

ОСОБЕННОСТИ ПЛОДООБРАЗОВАНИЯ, ПРОЦЕССОВ МАКРО- И МИКРОСПОРОГЕНЕЗА У ДИПЛОИДОВ И АВТОТЕТРАПЛОИДОВ *RIBES NIGRUM*

И.Э. Бученков, А.Г. Чернецкая, И.В. Рышкель, О.С. Рышкель

УО «Полесский государственный университет»

Материалы и методы исследований. С целью установления основных закономерностей плодобразования, присущих переходу на полиплоидный уровень, а также для выяснения возможности использования индуцированных автополиплоидов *Ribes nigrum* в качестве родительских компонентов скрещивания были проведены исследования особенностей спорогенеза у автотетраплоидных форм в сравнении с диплоидами.

Исследования проводили на диплоидных (2n) и тетраплоидных (4n) растениях *Ribes nigrum* сортов Церера, Купалинка, Клуссоновская, Кантата 50, Минай Шмырев, Памяти Вавилова, Катюша.

Церера – сорт селекции БелНИИ плодоводства. Куст среднерослый, слабораскидистый, побеги серые, неопушенные. Листья крупные, зеленые, матовые, цветки розовые. Ягоды округлые, черные, средней массой 1,2 г. Содержание сахаров – 8,4 %, кислот 2,6 %. Средняя урожайность 170 ц/га. Вкусовые качества 4 балла. Сорт зимостойкий, транспортабельный. Устойчив к мучнистой росе и атракнозу.

Купалинка – сорт селекции БелНИИ плодоводства. Куст среднерослый, слабораскидистый. Листья средние, зеленые. Ягода округлая, черная, средней массой 1,4 г. Содержание сахаров – 1,13 %, кислот – 3,0 %, витамина С – 134,4 мг%. Средняя урожайность 6,9 кг с куста. Вкусовые качества 4 балла. Сорт зимостойкий, относительно устойчив к почковому клещу.

Клуссоновская – сорт селекции БелНИИ плодоводства, среднепозднего срока созревания. Куст сильнорослый, слабораскидистый. Побеги толстые, темно-бурые. Листья пятилопастные, крупные, темно-зеленые. Листовая пластинка кожистая, морщинистая, матовая. Средняя масса ягод 1,1 г. Вкус плодов кисло-сладкий. Урожайность высокая. Сорт высокосамоплодный, зимостойкий, устойчив к антракнозу и мучнистой росе.

Кантата 50 – сорт селекции БелНИИ плодоводства, среднего срока созревания. Куст сильно-рослый, среднераскидистый, побеги толстые светло-зеленые. Средняя масса ягоды 0,9 г. Вкусовые качества 4,4 балла. Средняя урожайность 91,7 ц/га. Содержание сахаров – 8,7 %, кислот – 2,18 %, витамина С 188,2 мг%. Сорт зимостойкий.

Минай Шмырев – сорт селекции БелНИИ плодоводства, раннеспелый. Куст сильнорослый, побеги толстые, изогнутые, неопушенные, блестящие. Ягоды черные, матовые, средней массой 0,9 г. Вкусовые качества 4 балла. Средняя урожайность 106 ц/га. Содержание сахаров – 7,3 %, кислот – 1,74 %, витамина С – 212,5 г%. Сорт зимостойкий.

Память Вавилова – сорт селекции БелНИИ плодоводства, раннего срока созревания. Куст сильнорослый, побеги светло-коричневые, листья крупные зеленые. Листовая пластинка мягкая, морщинистая, матовая. Ягоды округлые, черные, средней массой 1,2 г. Вкусовые качества 4,5 балла. Урожайность до 113,6 ц/га. Содержание сахаров – 7,8 %, кислот – 1,8 %, витамина С – 187,1 мг%. Сорт зимостойкий.

Катюша – сорт селекции БелНИИ плодоводства, среднепоздний. Куст среднерослый, слабораскидистый. Побеги прямые, светло-коричневые, листья желтовато-зеленые. Ягода грушевидная, черная, блестящая массой 1,5 г. Урожайность до 70,3 ц/га. Вкусовые качества 4,9 балла. Содержание сахаров – 7,8 %, кислот – 2,4 %, витамина С – 142,4 мг%. Сорт зимостойкий.

Цитологический анализ и подсчет хромосом проводили на постоянных и временных препаратах, полученных по общепринятой методике цитогенетических исследований. Скрещивания отобранных автотетраплоидных форм сортов Кантата 50, Минай Шмырев, Памяти Вавилова с исходными диплоидными сортами проводили по схеме:

R. nigrum (2n) x *R. nigrum* (2n);

R. nigrum (2n) x *R. nigrum* (4n);

R. nigrum (4n) x *R. nigrum* (2n);

R. nigrum (4n) x *R. nigrum* (4n).

Гибридизация, полевые опыты и наблюдения выполнены по программе изучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. Также изучены потенциальные возможности тетраплоидных форм и диплоидных сортов к апомиксису.

Результаты и их обсуждение. Заложение и развитие цветочных почек у 2n и 4n форм происходит в период затухания роста побегов. Вначале почки закладываются на 1-3-летней древесине. Спустя 7-8 дней – на 4-6-летних и старшего возраста побегах. Эта закономерность присуща диплоидным и тетраплоидным формам. Отмечена тесная зависимость между началом развития цветочных почек и суммой эффективных температур. У диплоидных растений образование зачатков цветков происходит 25 июня – 15 июля при сумме эффективных температур 660-710⁰. Тетраплоидные растения закладывают цветочные почки в более поздние сроки (10-30 июля) и им необходима большая сумма эффективных температур (770-840⁰). Цветковые почки диплоидов проходят в своем развитии следующие стадии:

1. Вытягивание конуса нарастания и заложение бугорков эмбриональных цветков (продолжительность стадии – 1,5-2 недели).

2. Бугорки цветков дифференцируются на цветоножку и зачатки цветков (1,5-2 недели).

3. Формирование частей околоцветника, тычинок и полости завязи (2,5-3 недели).

4. Формирование стенок завязи, камер гинецея (2,5-3,5 недели). В зачаточных бугорках тычинок наблюдается дифференциация клеток первичного археспория и начальное формирование стенок пыльников. В таком состоянии цветковые почки вступают в зимний период. Дальнейшее развитие цветковых почек начинается во второй половине марта и связано с прохождением стадий макро и микроспорогенеза.

Особенности макроспорогенеза. У смородины завязь нижняя, гинецей образован двумя плод-листиками, плацентация париетальная. Семязачки у диплоидных и автополиплоидных форм анатропные, крассинуцеллярные, двупокровные. Весной идет процесс формирования мощного нуцеллуса и двух покровов (рисунок 1). Рост бугорков меристемы семязачек происходит за счет

переклиналильного деления субэпидермального слоя. В нуцеллусе чаще всего закладывается одна клетка первичного археспория. Она образует спорогенную клетку, преобразующуюся затем в макроспороцит. Макроспороциты приступают к мейозу во второй половине марта и образуют правильные тетрады.

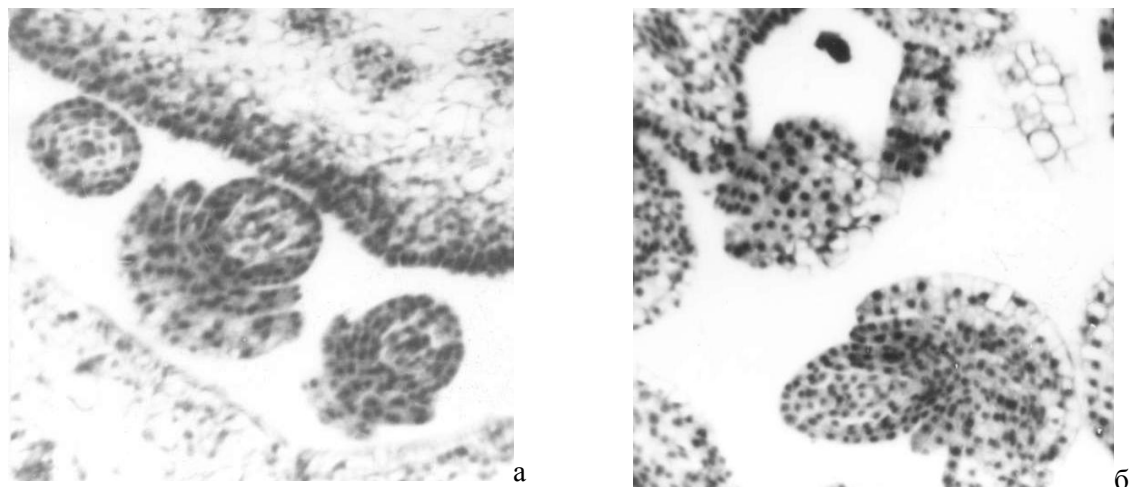


Рисунок 1 – Макроспорогенез у *Ribes nigrum* семязпочки на различных стадиях дифференциации (а – диплоид; б – тетраплоид)

Женский гаметофит формируется из халазальной макраспоры по *Polygonum*-типу. У смородины каждая макроспора потенциально способна прорасти, но чаще всего наблюдается дальнейшее развитие халазальной и иногда средней макраспоры до двуядерного зародышевого мешка, остальные дегенерируют.

Зародышевый мешок нормальный – яйцеклетка, синергиды, антиподы, центральное ядро. Отмечен очень небольшой процент дегенерирующих на разных стадиях развития зародышевых мешков ($0,91 \pm 0,03$). Сформированные восьмиядерные зародышевые мешки наблюдали в конце апреля – начале мая. Отмечена асинхронность в дифференциации зародышевых мешков в пределах одной завязи, а отсюда растянутость периода цветения.

У автотетраплоидов заложение, развитие, дифференциация цветковых почек происходит в несколько иные сроки. Наблюдается ускорение сроков прохождения 1-3 стадии. В зиму почки уходят, как правило, с полностью сформированными семязпочками. Осенний процесс макроспорогенеза растянут и протекает с нарушениями. Чаще всего наблюдается дегенерация диад и тетрад ($1,72 \pm 0,04 - 5,64 \pm 0,26\%$), развитие зародышевого мешка из верхней или средней макраспоры, формирование нескольких зародышевых мешков, их дегенерация на различных стадиях развития. У некоторых автотетраплоидов нами отмечены апоспорические зародышевые мешки с аномальными отклонениями в развитии.

Особенности микроспорогенеза. Общий ход микроспорогенеза у автотетраплоидных растений во многом сходен с диплоидными формами, отличаясь в то же время некоторыми особенностями (рисунок 2-3).

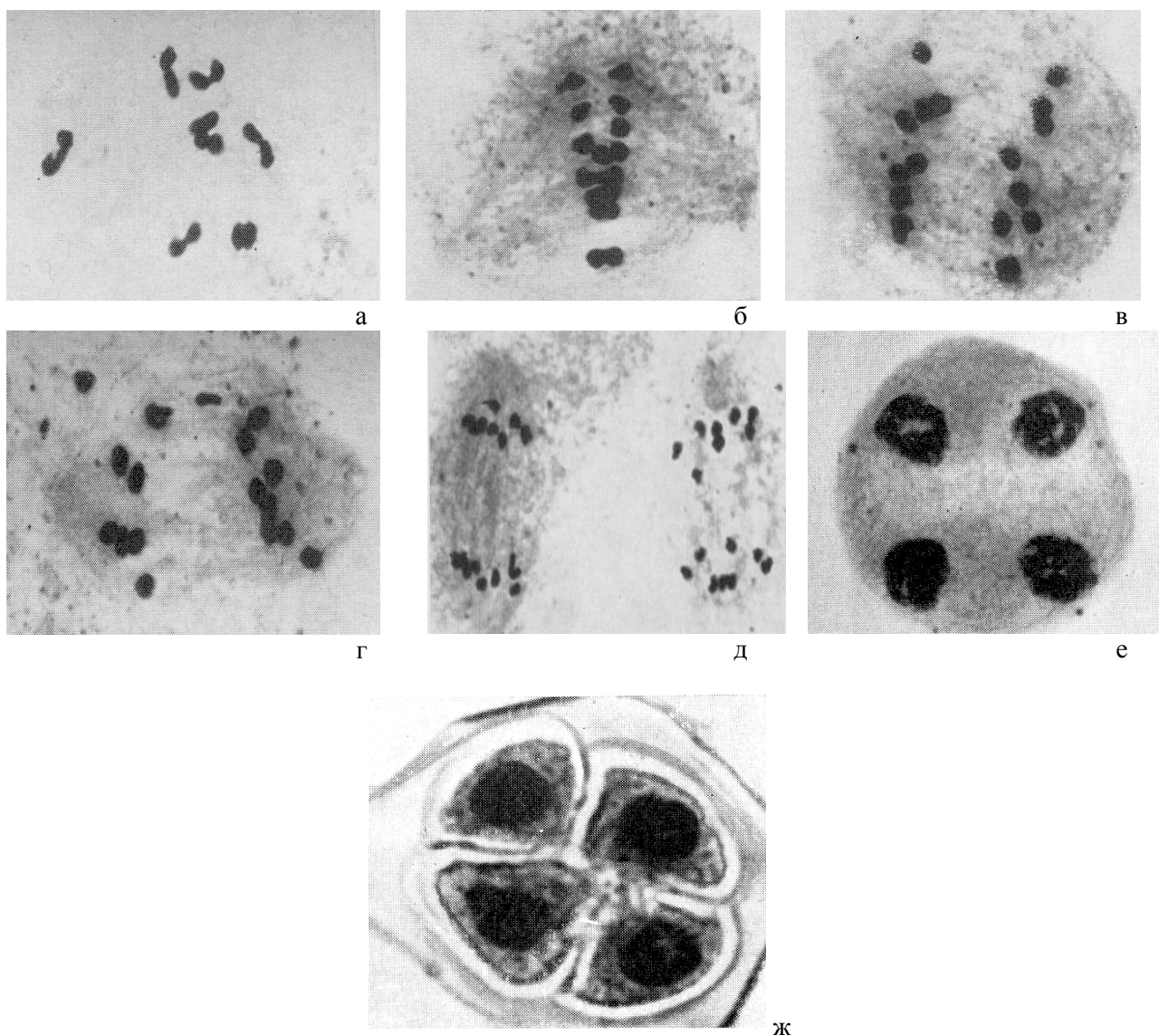
В зиму цветочные почки уходят с бугорками тычинок, дифференцированными на тычиночную нить и пыльник. Все дальнейшее развитие пыльника протекает весной (с середины марта). Бугорок пыльника – меристема, окруженная эпидермисом – имеет вначале округлую, затем четырехгранную и наконец четырехлопастную форму. В каждой лопасти выделяются группы клеток археспория, которые при делении дают париетальный слой, формирующий стенку пыльника и спорогенный слой.

Стенка молодого пыльника состоит из эпидермиса, эндотеция, трех средних слоев, тапетума железистого типа, дегенерирующего в процессе формирования макроспор. Спорогенный слой образует материнские клетки пыльцы, формирующиеся по симультанному типу.

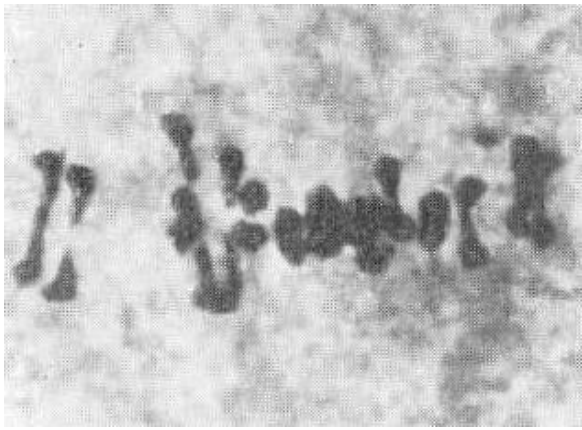
Основные различия у тетра- и диплоидных форм наблюдаются при прохождении процесса мейоза. У диплоидных сеянцев мейоз протекает без существенных отклонений, в связи с чем отмечен небольшой процент материнских клеток пыльцы с аномалиями. В метафазе I наблюдается

попарная конъюгация хромосом и образование восьми бивалентов. Редко отмечаются мейоциты с 1-3 унивалентами, рассеянными по веретену деления. В анафазе I может происходить единичное запаздывание хромосом. Телофаза I и гомеотипное деление отличаются нормальным течением и формированием правильных тетрад.

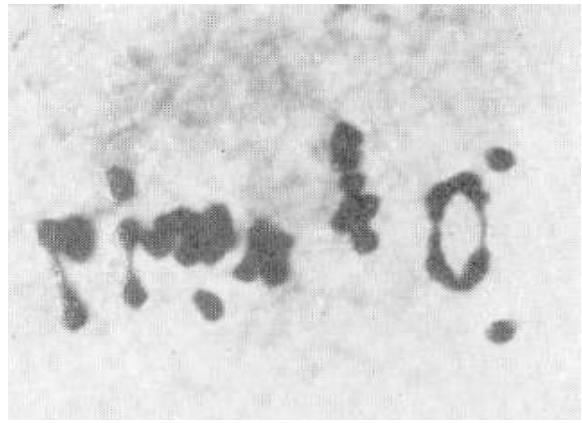
У автотетраплоидов *Ribes nigrum* мейоз проходит с серьезными аномалиями. В метафазе I наблюдаются группы из 5, 4, 3 и 2 хромосом и униваленты. В отдельных материнских клетках пыльцы отмечен бивалентный тип конъюгации. Наряду с нормальным расположением хромосом на экваторе, в метафазе I происходит выброс отдельных хромосом за пределы метафазной пластинки. В анафазе I отмечена задержка от 1 до 5 хромосом. Отстающие хромосомы в телофазе I формируют микроядра. В результате аномалий первого деления мейоза наблюдается значительное число формирующихся анеуплоидных ядер.



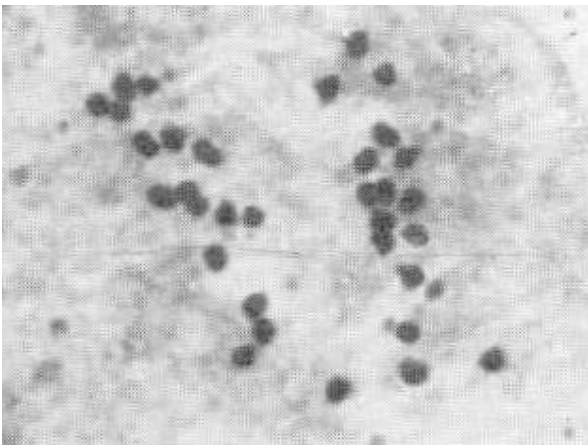
**Рисунок 2 – Микроспорогенез у *Ribes nigrum*, $2n=16$:
а – профазы; б-г – анафазы I; д – анафаза II; е - телофаза II; ж – тетрада**



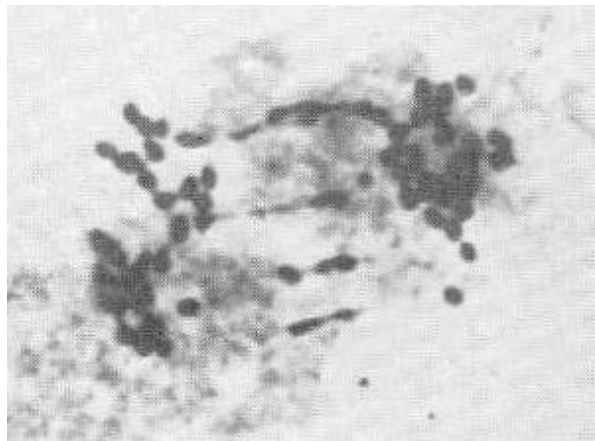
а



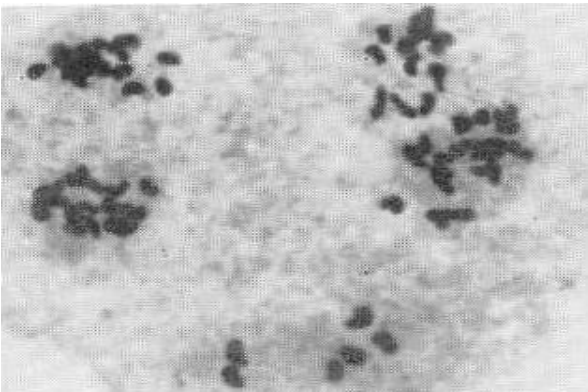
б



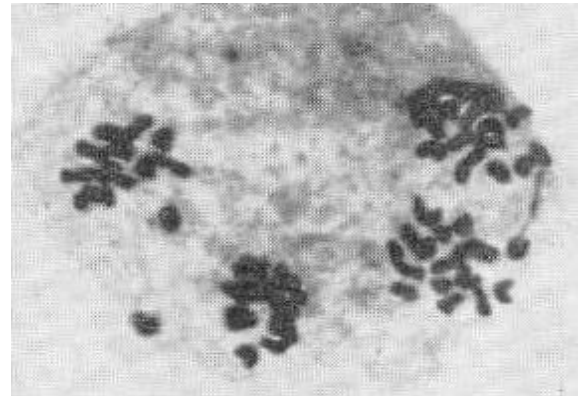
в



г



д



е

**Рисунок 3 – Микроспорогенез у *Ribes nigrum*, $2n=32$:
а, б – метафаза I с мультивалентами; в, г – анафаза I (расщепление унивалентов)
г-е – анафаза II с выброшенными хромосомами.**

В метафазе II наблюдается большое количество мейоцитов с отброшенными за пределы экваториальных пластинок и даже за пределы фигуры деления хромосом. Анафаза II характеризуется отставанием и забеганием хромосом, которые в телофазе II формируют многочисленные микроядра. Аномалии мейоза у автополиплоидов приводят к формированию большого числа пентад, гексад и полиад.

Изучение жизнеспособности пыльцы диплоидных сортов и автотетраплоидных форм (рисунок 4) показало, что диплоидные формы смородины образуют полноценную нормально сформирован-

ную пыльцу с небольшим процентом аномальных пыльцевых зерен. У автополиплоидов абортивность пыльцы резко возрастает (таблица 1).

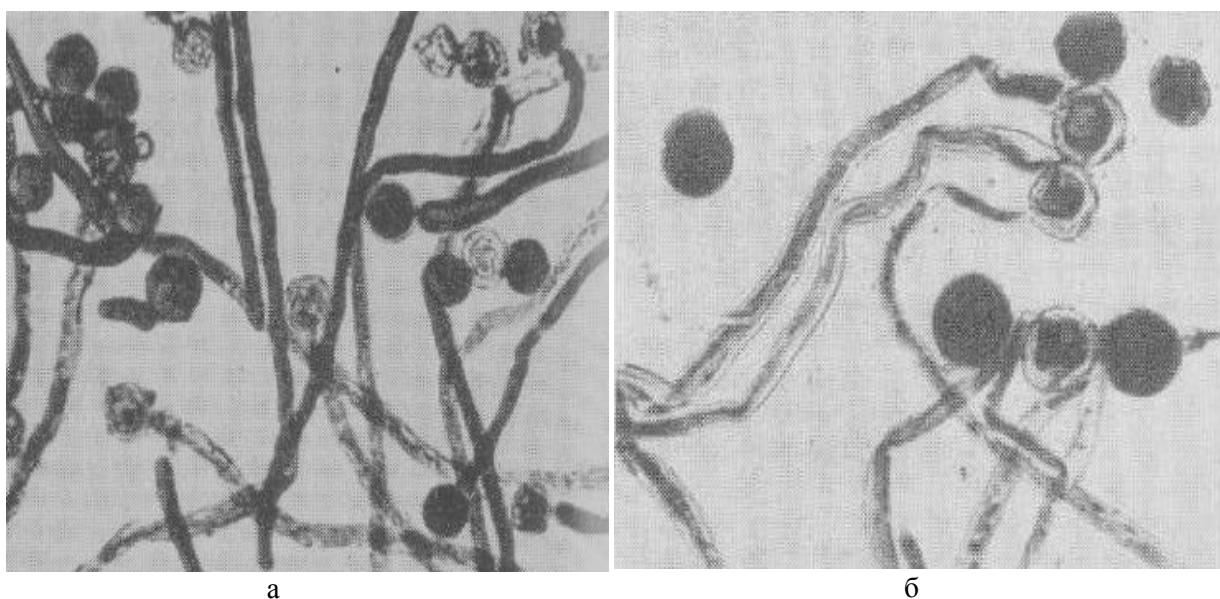


Рисунок 4 – Прорастание пыльцы диплоидного сорта Минай Шмырев (а) и автотетраплоидной формы Минай Шмырев (б)

Таблица 1 – Жизнеспособность пыльцы *Ribes nigrum* различного уровня ploидности

Сорт	Плоидность	Пыльцевых зерен по 10 полям зрениа, шт.	Проросших пыльцевых зерен,	
			шт.	%
Минай Шмырев	2n	282	208	73,8
	4n	154	49	31,8
Кантата 50	2n	296	217	73,3
	4n	163	59	36,2
Памяти Вавилова	2n	287	211	73,5
	4n	158	44	27,8
Церера	2n	292	214	73,4
	4n	172	44	25,4
Купалинка	2n	274	202	73,6
	4n	167	45	26,8
Клуссоновская	2n	262	191	72,8
	4n	138	47	34,2
Катюша	2n	278	206	74,1
	4n	142	47	33,3

При перекрестном опылении автотетраплоидов *Ribes nigrum* с диплоидными сортами прямые и обратные скрещивания дают сравнительно высокий процент полезной завязи – более высокий при использовании тетраплоидов в качестве отцовской формы (44,9-46,8 %), менее высокий при использовании тетраплоидов в качестве материнской формы (30,4-32,7 %). Завязавшиеся ягоды крупные (1,1-1,2 г) при скрещиваниях 4n x 2n и менее крупные (0,9-1,0 г) при скрещиваниях 2n x 4n. Ягоды правильной формы, отличаются меньшим содержанием семян при скрещиваниях 4n x 2n (11-19 шт./плод), в отличие от обратных комбинаций скрещивания 2n x 4n (24-34 шт./плод). При опылении тетраплоидов диплоидами выполненность семян средняя, процент всхожести приблизительно в два раза ниже, чем при опылении диплоидов тетраплоидами (таблица 2).

Таблица 2 – Самоопыление, апомиксис и перекрестное опыление у диплоидных сортов и автотетраплоидных форм *R. nigrum*

Комбинация скрещивания	Цвет-ков в опыте шт.	Снятых ягод, шт.	Снятых ягод, %	Средний вес ягод, г	Семян на 1 ягоду, шт.	Взошедших семян, шт.	Прижившихся семян, %
Минай Шмырев (4n x 4n)							
Самоопыление	182	72	39,6	1,2	7±2	24	54,2
Апомиксис	214	14	6,5	1,0	3±1	16	31,3
Перекрестное опыление**	238	109	45,8	1,3	14±2	37	56,8
Кантата 50 (4n x 4n)							
Самоопыление	196	83	42,3	1,3	9±2	27	59,3
Апомиксис	202	9	4,5	1,1	5±1	12	41,7
Перекрестное опыление**	214	107	50,0	1,4	12±4	41	68,3
Памяти Вавилова (4n x 4n)							
Самоопыление	156	61	39,1	1,3	11±3	17	58,8
Апомиксис	194	7	3,6	1,1	6±1	9	33,3
Перекрестное опыление**	206	98	47,6	1,4	12±3	32	62,5
Минай Шмырев (2n x 2n)							
Самоопыление	204	145	71,1	0,9	24±3	64	42,2
Апомиксис	218	0	0	0	0	0	0
Перекрестное опыление*	216	205	94,9	1,0	26±4	89	58,4
Кантата 50 (2n x 2n)							
Самоопыление	212	138	65,1	1,0	26±5	56	36,8
Апомиксис	228	0	0	0	0	0	0
Перекрестное опыление*	232	218	93,9	1,1	29±6	96	50,0
Памяти Вавилова (2n x 2n)							
Самоопыление	194	132	68,1	1,2	28±4	48	45,8
Апомиксис	187	0	0	0	0	0	0
Перекрестное опыление*	207	190	91,8	1,3	31±3	62	58,1
Минай Шмырев (4n) x смесь пыльцы смородины (2n)							
Перекрестное опыление	283	86	30,4	1,1	16±3	24	20,8
Кантата 50 (4n) x смесь пыльцы смородины (2n)							
Перекрестное опыление	256	79	30,9	1,2	14±2	18	16,6
Памяти Вавилова (4n) x смесь пыльцы смородины (2n)							
Перекрестное опыление	272	89	32,7	1,2	12±1	21	19,0
Минай Шмырев (2n) x смесь пыльцы смородины (4n)							
Перекрестное опыление	245	110	44,9	0,9	28±4	56	44,6
Кантата 50 (2n) x смесь пыльцы смородины (4n)							
Перекрестное опыление	232	108	46,6	1,0	31±3	49	48,9
Памяти Вавилова (2n) x смесь пыльцы смородины (4n)							
Перекрестное опыление	218	102	46,8	1,0	26±2	42	47,6

* в качестве отцовской формы использовалась смесь пыльцы диплоидных сортов смородины;
** в качестве отцовской формы использовалась смесь пыльцы автотетраплоидных сортов смородины.

Сравнительный анализ результатов гибридизации $4n \times 4n$ и $2n \times 2n$ показал, что при самоопылении автотетраплоидов процент полезной завязи ниже (39,1-42,3 %), чем при самоопылении диплоидов (65,1-71,1 %). При перекрестном опылении тетраплоидов процент завязавшихся ягод несколько повышается, но остается ниже, по сравнению с диплоидами (91,8-94,9 %). Во всех вариантах гибридизации ягоды крупные – 1,2-1,4 г при $4n \times 4n$ скрещиваниях и 0,9-1,3 при $2n \times 2n$ скрещиваниях. Всхожесть семян, сформированных при перекрестном опылении, выше, чем при самоопылении. Эта тенденция характерна как для $2n \times 2n$, так и для $4n \times 4n$ комбинаций скрещивания. Количество развивающихся семян выше при переопылении диплоидов (21-34 шт./плод), чем при скрещивании тетраплоидов (5-16 шт./плод). Также установлено, что завязываемость семян у тетраплоидных форм происходит не только за счет самоопыления и перекрестного опыления, но и за счет апомиктического развития (3,3-6,5 %).

Выводы.

1. Процесс макроспорогенеза у автотетраплоидных форм, в сравнении с диплоидами *Ribes nigrum*, растянут и протекает с нарушениями: дегенерация диад и тетрад, зародышевых мешков, развитие апоспорических зародышевых мешков с аномальными отклонениями в развитии.

2. Микроспорогенез у автотетраплоидных форм, в сравнении с диплоидными формами *Ribes nigrum*, проходит с серьезными отклонениями: образование групп из 5, 4, 3, 2 хромосом и унивалент, выброс отдельных хромосом за пределы метафазной пластинки, задержка в расхождении хромосом, формирование анеуплоидных ядер, большого числа пентад, гексад и полиад.

3. Аномалии при микроспорогенезе у автотетраплоидных форм *Ribes nigrum* приводят к увеличению абортивности пыльцы.

4. Возможность свободного переопыления $2n \times 4n$, $4n \times 2n$, $4n \times 4n$ форм и сортов *Ribes nigrum* открывает перспективу по использованию тетраплоидов смородины черной в селекционной работе.

5. Повышенная самофертильность и способность к апомиксису у колхиплоидов *Ribes nigrum* в сочетании с высокой способностью к вегетативному размножению позволит получать самоплодные сорта на исходном генофонде индуцированных нами автополиплоидов.