

## **Цитоэмбриологические особенности анеуплоидов в популяциях тетраплоидных форм сахарной свеклы как источник генетически обновленных материалов**

**Перфильева Л.П., кандидат биологических наук**

**Уманский государственный педагогический университет имени Павла Тычины,  
Украина, Черкасская область.**

В статье приводятся результаты цитоэмбриологических исследований по изучению потомства анауплоидов и предлагаются методы генетического обновления сахарной свеклы, путем глубокого изучения анауплоидных потомств и дигаплоидов полученных из тетраплоидной сахарной свеклы.

У статті наведені результати цитоємбріологічних досліджень по вивченню потомства анауплоїдів і пропонуються методи генетичного оновлення цукрового буряка, шляхом глибокого вивчення анауплоїдних потомств і дигаплоїдів одержаних з тетраплоїдноого цукрового буряка.

In the article the results of researches on the study of productivity of posterity of aneuploides are led and the methods of genetic renovation of sugar beet are suggested, by the deep study of aneuploides posterities and digaploides got from the tetraploides sugar beet.

**Ключевые слова:** Геномные нарушения, тетраплоиды, анеуплоиды, дигаплоиды, гаметогенез, мейоз, пыльца, эмбриогенез, зародыш, апомиксис, трисомики, моносомики, нулесомики.

**Ключові слова:** Геномніє порушення, тетраплоїди, анеуплоїди, дигаплоїди, гаметогенез, мейоз, пилок, ембріогенез, зародок, апоміксис, трисомики, моносомики, нулесомики.

**Keywords:** Genom distortions, tetraploid, aneuploidy, dihaploid, gametogenesis, meiosis, pollen, embryogenesis, embryo, apomixic, trisomic, monosomic, nullisomic.

Многолетние эмбриологические исследования тетраплоидных форм сахарной свеклы выявили частое проявление в их потомстве триплоидных и анеуплоидных растений с различным количеством хромосом [1].

Несмотря на отрицательные стороны анеуплоидии, это явление можно использовать в генетических исследованиях, особенно у объектов с хорошим кариологическим строением хромосом для разработки вопросов теоретического и практического характера. Анеуплоидия вызывает нарушения геномного состава растений, что способствует углубленному познанию их генетического строения. При помощи трисомиков, моносомиков и нуллисомиков ведутся большие исследования по изучению генетических функций отдельных хромосом, особенности действия генов и их аллелей [2].

**Цель работы:** Выявить и провести цитологические исследования новых генетически измененных растений среди потомства тетраплоидной и анеуплоидной сахарной свеклы с целью использования их в селекции.

**Методика проведения:** Опыты проводились на базе Уманского государственного аграрного университета (агробиостанция) и Института биоэнергетических культур и сахарной свеклы УААН (г. Киев).

Для изучения были взяты анеуплоидные формы с несбалансированным числом хромосом  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$ , выделившихся из тетраплоидного сорта Белоцерковского происхождения и дигаметоиды  $2n = 18$  (возвратно-риверсивные диплоиды из потомства анеуплоидов). Изучены процессы мейоза, гаметогенеза и эмбриогенеза. Контролем служили обычные тетраплоиды  $2n = 36$  улучшенные по качеству пыльцы  $2n = 36$  (тип 1) и тетраплоиды  $2n = 36$  с плохим качеством пыльцы (тип 2). Методы учёта и цитозембриологических анализов сделаны по общепринятой методике [5].

**Результаты проведенных исследований** показали, что в мейозе анеуплоидных растений наблюдается ряд отклонений в конъюгации хромосом, что на стадии диакинеза выражается в образовании, кроме квадрилентов и бивалентов, унивалентных хромосом. Характер конъюгации хромосом определяет прохождение дальнейших стадий мейоза. Наличие унивалентов в диакинезе ведёт к нарушениям метафазы I, анафазы I и сопровождается беспорядочным разбросом хромосом и неодновременным их продвижением к полюсам. В

интеркинезе встречаются хромосомы, выброшенные в цитоплазму.

Наблюдается блокирование работы веретена, когда хромосомы делятся, но не расходятся к полюсам, что приводит к образованию на стадии тетрад микроспор от 3 до 9 ядер.

При изучении гаметогенеза у анеуплоидов с 28, 34, 39 хромосомами были обнаружены неправильные митозы в пыльцевых зёрнах. У полюсов часто наблюдаются группы, различающиеся по числу хромосом; количество спермиев в микроспорах или увеличивается до трёх-четырёх или они совершенно не формируются. Иногда вместо двухклеточных гаметофитов со специфическим строением вегетативной и генеративной клеток возникают два одинаковых ядра, напоминающие вегетативные. Одно из них иногда делится ещё раз с образованием трёх одинаковых по виду ядер, различающихся только размерами. Формирование 'спермиев в таких случаях не происходит. Величина пыльцевых зерен колеблется от 8,1 мкм до 38,0 мкм, из которых мелкие пыльцевые зерна обычно стерильные. Диаметр фертильных пыльцевых зерен без явных нарушений находится в пределах 20,0 - 26,0 мкм, а в среднем составляет 23,0 мкм. Пыльцевые зерна, имеющие несколько спермиев или микроядра, достигают 28,5- 38,6 мкм в диаметре.

При скрещивании анеуплоидных растений наблюдаются геномные нарушения, вызванные слиянием гамет с числом хромосом, отклоняющимся от гаплоидного или диплоидного. Слияние двух 18-ти хромосомных гамет не равноценно слиянию 19+17 хромосомных. У второго растения только семь хромосом будут представлены четырьмя гомологами, восьмая будет иметь пять гомологов и девятая только три. Если формулу первого тетраплоидного растения можно представить  $9 \times 4 = 36$ , то второго  $7 \times 4 + 5 + 3 = 36$ . При одинаковой сумме хромосом генетическое содержание их не идентично, так как играет роль не только число хромосом, но и их индивидуальность, а также соотношение гомологичных хромосом. Такое изменение может произойти с любыми хромосомами набора и в любом сочетании, что определяет спектр варьирования этих форм. Геномные нарушения в потомстве анеуплоидов все увеличиваются, сопровождаясь изменениями генного баланса в зависимости от количества и соотношения составляющих их хромосом. Это наблюдается и в потомствах анеудиплоидных растений стабильных по числу хромосом, но отличающихся от обычных диплоидов как по внешним признакам, так и по течению генеративных процессов. При таком варьировании выделяются растения с хорошими показателями. Так, у сахарной свеклы среди анеуплоидов наблюдается образование в их потомствах преобладающего количества тетраплоидных

растений (до 60% в среднем). Количество, даже наиболее распространенных, анеуплоидов с 35 и 37 хромосомами, не превышает 7-16% и в среднем равняется 15,5% и 23,7%.

В эмбриогенезе анеуплоидов встречаются более значительные нарушения, чем у тетраплоидов, но у каждого из них, хотя бы небольшое количество семян, все же достигает нормального морфологического строения и физиологической зрелости, обеспечивающих хорошую всхожесть.

Через 8-12 часов после начала цветения количество зигот преобладает у диплоидных форм и улучшенной тетраплоидной свеклы. Неслившиеся полярные ядра встречаются у многих анеуплоидов и у исходной тетраплоидной формы, недоразвитые зародышевые мешки - только у анеуплоидов. У анеуплоидов обнаружены интересные картины гибели небольших ещё многоклеточных зародышей, у которых не образуются клеточные оболочки, а ядра лежат в общей цитоплазме, как у синцития. Иногда отсутствует общая цитоплазма, а клетки зародыша лежат обособленно друг от друга, придавая ему необычайно растрёпанный вид. Такие зародыши вскоре отмирают и засыхают.

Наблюдается отмирание семяпочек на ранних стадиях развития вследствие недоразвитости зародышевых мешков или нарушений процессов опыления и оплодотворения. На более поздних стадиях, на 8-12 день, когда зародыш достигает формы шара и образования семядолей, наблюдается отставание семяпочек в развитии, протекающее с различной интенсивностью в зависимости от генетических особенностей анеуплоидов. Более или менее значительная часть семяпочек достигает полного развития.

На стадии 16-29 дней в контроле и у улучшенных тетраплоидов более половины зародышей достигают полного морфологического развития, оставаясь ещё физиологически незрелыми. У анеуплоидов преобладают зародыши с семядолями от 1/4 до 3/4 длины зародышевого мешка и имеются ещё более отстающие семяпочки.

Наибольшее количество нормально развивающихся семян наблюдается у диплоидной и улучшенной тетраплоидной свеклы и только у них не обнаружены дефективные зародышевые мешки. У изученных анеуплоидов полного развития достигает немного более трети семян.

На 24-28 день у контрольных растений и улучшенных тетраплоидов значительная часть зародышей 95,0 % и 86,0 %, соответственно, достигает полной морфологической и физиологической зрелости.

Многие зародыши анеуплоидов отстают в развитии, дегенерируя на различных стадиях.

Часто зародыши остаются недоразвитыми и дефективными с укороченными семядолями или достигают только шаровидной или сердцевидной формы. Часть семязачек дегенерирует на ещё более ранних стадиях. В процессе развития семян у анеуплоидов  $2n = 28$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$  установлена нуцеллярная эмбриония и полиэмбриония. В одном зародышевом мешке часто формируется половой и апомиктический зародыш. Апомиктический зародыш располагается или ниже полового, или в халазальной части зародышевого мешка. Наблюдается образование апомиктических зародышей, расположенных ниже нормального аппарата или дегенерирующего. В зародышевом мешке обнаруживаются одна или несколько крупных клеток, из которых в последствии образуются апомиктические зародыши. [3,4]. Часто наблюдается образование зародышей в виде «шара» без подвесков или нуцеллярных зародышей на длинных подвесках. В халазальной части зародышевого мешка отмечается образование бесклеточной ткани с густой цитоплазмой и крупными ядрами. На более поздних стадиях развития в верхней части зародышевого мешка наблюдаются зародыши, повёрнутые к микропиле или лежащие боком. Следует отметить, что не все апомиктические зародыши достигают полного развития, часть из них погибает. Вместе с тем выявление форм растений с элементами апомиксиса и проведение отбора среди них может способствовать усилению склонности сахарной свеклы к апомиктическому размножению и выделению доноров этого признака.

В потомствах дигаплоидных растений ( $2n = 18$ ) проявляются характерные биоморфологические признаки в виде полиэмбрионии и др., что позволяет отнести их к апомиктам.

Партеногенетическое развитие зародышей наблюдается довольно часто также при проведении валентных скрещиваний тетраплоидов с диплоидами и триплоидами. В результате этих скрещиваний в потомствах формируются диплоиды до 42,1 % и тетраплоиды до 45,9 % . Возникновение диплоидов, по-видимому, происходит в результате адвентивной эмбрионии или апогамии, а появление тетраплоидов обусловлено, возможно, формированием зародыша из зигот, образовавшихся от слияния яйцеклеток с нередуцированным набором хромосом и диплоидной пыльцы. Наличие нередуцированных яйцеклеток свидетельствует о наличии у сахарной свеклы склонности к агамоспермии. [4]

**Выводы:** В мейозе анеуплоидных растений наблюдается ряд отклонений, ведущих к образованию преимущественно анеуплоидных гамет, варьирующих по величине и

содержанию хромосом. Нередко наблюдается дегенерация мужских гамет на последнем этапе гаметогенеза с образованием, вместо обычных трёхклеточных пыльцевых зерен, двуядерной и трехъядерной пыльцы, неспособной к оплодотворению.

Изменения генетического характера вызывают появление новых растений, среди которых возможно возникновение особей с хорошим морфологическим строением, повышенной устойчивостью и высокой продуктивностью.

Выявленная склонность анеуплоидных и дигаплоидных растений к апомиксису и проведение отбора может способствовать усилению склонности к апомиктическому размножению и выделению доноров апомиксиса, как новых форм растений для селекционной работы.

### **Литература**

1. Бормотов В.Е., Турбин Н.В. Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы.- Минск: Наука и техника, 1972.-232с
2. Буренин В.И. Наследственные дифференцировки в роде Beta L. // Генетика, 1994. – т.30. - №12. – С.1593-1598.
3. Зайковская Н.Э., Перетятко Н.А., Ширяева Э.И., Ярмолук Г.И. Апомиксис у форм сахарной свеклы // Апомиксис и цитозэмбриология растений, вып.4. – Саратов: Изд. Саратовского универс. 1978. – С. 39-40.
4. Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции // автореферат дисс...докт.биол.наук. – Алматы, 1996. – 44с.
5. Ширяева Э.И. Методические указания по цитозэмбриологическим исследованиям в селекции сахарной свеклы. – Киев: ВНИС, 1984. – 62с.

# ANEUPLOIDY CYTOEMBRYOLOGICAL PECULIARITIES IN THE POPULATION OF SUGARBEET DIGENOMIC SPECIES AS AN SOURCE OF GENETICALLY RENEWED MATERIALS

Lyudmyla P. Perfilyeva, Ph.D. in Biology  
Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University  
Ukraine  
Cherkassy region

In the article cytoembryological research results for aneuploidy progeny studing were described. Aneuploidy forms with unbalanced chromosome number  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$ , secreted from tetrapodal variety of Bila Tserkva origin and haploids  $2n = 18$  (recurrent and bidirectional diploids of aneuploidy progeny) were given for the research. Meiosis, gametogenesis and embryogenesis processes were investigated. Typical tetraploid  $2n = 36$ , improved in quality of pollen  $2n = 36$  (type 1) and tetraploid  $2n = 36$  with pollen bad quality were the control.

Series of deflections in chromosomes conjugation were observed in aneuploidy plants meiosis. Distortions of metaphase I anaphase I were the result of this. Methods of sugar beet genetic turnover were suggested.

When investigating aneuploidy with 28, 34, 39 chromosomes gametogenesis irregular mitosis pollen grains were discovered. Polyspermy phenomenon was the result of this.

The size of pollen grains was varied from 8,1 micron to 38,0 micron. Small pollen grains were generally abortive.

Greater distortions were occurred in aneuploidy embryogenesis than in tetraploid. But each of them had small amount of seed, which reached ordinary structural composition, physiological maturity providing good germination.

Typical biostructural characters in the form of polyembryony, pistillody and others were exhibited in aneuploidy  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$  and dihaploid plants( $2n = 18$ ), allowing to refer them to apomict.

The availability of unreduced ovigerms was indicative of sugar beet agamospermy presence.

Methods of sugar beet genetic turnover were provided as a result of in-depth research of aneuploidy progeny and dihaploid derived from tetraploid.

The embryology researches of tetraploid forms of sugar beet of many years exposed the frequent display in their posterity of triploid and aneuploidy plants with a different quantity of

chromosomes [1].

In spite of the negative sides of aneuploidy, this phenomenon can be used in the genetic researches, especially at the objects with the good karyological structure of chromosomes for development of questions of theoretical and practical nature. Aneuploidy causes violations of genome composition of plants, that is instrumental in the deep cognition them genetic structure. Through trisomic, monosheat-fishes and nullisomic are conducted large researches on the study of genetic functions of separate chromosomes, features of action of genes and them S-allele [2].

**Work aim:** To expose and conduct cytological researches of new genetically changed plants among posterity of tetraploid and aneuploidy sugar beet with the purpose of the use them in the selection.

**Methods of conducting:** The experiments were conducted on the base of Uman state agrarian university (agrobiological station) and Institute of bioenergetic cultures and sugar beet of NAAS (Kiev).

For the study were taken aneuploidy form with the unbalanced number of chromosomes  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$ , being selected from the tetraploid sort of Bila Tserkva origin and dihaploid  $2n = 18$  (reciprocal and reversible dihaploid from posterity of aneuploidy). The processes of meiosis are studied, gametogenesis and embryogenesis.

As ordinary tetraploid served the control  $2n = 36$  improved in quality of pollen  $2n = 36$  (type 1) and tetraploid  $2n = 36$  with the bad quality of pollen (type 2). Consideration methods and cytoembryological analyses are done on the generally accepted methods [5].

**The results of the conducted researches** showed, that in meiosis aneuploidy plants there is a row of rejections in conjugation of chromosomes, that on the stage of diakinesis is expressed in education, except for tetravalents and bivalents, univalent of chromosomes. The nature of conjugation of chromosomes determines passing further stages of meiosis. The presence of univalents in diakinesis conducts to the metaphase I violations, anaphase I and is accompanied by the disorderly throwing about of chromosomes and unsimultaneous their advancement to the poles. The chromosomes, thrown out in the cytoplasm, meet in interkinesis.

There is blocking a work of spindle, when the chromosomes are divided, but do not go away to the poles, that results in education on the stage of tetrad of microspores from 3 about 9 kernels.

In case of the study of gametogenesis at aneuploidy with 28, 34, 39 chromosomes the wrong

mitoses in the pollen corns were revealed. At the poles there often are groups differentiating on the number of chromosomes; the quantity of spermium in the microspores is or increased about three-four or they are not quite formed. Sometimes in place of twocellular gametophytes with the specific structure vegetative and genesic cages arise up two identical kernels, reminding vegetative. One of them is sometimes partaken once again with formation of three identical on the kind kernels differentiating only by the sizes. Spermium forming in such cases does not take place. The size of pollen corns hesitates from 8,1 micron to 38,0 micron, from which shallow pollen corns generally sterile. Diameter of fertile pollen grains without the obvious violations is within the limits of 20,0 - 26,0 micron, and on the average makes 23,0 micron. Pollen corns having a little spermium or microkernels, arrive at 28,5- 38,6 micron in the diameter.

In case of crossing aneuploidy plants exist genome violations caused by confluence of gamete with the number of chromosomes deviating from haploid or diploid. Confluence two 18-ти chromosomal gamete not equivalently to the confluence 19+17 chromosomal. At the second plant only seven chromosomes will presented four homotypes, eighth will have five homotypes and ninth only three. If formula of the first tetraploid plant it is possible to present  $9 \times 4 = 36$ , second  $7 \times 4 + 5 + 3 = 36$ . At the equal sum of chromosomes genetic, maintenance them not identically, since the role plays not only number of chromosomes but also their individuality, and also correlation of homological chromosomes. Such change can take place with any chromosomes of set and in any combination, that the spectrum of varying these forms determines. Genome of violation in posterity of all aneuploidy are increased, accompanied by the changes of gene balance-sheet depending on the quantity and correlation of making their chromosomes. This exists in posterities of aneuploidy plants of chromosomes stable on the number, but different from ordinary diploid both on the external signs, and on stream of the genesic processes. In case of such varying the plants with the good indexes are selected. So, at the sugar beet among aneuploidy there is an education in their posterities of prevailing quantity of tetraploid plants (about 60% on the average). Quantity, even most widespread, aneuploidy with 35 and 37 chromosomes, does not exceed 7-16% and is evened on the average 15,5% and 23,7%.

The considerable violations meet in aneuploidy embryogenesis more, what at tetraploid, but at each of them, though two-bits of seeds, however achieves the normal morphological structure and physiological maturity securing a good germination.

In 8-12 hours after the beginning of flowering the quantity of zigocyte prevails at the diploid

forms and improved tetraploid beet. The unmeeting arctic kernels meet at many aneuploidy and at the initial tetraploid form, underdeveloped embryonic sacks - at aneuploidy only. At aneuploidy the interesting pictures of still multicellular embryos small to the death, at which the cellular shells do not appear, are revealed, and the kernels lie in the general cytoplasm, as at syncytium (. Sometimes the general cytoplasm is absent, and the embryo cages lie isolated friend from the friend, giving to him an extraordinarily dishevelled kind. Such embryos before long die off and dry up.

There is dying off seedbud on the early stages of development because of the underdevelopment of embryonic sacks or violations of pollination processes and impregnation. On the more late stages, on 8-12 day, when the embryo achieves the form of ball and education by the seed-lobe, there is a lag of seedbud in development, flowing with a different intensity depending on the genetic features of aneuploidy. More or less considerable part of seedbud achieves the full development.

On the stage of 16-29 days in the control and at the embryos improved tetraploid more than the half achieve the full morphological development, remaining still physiological immature. The embryos with the seed-lobes from 1/4 about 3/4 length of embryonic sack prevail at aneuploidy and there are still more backward seedbud.

Most of normally developing seeds exists at diploid and improved tetraploid beet and only at them the defective embryonic sacks are not revealed. At studied aneuploidy achieves the full development a bit more to third of seeds.

On 24-28 day at the control plants and improved tetraploid considerable part of 95,0 % embryos and 86,0 %, accordingly, achieves the full morphological and physiological maturity.

Many embryos of aneuploidy fall behind in development, degenerated on different stages. Often the embryos remain underdeveloped and defective with the shortened seed-lobes or achieve only the spherical or heart-shaped form. The part of seedbud degenerate on the still more early stages. In the process of development of seeds; at aneuploidy  $2n = 28$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$  nucellar embryony and polyembryony are set. In one embryonic sack is often formed by the chaff and apomictic embryos. Apomictic the embryo is disposed either low of sexual or in the халазальной part of embryonic sack. There is a formation of apomictic embryos subjacent normal vehicle or "degenerating". In the embryonic sack one or a few large cages are revealed, from which farther more appear apomictic embryos. [3,4]. Often there is a formation of embryos as ball without suspensorium or nucellar embryos on the long pendants. In the халазальной part of embryonic sack

the formation of acellular fabric with the thick cytoplasm and large kernels is marked. On the more late stages of development in the overhead part of embryonic sack there are embryos facing a microscaw or lying sideways. It should be noted that not all apomictic the embryos achieve the full development, part from them perishes. At the same time the exposure of forms of plants with the elements of apomixis and conducting a selection among them can be instrumental in strengthening the sugar beet propensity to the apomictic reproduction and selection of donors of this sign.

In posterities of dihaploid plants ( $2n = 18$ ) the character biomorphological signs as polyembryony and etc. are shown, that allows to deliver them to apomict.

Parthenogenetic development of embryos exists pretty often also during conducting a valency crossing of tetraploid with diploid and triploid. As a result of these crossing in posterities diploid about 42,1 % and tetraploid about 45,9 % are formed . Origin of diploid, presumably, takes place as a result of adventive embryony or apogamy, and the appearance of tetraploid is conditioned, possibly, by forming an embryo from zygote appearing from confluence of ovules with the unreduced set of chromosomes and diploid of pollen. The presence of unreduced ovules testifies to the presence at the propensity sugar beet to agamospermy. [4]

**Inferences:** In meiosis of aneuploidy plants there is a row of rejections, that leads to primarily aneuploidy gamete forming varying in the size and maintenance of chromosomes. Frequently there is a degeneration of masculine gamete on the last of peat-time of gametogenesis with education, in place of the ordinary threecellular pollen corns, binucleate and trinuclear of pollen, insufficient to the impregnation.

The changes of genetic nature cause appearance of new plants among which the origin of individuals with the good morphological structure, promoted stability and high productivity is possible.

The exposed propensity of aneuploidy and dihaploid plants to apomixis and conducting a selection can be instrumental in strengthening a propensity to the apomictic reproduction and selection of donors of apomixis, as new forms of plants for the selection work.

## **Цитоэмбриологические особенности анеуплоидов в популяциях тетраплоидных форм сахарной свеклы как источник генетически обновленных материалов**

**Перфильева Л.П., кандидат биологических наук**

**Уманский государственный педагогический университет имени Павла Тычины,  
Украина, Черкасская область.**

В статье приводятся результаты исследований по изучению продуктивности потомства анауплоидов и предлагаются методы генетического обновления сахарной свеклы, путем глубокого изучения анауплоидных потомств и дигаплоидов полученных из тетраплоидной сахарной свеклы.

У статті наведені результати досліджень по вивченню продуктивності потомства анауплоїдів і пропонуються методи генетичного оновлення цукрового буряка, шляхом глибокого вивчення анауплоїдних потомств і дигаплоїдів одержаних з тетраплоїдного цукрового буряка.

In the article the results of researches on the study of productivity of posterity of aneuploides are led and the methods of genetic renovation of sugar beet are suggested, by the deep study of aneuploides posterities and digaploides got from the tetraploides sugar beet.

**Ключевые слова:** Геномные нарушения, тетраплоиды, анеуплоиды, дигаплоиды, гаметогенез, мейоз, пыльца, эмбриогенез, зародыш, апомиксис, трисомики, моносомы, нулосомы.

**Ключові слова:** Геномні порушення, тетраплоїди, анеуплоїди, дигаплоїди, гаметогенез, мейоз, пилок, ембріогенез, зародок, апоміксис, трисомики, моносомы, нулосомы.

**Key words:** Геномные of violation, тетраплоиды, анеуплоиды, дигаплоиды, гаметогенез, мейоз, pollen, эмбриогенез, embryo, апомиксис, трисомики, monosheat-fishes, нулосомы.

Полиплоидия является важнейшим фактором эволюции растительного мира. Большинство представителей дикорастущей и культурной флоры принадлежит к полиплоидам. Численность полиплоидов все увеличивается в связи с пересмотром базовых чисел хромосом во многих родах. Широкое распространение полиплоидии у растений свидетельствует о том, что с ней связаны определенные биологические преимущества, позволяющие формам с умноженным набором хромосом сохраняться и побеждать в борьбе за существование.

Познание полиплоидии как важнейшей биологической закономерности стимулировало поиск эффективных путей искусственного получения полиплоидных форм растений с целью улучшения их утилитарных качеств. Открытие колхицинового метода явилось блестящим решением этой задачи. Оно обогатило арсенал селекционеров новым замечательным приемом экспериментального преобразования природы растений. В результате получены высокоурожайные, крупнозерные тетраплоидные сорта ржи, ценные формы тетраплоидного клевера, турнепса, перечной мяты и т. д. Возможность экспериментального изменения числа хромосом в клетках способствовала также появлению ряда важнейших открытий в области цитогенетики растений. [1]

Эволюция видов рода *Beta L.* протекала в основном при одном и том же числе хромосом ( $2n=18$ ). Естественный полиплоидный ряд здесь представлен незначительным числом видов дикорастущей свеклы. Работа с культурной свеклой, в частности сахарной, также вот уже более 200 лет ведется преимущественно на диплоидной основе. Это единственная сельскохозяйственная культура, создание которой целиком принадлежит человеку. Все другие сельскохозяйственные растения находятся в культуре уже по несколько тысяч лет. В течение этого времени они постоянно подвергались естественному отбору и примитивной селекции. К моменту становления селекции как науки эти растения были уже в значительной степени окультуренными. Сахарная же свекла с самого момента появления в культуре под названием Силезской свеклы (естественный гибрид корнеплодных форм и мангольда) стала объектом планомерной селекции. [2]

За последнее время селекционерам удалось достигнуть больших успехов в повышении продуктивности сахарной свеклы. Систематически создаются и внедряются в производство на смену старым новые сорта с более высокой продуктивностью и устойчивостью к болезням и

вредителям.

Вместе с тем в ходе работы все более очевидным было замедление прогресса в дальнейшем повышении продуктивности сахарной свеклы. Все труднее стало создавать новые сорта, которые существенно превосходили бы исходный материал так как сахарная свекла в противоположность многим другим культурным растениям не обнаруживает большого генетического разнообразия форм.

Возникла необходимость создания качественно нового исходного материала и поисков более эффективных путей селекции. Использование метода экспериментальной полиплоидии в сочетании с утилизацией эффекта генетически регулируемого гетерозиса явилось путем, на котором было найдено удовлетворительное решение этой задачи.

Многолетние эмбриологические исследования тетраплоидных форм сахарной свеклы выявили частое проявление в их потомстве триплоидных и анеуплоидных растений с различным количеством хромосом [3].

**Цель работы:** Выявить и провести цитологические исследования новых генетически измененных растений среди потомства тетраплоидной и анеуплоидной сахарной свеклы с целью использования их в селекции.

**Методика проведения:** Опыты проводились на базе Уманского государственного аграрного университета (агробиостанция) и Института биоэнергетических культур и сахарной свеклы УААН (г. Киев).

Для изучения были взяты анеуплоидные формы с несбалансированным числом хромосом  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$ , выделившихся из тетраплоидного сорта Белоцерковского происхождения и дигаметоиды  $2n = 18$  (возвратно-риверсивные диплоиды из потомства анеуплоидов). Изучены процессы мейоза, гаметогенеза и эмбриогенеза. Контролем служили обычные тетраплоиды  $2n = 36$  улучшенные по качеству пыльцы  $2n = 36$  (тип 1) и тетраплоиды  $2n = 36$  с плохим качеством пыльцы (тип 2)

Методы учёта и цитозембриологических анализов сделаны по общепринятой методике [5].

**Результаты проведенных исследований** показали, что в мейозе анеуплоидных растений наблюдается ряд отклонений в конъюгации хромосом, что на стадии диакинеза выражается в образовании, кроме квадрилентов и бивалентов, унивалентных хромосом. Характер конъюгации хромосом определяет прохождение дальнейших стадий мейоза. Наличие

унивалентов в диакинезе ведёт к нарушениям метафазы I, анафазы I и сопровождается беспорядочным разбросом хромосом и неодновременным их продвижением к полюсам. В интеркинезе встречаются хромосомы, выброшенные в цитоплазму.

Наблюдается блокирование работы веретена, когда хромосомы делятся, но не расходятся к полюсам, что приводит к образованию на стадии тетрад микроспор от 3 до 9 ядер (таблица 1).

При изучении гаметогенеза у анеуплоидов с 28, 34, 39 хромосомами были обнаружены неправильные митозы в пыльцевых зёрнах. У полюсов часто наблюдаются группы, различающиеся по числу хромосом; количество спермиев в микроспорах или увеличивается до трёх-четырёх или они совершенно не формируются. Иногда вместо двухклеточных гаметофитов со специфическим строением вегетативной и генеративной клеток возникают два одинаковых ядра, напоминающие вегетативные. Одно из них иногда делится ещё раз с образованием трёх одинаковых по виду ядер, различающихся только размерами. Формирование 'спермиев в таких случаях не происходит. Величина пыльцевых зерен колеблется от 8,1 мкм до 38,0 мкм, из которых мелкие пыльцевые зерна обычно стерильные. Диаметр фертильных пыльцевых зерен без явных нарушений находится в пределах 20,0 - 26,0 мкм, а в среднем составляет 23,0 мкм. Пыльцевые зерна, имеющие несколько спермиев или микроядра, достигают 28,5- 38,6 мкм в диаметре.

**Таблица 1**

Число ядер в микроспороцитах, анеуплоидов после завершения мейоза

Происхождение	Всего микрос- пороци- тов	Из них с числом ядер, %							
		3	4	4 разного размера	5	6	7	8	9
2п =38	114	-	5,3	-	16,0	31,0	24,7	17,9	6,1
2п =37	352	2,2	44,5	14,2	33,9	5,2	-	-	-
2п =35	334	2,4	56,3 1	8,7	24,0	6,3	2,3		
2п =34	359	5,6	28,9	Л2	35,9	15,4	5,5	0,5	-

2п =28	93	4,4	50,0	6,4	22,5	15,0	1,7	-	-
--------	----	-----	------	-----	------	------	-----	---	---

При скрещивании анеуплоидных растений наблюдаются геномные нарушения, вызванные слиянием гамет с числом хромосом, отклоняющимся от гаплоидного или диплоидного. Слияние двух 18-ти хромосомных гамет не равноценно слиянию 19+17 хромосомных. У второго растения только семь хромосом будут представлены четырьмя гомологами, восьмая будет иметь пять гомологов и девятая только три. Если формулу первого тетраплоидного растения можно представить  $9 \times 4 = 36$ , то второго  $7 \times 4 + 5 + 3 = 36$ . При одинаковой сумме хромосом генетическое содержание их не идентично, так как играет роль не только число хромосом, но и их индивидуальность, а также соотношение гомологичных хромосом. Такое изменение может произойти с любыми хромосомами набора и в любом сочетании, что определяет спектр варьирования этих форм. Геномные нарушения в потомстве анеуплоидов все увеличиваются, сопровождаясь изменениями генного баланса в зависимости от количества и соотношения составляющих их хромосом. Это наблюдается и в потомствах анеудиплоидных растений стабильных по числу хромосом, но отличающихся от обычных диплоидов как по внешним признакам, так и по течению генеративных процессов. При таком варьировании выделяются растения с хорошими показателями. Так, у сахарной свеклы среди анеуплоидов наблюдается образование в их потомствах преобладающего количества тетраплоидных растений (до 60% в среднем). Количество, даже наиболее распространенных, анеуплоидов с 35 и 37 хромосомами, не превышает 7-16% и в среднем равняется 15,5% и 23,7%.

В эмбриогенезе анеуплоидов встречаются более значительные нарушения, чем у тетраплоидов, но у каждого из них, хотя бы небольшое количество семян, все же достигает нормального морфологического строения и физиологической зрелости, обеспечивающих хорошую всхожесть.

Через 8-12 часов после начала цветения количество зигот преобладает у диплоидных форм и улучшенной тетраплоидной свеклы. Неслившиеся полярные ядра встречаются у многих анеуплоидов и у исходной тетраплоидной формы, недоразвитые зародышевые мешки - только у анеуплоидов. У анеуплоидов обнаружены интересные картины гибели небольших ещё многоклеточных зародышей, у которых не образуются клеточные оболочки, а ядра лежат в общей цитоплазме, как у синцития. Иногда отсутствует общая цитоплазма, а клетки зародыша лежат обособленно друг от друга, придавая ему необычайно растрёпанный вид.

Такие зародыши вскоре отмирают и засыхают.

Наблюдается отмирание семязпочек на ранних стадиях развития вследствие недоразвитости зародышевых мешков или нарушений процессов опыления и оплодотворения. На более поздних стадиях, на 8-12 день, когда зародыш достигает формы шара и образования семяздолей, наблюдается отставание семязпочек в развитии, протекающее с различной интенсивностью в зависимости от генетических особенностей анеуплоидов. Более или менее значительная часть семязпочек достигает полного развития.

На стадии 16-29 дней в контроле и у улучшенных тетраплоидов более половины зародышей достигают полного морфологического развития, оставаясь ещё физиологически незрелыми. У анеуплоидов преобладают зародыши с семяздолями от 1/4 до 3/4 длины зародышевого мешка и имеются ещё более отстающие семязпочки.

Наибольшее количество нормально развивающихся семян наблюдается у диплоидной и улучшенной тетраплоидной свеклы и только у них не обнаружены дефективные зародышевые мешки. У изученных анеуплоидов полного развития достигает немного более трети семян.

На 24-28 день у контрольных растений и улучшенных тетраплоидов значительная часть зародышей 95,0 % и 86,0 %, соответственно, достигает полной морфологической и физиологической зрелости (таблица 2).

Многие зародыши анеуплоидов отстают в развитии, дегенерируя на различных стадиях. Часто зародыши остаются недоразвитыми и дефективными с укороченными семяздолями или достигают только шаровидной или сердцевидной формы. Часть семязпочек дегенерирует на ещё более ранних стадиях. В процессе развития семян у анеуплоидов  $2n = 28$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$  установлена нуцеллярная эмбриония и полиэмбриония. В одном зародышевом мешке часто формируется половой и апомиктический зародыш. Апомиктический зародыш располагается или ниже полового, или в халазальной части зародышевого мешка. Наблюдается образование апомиктических зародышей, расположенных ниже нормального аппарата или дегенерирующего. В зародышевом мешке обнаруживаются одна или несколько крупных клеток, из которых в последствии образуются апомиктические зародыши. Часто наблюдается образование зародышей в виде «шара» без подвесков или нуцеллярных зародышей на длинных подвесках. В халазальной части зародышевого мешка отмечается образование бесклеточной ткани с густой цитоплазмой и крупными ядрами. На более поздних стадиях развития в верхней части зародышевого мешка наблюдаются зародыши, повёрнутые к микропиле или лежащие

боком. Следует отметить, что не все апомиктические зародыши достигают полного развития, часть из них погибает. Вместе с тем выявление форм растений с элементами апомиксиса и проведение отбора среди них может способствовать усилению склонности сахарной свеклы к апомиктическому размножению и выделению доноров этого признака.

**Таблица 2.** Влияние анеуплоидии на развитие зародышей сахарной свёклы

№ п\п	Плоидность изучаемого материала	Просмотрено зародышей, шт.	Из них						Количество апомиктичных зародышей, %
			нормальные		отстающие		дефективные		
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	
1	2п = 18	500	4,75	95,0 1	25	50,0	-	-	-
2	2п = 36 исход- ная	500	294	58,8	165	33,0	41	8,2	-
3	2п = 36 улучшенная	500	430	86,0	70	14,0	-	-	-
4	2п = 36 неулучшенная анеуплоидная	500	237	47,4	218	43,6	45	9,0	3,0
5	анеуплоиды: 2п = 23	150	46	30,7	92	61,3	12	8,0	2,5
6	2п = 28	232	30	12,9	175	75,5	27	11,6	5,1
7	2п = 29	127	40	31,4	78	61,4	9	7,2	3,1
8	2п = 30	29	15	51,8	5	17,2	9	31,0	3,0
9	2п = 34	129	22	1,7,0	97	75,2	10	7,8	5,2
10	2п = 35	672	220	32,7	387	57,6	65	9,7	13,9
11	2п = 37	500	171	34,2	268	53,6	61	12,2	22,8
12	2п = 38	442	165	37,4	222	50,2	55	12,4	13,7
13	2п = 39	163	36	22,1	109	66,8	18	11,1	7,7

В потомствах дигаплоидных растений (2п = 18) проявляются характерные биоморфологические признаки в виде полиэмбрионии и пистиллодийности и др., что позволяет

отнести их к апомикам.

Партеногенетическое развитие зародышей наблюдается довольно часто также при проведении валентных скрещиваний тетраплоидов с диплоидами и триплоидами. В результате этих скрещиваний в потомствах формируются диплоиды до 42,1 % и тетраплоиды до 45,9 % . Возникновение диплоидов, по-видимому, происходит в результате адвентивной эмбрионии или апогамии, а появление тетраплоидов обусловлено, возможно, формированием зародыша из зигот, образовавшихся от слияния яйцеклеток с нередуцированным набором хромосом и диплоидной пыльцы. Наличие нередуцированных яйцеклеток свидетельствует о наличии у сахарной свеклы склонности к агамоспермии. [4]

Эмбриологическими исследованиями потомства анеуплоидов и дигаплоидов установлено формирование матроклиных апомиктичных зародышей, которые отличались от половых способом образования и местом расположения в зародышевом мешке. Дополнительные зародыши возникали обычно без оплодотворения в микропиллярной зоне зародышевого мешка из клеток синергид или антипод (апогамия). При этом часто наблюдались гибель поло вого зародыша и развитие апомиктичного.

Образование зародышей путем адвентивной эмбрионии происходило из клеток интегументов и нуцеллуса. Отличительной особенностью эндоспермальной эмбрионии являлось возникновение зародышей из ядер эндосперма. Сначала формировались крупные инициальные клетки — соматиты (до 25,7 %), которые располагались среди обычных ядер эндосперма или во вновь образуемых полостях, похожих на зародышевые мешки. Соматиты после нескольких делений превращались в округлые или неправильной формы зародыши без подвесков. Иногда можно было наблюдать вокруг зародышей, формирующихся в полостях, образование новых ядер эндосперма. Следует отметить, что не все апомиктичные зародыши достигают полного развития, часть из них погибает в процессе эмбриогенеза.

Исследования продуктивности показали, что наиболее низкой продуктивностью характеризуются анеуплоиды с 35 и 37 хромосомами (таблица 3).

Однако для нашего материала, отличающегося чрезвычайно большим варьированием по числам хромосом, морфологическим признакам, селекционным качествам и генетическим факторам усредненные показатели массы и сахаристости корнеплодов имеют только относительное значение.

Индивидуальная поляризация потомств анеуплоидов, показала, что наибольшее

варьирование по сахаристости обнаружено у растений 2п = 37 и их потомства, содержащего 36 хромосом. Отборы по массе корнеплодов оказались почти не эффективными, но отборы по сахаристости рекомендуют многие авторы. Почти во всех потомствах можно отобрать высокосахаристые корнеплоды с массой от 400 г и выше (до 990 г) и с сахаристостью не ниже 20,1 % (от 20,1 % до 23,2%), хотя их количество невелико и варьирует от 8,2 до 3,7%

**Таблица 3**

Продуктивность анеуплоидной сахарной свёклы

Происхождение	Урожай корней ц/га	Сахаристость	Сбор сахара ц/га	В процентах от контроля		
				Урожай корней	сахаристость	Сбор са- хара
2п = 36 контроль	461	16,6	76,7	100	100	100
2п = 36 тип 1	497	16,8	83,4	107,8	101,2	108,7
2п = 36 тип 2	420	16,6	70	91,1	100	91,3
2п = 37	431	16,4	70,9	98,5	98,8	92,4
2п = 35	401	16,2	68,8	86,7	96,2	86,7
2п = 36 из по- томств анеуп- лоида 2п = 37	459	17,3	78,2	102,2	102,3	103,6

**Выводы:** В мейозе анеуплоидных растений наблюдается ряд отклонений, ведущих к образованию преимущественно анеуплоидных гамет, варьирующих по величине и содержанию хромосом. Нередко наблюдается дегенерация мужских гамет на последнем этапе гаметогенеза с образованием, вместо обычных трёхклеточных пыльцевых зерен, двужерной и трехъядерной пыльцы, неспособной к оплодотворению.

Несмотря на отрицательные стороны анеуплоидии, это явление можно использовать в генетических исследованиях, особенно у объектов с хорошим кариологическим строением хромосом для разработки вопросов теоретического и практического характера. Анеуплоидия вызывает нарушения геномного состава растений, что способствует углубленному познанию их генетического строения. При помощи трисомиков, моносомиков и нуллисомиков ведутся большие исследования по изучению генетических функций отдельных хромосом, особенности

действия генов и их аллелей. Изменения генетического характера вызывают появление новых растений, среди которых возможно возникновение особей с хорошим морфологическим строением, повышенной устойчивостью и высокой продуктивностью.

Варьирование анеуплоидов по сахаристости и массе корнеплодов также подтверждает их генетическое разнообразие и возможность выделения генетически новых исходных материалов для селекционных целей. Выявленная склонность анеуплоидных и дигаплоидных растений к апомиксису и проведение отбора может способствовать усилению склонности к апомиктическому размножению и выделению доноров апомиксиса, как новых форм растений для селекционной работы.

Значительные структурные изменения генома, вызванные экзогенным воздействием колхицина, стимулируют в потомствах полиплоидов проявление агамоспермии. Поэтому выявление форм растений, имеющих наряду с половым размножением апомиктическое, дает возможность получать новый исходный материал для селекционной работы. Проведение отбора тетраплоидов с нормальным мейозом при микро-мегаспорогенезе может способствовать сбалансированности гамет при оплодотворении и, следовательно, нормальному развитию зародыша и семени.

Отбирая в потомствах анеуплоидов наиболее перспективные высокопродуктивные растения, можно создавать новый исходный материал для селекции генетически изменённой сахарной свеклы с повышенными возможностями для увеличения урожайности, сахаристости, устойчивости и других полезных свойств этой культуры.

### **Литература**

1. Бормотов В.Е., Турбин Н.В. Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы.- Минск: Наука и техника, 1972.-232с
2. Буренин В.И. Наследственные дифференцировки в роде Beta L. // Генетика, 1994. – т.30. - №12. – С.1593-1598.
3. Зайковская Н.Э., Перетятко Н.А., Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И. Апомиксис у форм сахарной свеклы // Апомиксис и цитозембриология растений, вып.4. – Саратов: Изд. Саратовского универс. 1978. – С. 39-40.
4. Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции // автореферат дисс...докт.биол.наук. – Алматы, 1996. – 44с.
5. Ширяева Э.И. Методические указания по цитозембриологическим исследованиям в селекции сахарной свеклы. – Киев: ВНИС, 1984. – 62с.

**Цитоэмбриологические особенности анеуплоидов в популяциях тетраплоидных форм сахарной свеклы как источник генетически обновленных материалов**

**Перфильева Л.П., кандидат биологических наук**

**Уманский государственный педагогический университет имени Павла Тычины,  
Украина, Черкасская область.**

В статье приводятся результаты цитоэмбриологических исследований по изучению потомства анауплоидов. Для изучения были взяты анеуплоидные формы с несбалансированным числом хромосом  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$ , выделившихся из тетраплоидного сорта Белоцерковского происхождения и дигаплоиды  $2n = 18$  (возвратно-риверсивные диплоиды из потомства анеуплоидов). Изучены процессы мейоза, гаметогенеза и эмбриогенеза. Контролем служили обычные тетраплоиды  $2n = 36$  улучшенные по качеству пыльцы  $2n = 36$  (тип 1) и тетраплоиды  $2n = 36$  с плохим качеством пыльцы.

В мейозе анеуплоидных растений наблюдается ряд отклонений в конъюгации хромосом, что ведёт к нарушениям метафазы I, анафазы I. И предлагаются методы генетического обновления сахарной свеклы,

При изучении гаметогенеза у анеуплоидов с 28, 34, 39 хромосомами были обнаружены неправильные митозы в пыльцевых зёрнах, что приводит к явлению многоспермии.

Величина пыльцевых зерен колеблется от 8,1 мкм до 38,0 мкм, из которых мелкие пыльцевые зерна обычно стерильные.

В эмбриогенезе анеуплоидов встречаются более значительные нарушения, чем у тетраплоидов, но у каждого из них, хотя бы небольшое количество семян, все же достигает нормального морфологического строения и физиологической зрелости, обеспечивающих хорошую всхожесть.

У анауплоидов  $2n = 23$ ,  $2n = 28$ ,  $2n = 29$ ,  $2n = 30$ ,  $2n = 34$ ,  $2n = 35$ ,  $2n = 37$ ,  $2n = 38$ ,  $2n = 39$  и дигаплоидных растений ( $2n = 18$ ) проявляются характерные биоморфологические признаки в виде полиэмбрионии и пистиллодийности и др., что позволяет отнести их к апомикам. Наличие нередуцированных яйцеклеток свидетельствует о наличии у сахарной свеклы склонности к агамоспермии.

В результате глубокого изучения анауплоидных потомств и дигаплоидов полученных из тетраплоидов предлагаются методы генетического обновления сахарной свеклы.