поділу відзначали й інші дослідники на різних культурах [11, 12]. В той же час у триплоїдних форм кон'югація хромосом дев'ятьма бівалентами практично не спостерігалась. В окремих материнських клітинах пилку була наявна велика кількість унівалентів (до 13 шт. в одній клітині). В анафазі I поділу мейозу у диплоїдів та тетраплоїдів розходження хромосом відбувалося правильно практично у всіх проаналізованих клітинах (табл. 2). Лише у 1,7 % диплоїдів та 5,2 % тетраплоїдів зустрічалися мости та відсталі хромосоми. В той же час у

триплоїдів спостерігали значну кількість порушень (68,9 %) — відставання та злипання хромосом, мости та фрагменти. В еквацийному поділі мейозу, який призводить до остаточного формування мікроспор, відзначалося збільшення хромосомних аберацій, що може бути наслідком порушення поділів на попередніх стадіях.

В більшості випадків у проаналізованих форм буряків в тетрадах міститься по 4 мікроспори, рівні за величиною. Крім того, зустрічалися тріади або пентади. У тетраплоїдів та диплоїдів кількість порушень такого типу була приблизно однакова (біля 3,0 %). У триплоїдів з частотою більше 4 % утворювалися тетради з трьома та п'ятьма ядрами.

У рослин різної плоїдності спостерігалися тетради з мікроядрами, що утворилися у результаті аномалій кон'югації і розходження хромосом на ранніх стадіях мейозу. Такі тетради частіше зустрічалися у триплоїдів (9,5 %), менше у тетраплоїдів (5,7 %) і дуже рідко у диплоїдів (0,5 %).

Таким чином, загальний характер порушень мейозу подібний у ди-, три- і тетраплоїдних рослин. Найбільш чітко порушення фіксуються на стадії тетрад.

Після утворення тетрад в мікроспорах проходять два мітотичних поділи. Внаслідок першого утворюється двоядерний пилкок, після другого — триядерний. Генеративна клітина пилку має сплюснуту форму і інтенсивно забарвлюється. Забарвлення вегетативного ядра або ядра пилкової трубки проявляється в меншій мірі. Дегенерація пилкових зерен, внаслідок чого утворюється стерильний пилкок, як правило, розпочинається у процесі дозрівання мікроспор і при переході до гаметогенезу. За даними більшості авторів, які вивчали процес гаметогенезу у різних форм буряків, утворення стерильного пилку обумовлено у більшості випадків порушенням клітин тапетуму або різних стадій формування клітинної оболонки та іншими аномаліями розвитку пилку [13, 14].

Крім цитологічного контролю за рівнем плоїдності та якістю пилку, у тетраплоїдів проводили добір насінників за морфологічними ознаками.

Бурякам притаманні одно- та багатостеблові форми насінника. Перші відрізняються

меншою насінневою продуктивністю порівняно з другими [15]. Тому більшість одностеблових рослин вибраковували. Видаляли також насінники, у яких щільність розташування суплідь була 11 мм і більше. Такі рослини дають незначну кількість насіння з низькими посівними якостями. Найбільшу увагу приділяли пилкоутворюючій здатності і типу росту квітконосів. Нами експериментально доведено, що найбільшою пилкоутворюючою здатністю характеризувалися рослини, віднесені до I та II типів тетраплоїдів.

Слід зазначити, що у буряків виділена генетично обумовлена ознака обмеженого росту квітконосних пагонів, яка сприяє покращанню якості насіння [16, 17]. Дана ознака має рецесивний характер і контролюється дигенно [18–20], тому передача її іншим матеріалам при гібридизації потребує строгого контролю. Оскільки серед вихідних матеріалів використовували лінії, рослини яких мали детермінантний габітус насінника, добір за даною ознакою проводили протягом декількох років. Аналіз створеної популяції запилювача показав, що вона складається з рослин, більша частина пагонів яких має обмежений ріст, що обумовлює вирівняність насіння за строками дозрівання і високі показники схожості.

В подальшому тетраплоїдні рослини I та II типів були використані як батьківські форми триплоїдних гібридів на ЧС основі. Насіння одержаних гібридних комбінацій оцінювали за енергією проростання і схожістю (табл. 3). Дослідження показали, що якість триплоїдного насіння, одержаного від запилення ЧС форм тетраплоїдами I та II типів, практично не відрізняється і відповідає вимогам виробництва. Це свідчить про те, що у рослин цих груп мікроспорогенез проходить без порушень та з утворенням гамет, які мають диплоїдний набір хромосом.

Таким чином, постійний цитологічний контроль за рівнем плоїдності рослин, характером протікання мейозу та аналіз якості пилку призводять до стабілізації штучно створеної тетраплоїдної популяції за цими показниками. Проаналізовану нами популяцію тетраплоїдів C_3 можна вважати відселектованою і використовувати як батьківський компонент триплоїдних гібридів цукрових буряків.

SUMMARY. Cytogenetical monitoring and analysis of plant morphological features of artificially created sugar beet tetraploid population (C_3) were conducted. Four types of tetraploids differing in pollen quality were selected. It was shown that seeds of triploid hybrids received from diploid plants cross-fertilised by tetraploids were notable for increased germinating capacity.

РЕЗЮМЕ. Проведен цитогенетический мониторинг и анализ морфологических особенностей растительного искусственно созданной тетраплоидной популяции (C_3) сахарной свеклы. По качеству пыльцы выделено четыре типа тетраплоидов. Показано, что семена триплоидных гибридов, полученные от опыления диплоидов тетраплоидными формами с I и II типом пыльцы, отличались повышенной энергией прорастания и всхожестью.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шевцов И.А. Генетические принципы улучшения аутотетраплоидных растений. — Киев : Наук. думка, 1976. — 215 с.
2. Hansen A., Gertz A., Joersbo M. Antimicrotubule herbicides for in vitro chromosome doubling in Beta vulgaris L. ovule culture // Euphytica. — 1998. — 101, № 2. — P. 231–23.
3. Бех Н.С. Отримання тетраплоїдних форм багатонасінних цукрових буряків в умовах in vitro // Наукові основи виробництва цукрових буряків та інших культур бурякової сівозміни в сучасних економічних та екологічних умовах : Зб. наук. пр. ІЦБ. — Київ, 1998. — С. 26–28.
4. Болелова З.А., Кирсанова Ю.В. Генетические и цитозембриологические аспекты жизнедеятельности семян сахарной свеклы // Генетические исследования сахарной свеклы. — Киев : ВНИС, 1991. — С. 108–114.
5. Неговский Н.А., Болелова З.А. Результаты генетического изучения полиплоидной сахарной свеклы и использование ее в селекции // Вопросы генетики, селекции и цитологии сахарной свеклы. — Киев, 1971. — С. 5–20.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М., 1988. — 280 с.
7. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. — Минск : Вышэйш. шк., 1974. — 448 с.
8. Балков И.Я. ЦМС сахарной свеклы. — М.: Агропромиздат, 1990. — 239 с.
9. Зайковская Н.Э., Ярмолюк Г.И., Семенюк В.Е. Микроспорогенез и развитие семян у различных форм тетраплоидов сахарной свеклы // Вопросы генетики, селекции и цитологии сахарной свеклы. — Киев, 1971. — С. 38–49.
10. Чугункова Т.В., Шевцов И.А. Цитогенетика сахарной свеклы. — К.: Наук. думка, 1992. — 174 с.