

## **ГЕНЕТИКА И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 581.48; 581.848

О ДВУХ ТИПАХ ПОЛИЭМБРИОНИИ У ЛИНИИ СОРГО ПЭ-32

Н.Х. Еналеева, И.В. Чеснокова

*Саратовский государственный университет им. П.Г.Чернышевского*

Полиэмбриония или многозародышевость семян - явление, широко распространенное в растительном мире и с разной частотой встречается практически у всех исследованных видов покрытосеменных растений. Существует обширная информация о морфологическом проявлении, эмбриологических предпосылках и механизмах возникновения многозародышевости. Установлено, что некоторые типы многозародышевости тесно связаны с апомиксисом и гаплоидией - явлениями, имеющими прикладное значение, и нередко полиэмбриония используется в качестве надежного морфологического маркера для идентификации апомиктических и гаплоидных форм (Хохлов и др., 1976; Селиванов, 1983).

Наименее изученным в настоящее время является генетический аспект полиэмбрионии. Поскольку для некоторых видов получены мутации, вызывающие значительное повышение частоты полиэмбрионии (Kermicle, 1971; Green A.G., Salisbury, 1983; Huyghe, 1987; Linacero, Vazquez, 1994; Zhang, Somerville, 1997), а также показана возможность отбора на данный признак (Хохлов и др., 1976; Селиванов, 1983), не вызывает сомнения тот факт, что многозародышевость детерминирована генетически. Для идентификации генетических систем, контролирующих определенные типы полиэмбрионии, необходимо получение линий, характеризующихся константным и высокочастотным проявлением конкретных типов полиэмбрионии в ряду поколений.

У сорго полиэмбриония встречается у многих форм, однако, как правило, с весьма низкой частотой - 0,03-0,12% (Тырнов и др., 1971; Иванов, Селиванов, 1975; Ишин и др., 1987; Ross, Wilson, 1969; Tsvetova, 1994; Цветова и др., 1994; Цветова, 1996; 1997). Поэтому большой интерес представляет линия ПЭ-32, выделенная путем внутривидовой гибридизации и отбора (Тырнов, Еналеева, Беляева, не опубликовано), у которой частота многозародышевости в шестом цикле отбора достигла 10%. Целью настоящей работы было изучение полиэмбрионии у данной линии с применением методов визуальной диагностики сухих зерновок, их анатомического исследования и проращивания.

### Материал и методы

В качестве материала использовалось самоопыленное семенное потомство линии ПЭ-32 шестого цикла отбора на полиэмбрионно. Исследовались зерновки 15 случайно выбранных растений.

*Методика определения частоты полиэмбрионии на сухих зерновках.* Зерновки помещались в чашку Петри и анализировались на стереоскопическом микроскопе МБС-9 при увеличении X 20. Отбирались зерновки с двумя зародышами. Как правило, двухзародышевые зерновки были более крупного размера по сравнению с однозародышевыми и имели едва заметную разделительную бороздку на эндоспермальной части семени.

*Методика определения частоты полиэмбрионии при проращивании зерновок.* Зерновки, предварительно выдержанные в течение 20 минут в растворе диацита, оставались на сутки в воде при комнатной температуре, затем помещались в кюветы с влажной фильтровальной бумагой и накрывались светонепроницаемыми крышками. Кюветы оставались в камере при температуре 24-26°C на 3-4 суток. Проростки визуально анализировались и среди них выделялись двойни.

*Методика анатомического анализа зерновок.* Зерновки на 14-16 часов помещали в воду для набухания, затем на сутки - в ацетоалкоголь (1:3) для фиксации. Под биноклем с помощью лезвия зерновки продольно разрезались и половинки помещались в чашки Петри с глицерином, подкрашенным ЖК. Срезы анализировались на стереомикроскопе МБС-10 при увеличении X20, X40. Микрофотографирование срезов проводилось с помощью VEB-камеры.

Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам (Лакин, 1990).

### Результаты и обсуждение

*Оценка частоты полиэмбрионии в самоопыленном потомстве линии сорго ПЭ-32 шестого цикла отбора.* Из 13922 зерновок 15 растений 932 зерновки оказались двухзародышевыми, что составило 6,7%. Результаты анализа зерновок индивидуально по растениям показали, что процент полиэмбрионии варьирует в диапазоне от 3,1 до 10,0 (Табл. 1).

По данным лаборатории, максимальная частота полиэмбрионии в предыдущем поколении, т.е. пятом цикле отбора, соответствовала 5,1%, средняя же частота полиэмбрионии для этого цикла составляла 1,83%. Таким образом, частота полиэмбрионии в шестом цикле отбора повысилась. Однако, следует принять во внимание тот факт, что ранее оценка частот полиэмбрионии производилась на основе анализа результатов проращивания, т.е., двойни выделялись и подсчитывались на стадии проростков. Не исключено, что методы диагностики полиэмбрионии по сухим зерновкам и по проросткам дают неодинаковые

результаты, и в связи с этим было необходимо провести сравнение этих методов.

Таблица 1. Частоты двухзародышевых зерновок в потомстве растений сорго линии ПЭ-32 шестого цикла отбора на полиэмбрионии

№ растения	Число зерновок		Частота полиэмбрионии, %
	всего	с 2 зародышами	
1	727	72	9,9
2	425	19	4,5
3	509	27	5,3
4	864	62	7,2
5	306	14	4,6
6	1804	80	4,4
7	417	17	4,1
8	1819	181	10
9	584	44	7,5
10	747	38	5,1
11	1339	90	6,7
12	737	56	7,6
13	1271	126	9,9
14	1376	77	5,6
15	997	29	3,1
Всего	13922	932	6,7

Для опыта использовано семенное потомство растений № 1, 8 и 12, у которых, согласно приведенным выше данным, частоты полиэмбрионии составляли 9,9%, 10% и 7,6%, соответственно. Полиэмбрионные и моноэмбрионные зерновки отдельно замачивались и проращивались для каждого из трех растений. На стадии проростков производили выявление близнецов по стандартной методике в каждой группе.

Из 72 двухзародышевых зерновок выделено 60 двоен, что соответствует частоте полиэмбрионии 8,3% (Табл. 2). Из 12 остальных двухзародышевых зерновок часть - не проросли, часть - оказались одноростковыми, что также, по-видимому, связано с непрорастанием одного из зародышей. Из 655 моноэмбрионных зерновок выделено 4 двойни, что составило 0,6%. Этот факт, по-видимому, объясняется тем, что в некоторых случаях ориентация зародышей не позволяет увидеть второй зародыш в зерновке. В сумме же процент близнецовых проростков для данного растения составил 8,9, что на 1% ниже показателя, установленного при анализе сухих зерновок. Сходные результаты были получены для двух других растений (Табл. 2). Различия в показателях полиэмбрионии между двумя вариантами анализа - недостоверны.

Следовательно, можно заключить, что зарегистрированное нами повышение значений полиэмбрионии для растений шестого цикла отбора носит объективный характер.

Таблица 2. Частоты полиэмбрионии у трех растений, выявленные при анализе сухих зерновок и при их проращивании

№ растений	Сухие зерновки			Проростки				
	Всего	Двухзародышевые	% п/э	Число двоен из зерновок:				% п/э
				двухзародышевых		однозародышевых		
				шт.	%	шт.	%	
1	727	72	<b>9,9</b>	60	8,3	4	0,6	<b>8,9</b>
8	1819	181	<b>10,0</b>	167	9,2	13	0,7	<b>9,9</b>
12	737	56	<b>7,6</b>	45	6,1	2	0,3	<b>6,4</b>

*Морфологический анализ двухзародышевых зерновок.* Анализ на стереомикроскопе морфологии двухзародышевых зерновок показал, что они различаются по расположению зародышей относительно друг друга. В одних случаях зародыши сближены, в других - расположены на расстоянии друг от друга. В единичных случаях встречались сросшиеся зерновки.

С учетом этих признаков зерновки 10 растений были разделены на группы, и результаты подсчетов частот встречаемости каждого из морфологических типов представлены в таблице 3. Сросшиеся зерновки составляют немногочисленную группу и отмечены лишь в потомстве четырех растений, при этом их частоты составили 0,5%, 0,2%, 0,07% и 0,1%. Соотношение двухзародышевых зерновок с расположением зародышей "рядом друг с другом" и "на расстоянии" у разных растений варьирует. В одних случаях они представлены почти в равном количестве, в других - явно доминируют зерновки с близким расположением зародышей (у растений № 4 и № 8). Особенно отчетливо эта тенденция видна на гистограмме (Рис. 1).

*Анатомический анализ зерновок.* Двухзародышевые зерновки из потомства 5 растений, различающиеся положением зародышей, продольно разрезались лезвием, и после обработки ЖК срезы анализировались под стереомикроскопом при верхнем освещении.

Вследствие окраски в темно-фиолетовый цвет крахмала эндосперма, на срезах довольно хорошо различались 2 зародыша и 2 эндосперма, а также можно было видеть контуры семенной и плодовой оболочек (Рис. 2).

Таблица 3. Соотношение разных типов зерновок в потомстве растений сорго линии ПЭ-32

№ растения	Число зерновок	Зерновки, % с:				Сросшихся
		1 зародышем	2 зародышами, расположенными			
			рядом с другим	друг на расстоянии		
1	727	90,0	5,7	3,8	0,5	
3	509	95,0	2,4	2,6	0	
4	864	94,5	4,2	0,3	0	
5	306	96,0	2,0	2,0	0	
8	1819	90,0	8,5	1,5	0	
9	584	93,3	3,6	3,1	0	
12	737	93,5	4,5	2,0	0	
13	1271	90,8	6,3	2,7	0,2	
14	1376	96,0	3,1	0,8	0,1	
15	997	97,0	2,2	0,7	0,1	

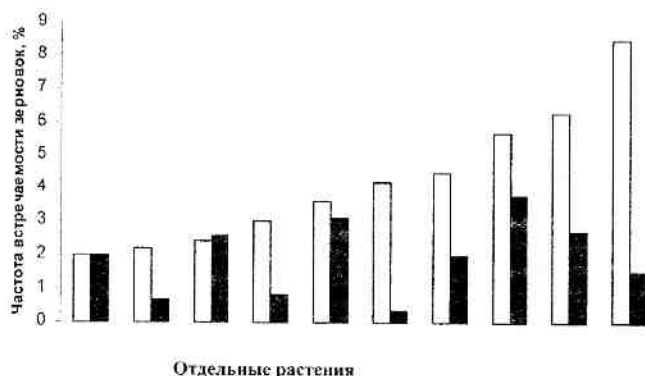


Рис. 1. Соотношение частот встречаемости подизмбрионных зерновок с разным расположением зародышей у растений линии ПЭ-32.

зародыши, расположенные близко друг к другу  
 - // - на расстоянии

Установлено, что, как правило, на срезах зерновок с близкорасположенными зародышами семенная кожура окружала оба эндосперма и зародыша, а на срезах зерновок с удаленными друг от друга зародышами семенная кожура проходила через центр зерновки, т. е. окружала каждый из эндоспермов. На срезах сросшихся зерновок можно было видеть, что каждый из эндоспермов окружен и семенной, и плодовой оболочками. Схематически все три варианта представлены на рисунке 4. Полученные результаты анатомического анализа свидетельствуют о том, что двухзародышевость зерновок может быть разной природы. В первом

случае, очевидно, оба зародыща и эндосперма возникли в одной семяпочке, но из разных

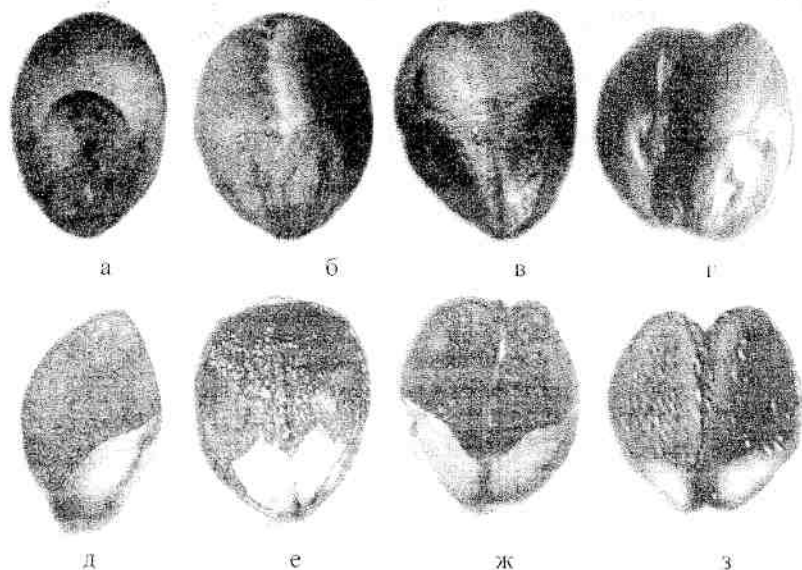


Рис. 2. Зерновки сорго линии ПД-32: а-г — внешний вид, д-з — продольные срезы; а, д — однозародышевая; б, е — двухзародышевая с близкорасположенными зародышами; в, ж — двухзародышевая с зародышами, расположенными на расстоянии друг от друга; г, з — сросшиеся зерновки.

зародышевых мешков или одного зародышевого мешка. Вторым случаем - наличие семенной кожуры, окружающей каждый из эндоспермов, говорит о существовании другого типа полиэмбрионии. Для него характерно наличие в завязи двух семяпочек, в каждой из которых развивается свой зародышевый мешок. Анатомический анализ выборок двухзародышевых зерновок с зародышами, расположенными "рядом" и "на расстоянии", у 5 разных растений показал, что в зерновках первого типа от 86,4% до 100% случаев оба зародыща развиваются в одной семяпочке. В зерновках второго типа от 40% до 100% оба зародыща развиваются в двух разных семяпочках (Табл. 4). Суммарные данные по всем 5 растениям говорят о том, что в 91,7% зерновок с близкорасположенными зародышами зародыщи происходят из одной и той же семяпочки, а в 89,5% зерновок с зародышами, расположенными на расстоянии друг от друга, зародыщи происходят из разных семяпочек.

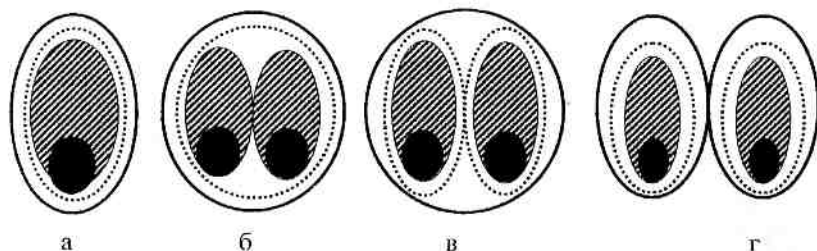


Рис.3. Схематическое изображение разных типов зерновок сорго линии ПЭ-32: а – однозародышевая; б – двухзародышевая, оба зародыша и эндосперма в одной семязпочке; в – двухзародышевая, зародыши и эндоспермы в разных семязпочках; г – сросшиеся зерновки.

— перекарный, ..... семенная кожура,  
 // эндосперм, ■ зародыш.

Таким образом, очевидно, что для линии ПЭ-32 характерно наличие двух разных типов полиэмбрионии. Соотношение этих двух типов у разных растений варьирует. У некоторых растений оба типа встречаются почти в равном количестве, у других - существенно преобладает односемязпочковый тип полиэмбрионии. В ходе дальнейших исследований предполагается установить возможность отбора на конкретный тип полиэмбрионии, используя в качестве исходного материала близнецовое потомство соответствующих форм.

Таблица 4. Результаты анатомического анализа двухзародышевых зерновок с разным расположением зародышей

№ растения	Расположение зародышей в зерновке относительно друг друга	Число зерновок	Зерновки с:			
			одной семязпочкой		двумя семязпочками	
			шт.	%*	шт.	%*
3	Рядом	11	11	100	0	0
	На расстоянии	12	0	0	12	100
4	Рядом	27	26	96,3	1	3,7
	На расстоянии	5	3	60	2	40
13	Рядом	49	45	91,8	4	8,2
	На расстоянии	23	0	0	23	100
14	Рядом	37	32	86,4	5	13,6
	На расстоянии	10	2	20	8	80
15	Рядом	21	19	90,4	2	9,6
	На расстоянии	7	1 ( )	14,8	6	85,2
Всего	Рядом	145	133	91,7	12	8,3
	На расстоянии	57	6	10,5	51	89,5

Примечание: \* - проценты от числа двухзародышевых зерновок

Второе важное заключение состоит в том, что частота полиэмбрионии у сорго может быть выявлена в результате визуальной диагностики сухих зерновок. Преимущество такого способа оценки частоты полиэмбрионии, по сравнению с традиционным методом проращивания, заключается, во-первых, в упрощении этой процедуры, во-вторых, исключается возможность гибели материала во время проращивания из-за поражения грибковыми заболеваниями, которое в некоторые годы носит массовый характер. Получаемая в таких случаях информация о частотах полиэмбрионии бывает искаженной или неполной. В-третьих, работа по выявлению полиэмбрионии может происходить в любое время года, а не быть приуроченной к весеннему периоду в связи с необходимостью высадки в грунт выделенных двосн, к тому же, двухзародышевые зерновки можно непосредственно высевать в грунт. Проведенный нами эксперимент показал, что технически осуществлять диагностику зерновок оказалось несложно, поскольку двухзародышевость достаточно отчетливо выявляется при небольшом увеличении бинокуляра, ручной лупы и даже без увеличения. Данные сравнительного анализа частот полиэмбрионии, выявленные методом морфологического анализа сухих зерновок и традиционным методом проращивания по трем растениям, показали отсутствие достоверных различий между полученными показателями (9,9% - 8,9%; 10,0% - 9,9%; 7,6% - 6,4%) и, следовательно, сопоставимость этих двух методов.

Дополнительным преимуществом «сухого» метода оказалось то, что визуально регистрируемый признак - расположение зародышей относительно друг друга в полиэмбрионных зерновках, как оказалось в результате анатомического анализа таких зерновок, может служить маркером разных типов полиэмбрионии, что позволяет вести направленный отбор по ее конкретному типу.

#### *Литература*

Иванов Г.И., Селиванов А.С. О многозародышевости семян у сорго// Вопросы ботаники и генетики. Саратов, 1975. Вып. 1. С. 30-32.

Ишин А.Г., Эльконин Л.А., Тырнов В.С. Сорго: проблемы генетики и селекции. Саратов, 1987. 120 с.

Селиванов А.С. Многозародышевость семян и селекция. Саратов, 1983. 84 с.

Тырнов В.С., Ишин А.Г., Завалишина А.Н. О полиэмбрионии и гаплоидии у сорго// Тр. Сарат. с.-х. ин-та. Т.28. Генетика и селекция зерновых культур в Поволжье. 1971. С.214-220.

Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. Гаплоидия и селекция. М., 1976. 221 с.

Цветова М.И. Исследование полиэмбрионии сорго с целью получения гаплоидов для практической селекции// Сельхоз. биология. 1996. N1. С. 86-91.



Цветова М.И. Изучение закономерностей экспериментальной полиплоидии у сорго. Автореф. дис... канд. биол. наук. С.- Пб. 1997. 19 с.

Цветова М. И., Ишин А. Г., Еналесва Н. Х., Беляева Е. В. Проявление полиэмбрионии и элементов апомиксиса у сорго в связи с индуцированной полиплоидией // Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований. Труды Междунар. симпоз. Саратов. 1994. С.143-145.

Green A.G., Salisbury P.A. Inheritance of polyembryony in flax (*Linum usitatissimum* L.) // *Canad. J. Genet. Cytol.* 1983. 25. P.117-121.

Huyghe C. La polyembryonie haploide-diploide chez le lin (*Linum usitatissimum* L.). Etude cytologique et physiologique // *Agronomie.* 1987. Vol. 7. N 8. P. 567-573.

Kermicle J.L. Pleiotropic effects on seed development of the indeterminate gametophyte gene in maize // *Amer. J. Bot.* 1971. V.58. N 1. P. 1-7.

Linacero R., Vazquez A.M. Genetic analysis of a polyembryonic mutant in rye // *Sex. Plant Reprod.* 1994. V. 7. P. 290-296.

Ross W.M., Wilson J.A. Polyembryony in Sorghum // *Crop Science.* 1969. V.9. N6. P.842-843

Tsvetova M.I. Investigation of polyembryony in Sorghum in connection with induced polyploidy and apomixis // *Apomixis Newsletter.* 1994. N7. P.36-38.

Zhang J.Z., Somerville. Suspensor-derived polyembryony caused by altered expression of valyl-tRNA synthetase in the *twn2* mutant of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Developmental Biology.* 1997.V. 94. P. 7349-7355.

УДК 581.16 + 582.998

## ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ СИСТЕМЫ СЕМЕННОГО РАЗМНОЖЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ РЯДА ВИДОВ ASTERACEAE ИЗ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А.С. Кашин, Н.В. Добрыничева, И.С. Кочанова, Н.Ю. Николаева  
*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского*

Под параметрами систем размножения понимаются те механизмы, или элементы систем размножения, изменение которых оказывает существенное влияние на генетическую структуру популяций вида и характер протекающих в них генетических процессов (Куприянов, 1989). Особенно важными в этом отношении для системы семенного размножения оказываются такие основные параметры, как способ опыления (аллогамия, автогамия) и способ образования семян (амфимиксис, апомиксис). Но степень изученности их в популяциях цветковых по-прежнему остаётся недостаточной.