



УДК 575.22 : 581.163

ИЗМЕНЧИВОСТЬ В АГАМОСПЕРМНОМ ПОТОМСТВЕ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.) ПО ФЕРТИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ

С.О. Батури¹**Е.В. Амброс²**

¹⁾ Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, 10

e-mail: SO_baturin@mail.ru

²⁾ Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

e-mail: ambros@ngs.ru

Показано наличие изменчивости по фертильности пыльцы как среди потомков первого, так и второго агамоспермного поколения сорта Пурпуровая. Выявлено варьирование значений фертильности пыльцы по годам у одного и того же потомка, что свидетельствует о зависимости генетических систем, ответственных за формирование полноценного мужского гаметофита, от условий произрастания в год вегетации. Изменчивость по фертильности пыльцы среди потомков агамоспермного происхождения открывает перспективы отбора сеянцев, стабильно обладающих гораздо лучшей фертильностью пыльцы, чем исходный материнский сорт, для дальнейшего их включения в селекционные программы.

Ключевые слова: изменчивость, фертильность пыльцы, крупноплодная земляника, агамоспермия, *Fragaria x ananassa*, селекция, окружающая среда.

Введение

У крупноплодной земляники *Fragaria x ananassa* Duch. ($2n=8x=56$) семенное размножение преимущественно осуществлено зиготическим способом (гамоспермия), но при экстремальных условиях опыления и/или оплодотворения – апозиготическим способом (агамоспермия). Изменчивость в апозиготическом потомстве возможна лишь при реализации мейотических форм агамоспермии – гаплоидии, диплоидизации гаплоидной яйцеклетки, диплоспории *Taraxacum*-типа и *Allium*-типа [1]. Показано, что у крупноплодной земляники агамоспермия проявляется в виде псевдогамной диплоспории [2, 3]. Эффективным способом индукции агамоспермного развития нередуцированной яйцеклетки является чужеродное опыление кастрированных цветков крупноплодной земляники пыльцой *Potentilla anserina* L. [4]. При этом у сеянцев агамоспермного происхождения сохраняется тоже число хромосом, что и у материнской формы – $2n=56$, а в потомстве наблюдается генетическая изменчивость (сегрегация по маркерным признакам), свойственная для мейотической формы агамоспермии - диплоспории *Taraxacum*-типа [4, 5]. Крупноплодная земляника октоплоид, что обуславливает гетерозиготность по многим признакам [6, 7], включая фертильность пыльцы [8]. Известно, что процессы микроспорогенеза находятся под сложным генетическим контролем [9]. При реализации мейотических форм агамоспермии в семенном потомстве крупноплодной земляники следует ожидать изменчивость по многим признакам, в том числе и по признаку «фертильность-стерильность» пыльцевых зерен. Цель данной работы – изучение агамоспермного потомства сорта Пурпуровая по признаку «фертильность-стерильность пыльцевых зерен».

Материал и методы

В эксперименте использованы растения сорта Пурпуровая, а также потомки этого сорта первого (A_1) и второго (A_2) поколений ($2n=56$) агамоспермного происхождения. Агамоспермное потомство A_1 и A_2 было получено благодаря индукции партеногенеза нередуцированной яйцеклетки пыльцой лапчатки гусиной (*Potentilla anserina*, $2n=4x=28$) [4]. Потомством A_2 считали сеянцы, возникшие из семян, полученных индукцией партеногенеза у потомков первого поколения (A_1). Для



оценки фертильности пыльцы готовили препараты из смеси пыльцы 2-5 цветков различных порядков, фиксированных по Карнуа (3:1) и окрашенных ацетокармином [10]. Фертильными считали пыльцевые зерна способные равномерно окрашиваться красителем в карминово-красный цвет, стерильными – пыльцевые зерна не окрашенные или неравномерно окрашенные. Пыльцу помещали в каплю красителя, покрывали покровным стеклом, смазанным консервирующей и просветляющей жидкостью Смита [11]. Учитывали не менее 500 пыльцевых зерен. Фертильность (%) оценивали по шкале, предложенной G.M. Darrow [12] для земляники, согласно которой растения с фертильностью пыльцы 0,0% относятся к мужскостерильным, от 0,1% до 6,0% - к полустерильным, от 6,1% до 20,0% - к полуфертильным, от 20,1% до 50,0% - к фертильным, а от 50,1% до 100,0% - к высокофертильным. Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартных методов расчета средней арифметической и ее ошибки, коэффициента вариации (V,%). Значение коэффициента вариации оценивали по следующей шкале варьирования признака (в %): небольшое варьирование – от 0 до 4; нормальное – от 5 до 44; значительное – от 45 до 64; большое – от 65 до 84; очень большое – от 85 до 104; аномальное – от 105 и больше [13]. Для установления достоверности различий между процентными долями двух

$$u = |\varphi_1 - \varphi_2| \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}, \text{ где } \varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}, n_1 \text{ и } n_2$$

выборок, использовали *u*-критерий Фишера
 n_2 – число пыльцевых зерен, p – вероятность, она же равна средней фертильности пыльцы, % [14].

Результаты и их обсуждение

Изучение фертильности пыльцы в агамоспермных потомках

Фертильность пыльцы сорта Пурпуровая в разные годы вегетации варьирует от 7,0% до 27,8%. Среднее значение этого показателя за 6 лет наблюдения (1998 – 2003 гг.) составило 17,6 % [15]. По шкале оценки фертильности пыльцы сорт Пурпуровая отнесли к полуфертильным.

У потомков агамоспермного происхождения (A_1) обнаружена изменчивость по фертильности пыльцы (табл.1). Так, среди 13 агамоспермных потомков A_1 выявлено 2 высокофертильных сеянца, что составило 15% , фертильных сеянцев - 4 (31%), полуфертильных - 3 (23%), полустерильных - 3 (23%) и мужскостерильных - 1 сеянец (8%) (рис. 1). Следует отметить, что фертильность пыльцы у 8 сеянцев (61,5%) была выше, чем у материнской формы, что создает возможности отбора по качеству пыльцы среди агамоспермного потомства крупноплодной земляники. У мужскостерильного сеянца № Ю-547 в пыльниках фертильные пыльцевые зерна отсутствовали, т.е. были полностью дефектны. Причем, мужская стерильность стабильно проявлялась в течение всех 6 лет наблюдений, что свидетельствует о полной генетической супрессии развития фертильных пыльцевых зерен.

Значение коэффициента вариации (V) по фертильности пыльцы позволяет нам рассматривать влияние внешней среды на экспрессию генетических систем, ответственных за формирования фертильных пыльцевых зерен у конкретного агамоспермного потомка. Так, из 12 изученных потомков A_1 лишь у 2 отмечено варьирование значений фертильности пыльцы в пределах нормы, у 3 потомков – значительное варьирование, у 1 – большое, у 2 – очень большое и у 4 – аномальное. По фертильности пыльцы большая часть агамоспермных потомков проявляют высокие значения коэффициента вариации, что свидетельствует о зависимости успешности протекания микроспорогенеза от условий вегетации года.



Таблица 1

**Фертильность пыльцы в агамоспермном потомстве сорта Пурпуровая
(1998 – 2003 гг.)**

Образец	Фертильность пыльцы, % ($\bar{X} \pm m_x$)	Коэффициент вариации (V), %
Пурпуровая (контроль)	17.6±4.8	66.8±19.3
Ю-436	27.0±9.7*	88.0±25.4
Ю-541	3.9±1.7*	104.0±30.0
Ю-542	19.2±8.9	113.6±32.8
Ю-543	48.2±12.2*	50.8±18.0
Ю-545	19.6±8.6*	107.1±30.9
Ю-546	51.8±12.0*	40.1±16.4
Ю-547	0.0	-
Ю-555	32.0±12.0*	74.9±26.5
Ю-561	63.0±6.7*	21.4±7.6
Ю-564	14.3±8.9*	152.7±44.1
Д-344	49.5±13.6*	61.3±19.4
96/5-13-2	2.4±1.4*	115.9±41.0
96/5-13-5	5.8±1.8*	61.2±21.6

Примечание: * - различие с контролем достоверно при $P > 0,99$

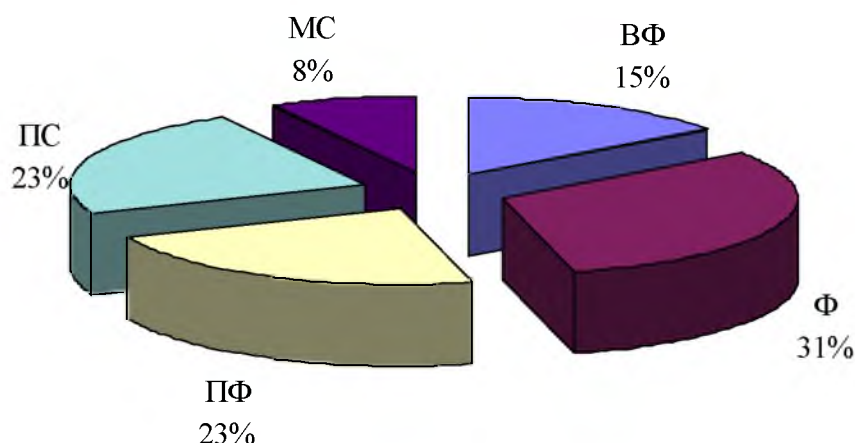


Рис. 1. Распределение фенотипов по качеству пыльцы в агамоспермном потомстве первого поколения полужерильного сорта Пурпуровая

Второе поколение сеянцев агамоспермного происхождения (A_2) получено от полустерильного образца № Ю-541, у которого фертильность пыльцы варьирует от 0,0% до 16,1%, а в среднем составляет 4,7%. Все сеянцы A_2 имеют фертильность пыльцы выше, чем у исходного материнского образца № Ю-541. Выделяются высокими значениями фертильности пыльцы образцы № 98/4-52-5, № 98/4-53-1, №98/4-53-4 и №98/4-61-5, № 98/4-76-6. Фертильность пыльцы у некоторых образцов варьирует в отдельные годы. Значительные различия по фертильности пыльцы демонстрируют сеянцы №98/4-53-1, №98/4-61-5, №98/4-61-3 и №98/4-76-5 (рис. 2). Таким образом, в агамоспермном потомстве A_2 вновь наблюдается изменчивость по фертильности пыльцы как при сравнении потомков между собой, так и в сравнении их с материнской формой. Причем на фертильность пыльцы могут оказывать влияние климатические условия, характерные для отдельных лет произрастания растений [12].

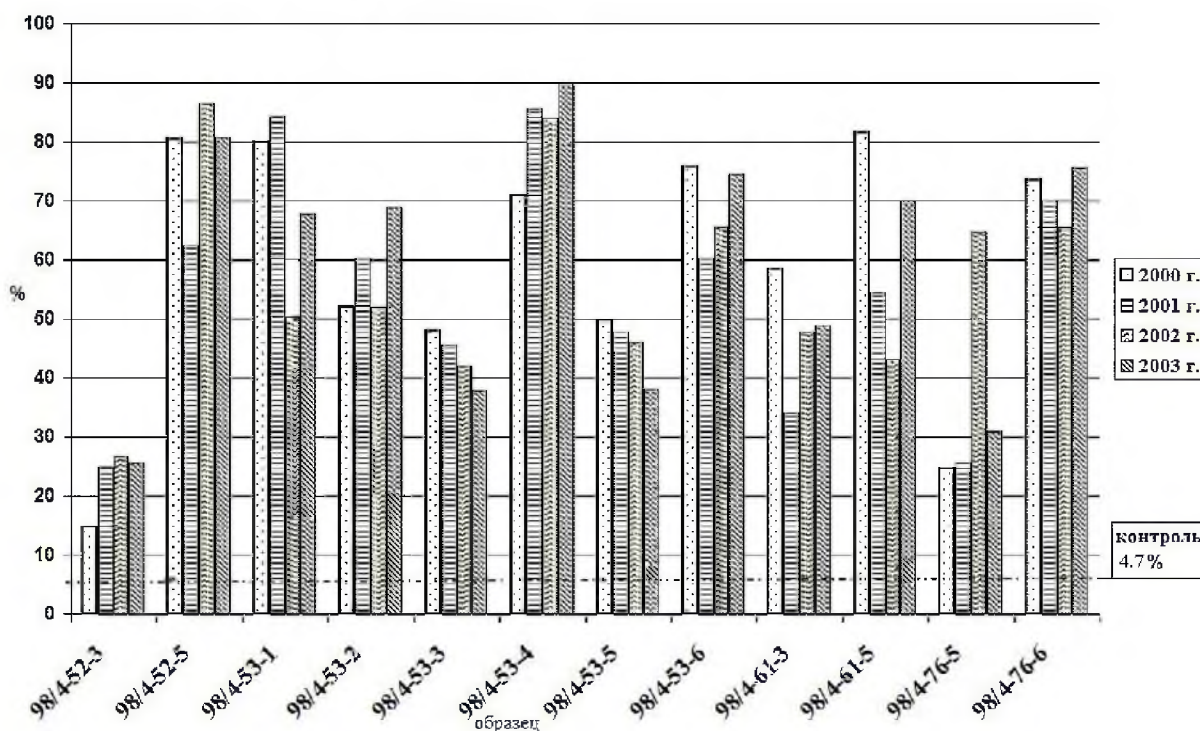


Рис. 2. Фертильность пыльцы у агамоспермных потомков второго поколения сорта Пурпуровая

Анализ микроспорогенеза у агамоспермных потомков сорта Пурпуровая

У *Fragaria* тетрады образуются по симультанному типу, расположение микроспор тетраэдрическое [16]. Изучение микроспорогенеза проведенное у растений сорта Пурпуровая и его потомков A_1 выявило два ключевых момента возникновения дефектных пыльцевых зерен: после микроспорогенеза и во время микроспорогенеза. В первом случае мейоз в пыльниках протекает нормально, включая стадию формирования тетрад микроспор. Доли обнаруженных диад, триад и полиад не доминируют среди продуктов мейоза. Например, у фертильного агамоспермного потомка № Ю-545 из 525 просмотренных тетрад, 23,0% составляли диады, 0,8% - триады, при этом фертильность пыльцы составила 23.5 ± 8.5 .

Нарушения в формировании мужского гаметофита становятся заметными после распада тетрад микроспор, т.е. на стадии одноядерного пыльцевого зерна в период вакуолизации цитоплазмы. Вместо крупной вакуоли у таких микроспор образуется большое число мелких, не сливающихся вакуолей. Затем цитоплазма отстает от оболочки микроспоры и концентрируется вокруг ядра в виде ячеистого комка, и микроспоры в дальнейшем дегенерируют. Одновременно с дегенерацией содержимого микроспоры происходит резкая деформация ее оболочки. При этом размеры дефектных пыльцевых зерен остаются близкими к нормальным, т.е. фертильным пыльцевым зернам. Не найдено ни одной abortивной микроспоры, на которую можно было бы сослаться как на дегенерацию микроспор в пределах тетрады. Таким образом, в этом случае ключевым периодом для формирования фертильной пыльцы является период после распада тетрад микроспор, т.е. увеличения цитоплазмы, деления ядра и быстрого роста оболочек пыльцевого зерна.

Во втором случае наблюдаются нарушения в ходе мейоза при микроспорогенезе. Например, у мужскостерильного образца Ю-547 со стабильным проявлением стерильности пыльцы, отклонения нормального течения мейоза выражаются в появлении унивалентов - отдельных сильно сокращенных хромосом в профазе I (лептотена - пахитена), лежащих вне ассоциации хромосом. В дальнейшем в



метафазе I они располагаются беспорядочно по веретену деления. Вместо полноценной тетрады микроспор формируются различные варианты аномальных тетрад, диад, монад. Причём, в аномальных тетрадах микроспоры разной величины. В последующем происходит образование микроспор разного размера - от мелких до крупных. После распада тетрады микроспор, одноядерные пыльцевые зерна деформируются, происходит лизис их содержимого.

Известно, что фертильность пыльцы культурных растений *Rosaceae* обусловлена как генотипическими особенностями сорта, так и воздействиями факторов среды при вегетации растения [12, 17, 18]. Среди сортов крупноплодной земляники фертильность пыльцы может сильно варьировать, характеризуя особенности сорта. Так, в исследованиях К. Niemirowicz-Szczytt [19] у сортов *Fragaria* x *ananassa* Regina и Redgauntlet фертильных (окрашенных) пыльцевых зерен было 88,8% и 43,4%, соответственно. К причинам, снижающим фертильность пыльцы у сорта Redgauntlet, автор отнес элиминацию отдельных хромосом из зоны веретена деления микроспороцитов, обнаружение диад и триад, а также дегенерацию 1-2 микроспор в тетраде. Выявлено, что если фертильность пыльцы не выше 10%, то она не прорастала [19]. Результаты нашего исследования показали наличие изменчивости по фертильности пыльцы среди потомков как первого, так и второго агамоспермного поколения. Об изменчивости при агамоспермии у крупноплодной земляники *Fragaria* x *ananassa* Duch. впервые сообщил R. Bauer [20]. В агамоспермном потомстве сорта Mieze Schindler, обладающего пестичным типом цветков, он описал расщепление по типу пола цветка на фенотипы с пестичными цветками и обоеполями. Причину этой изменчивости автор объяснил диплоидизацией редуцированных яйцеклеток в мейотических зародышевых мешках. Вскоре Г.Н.Шангин-Березовский [2] и затем К. Niemirowicz-Szczytt [19] в агамоспермных потомствах сортов с пестичным типом цветков подтвердили изменчивость по типу пола и описали изменчивость по другим морфологическим признакам. В наших экспериментах, проведенных ранее, также были получены данные расширяющие представления об изменчивости при агамоспермии у крупноплодной земляники [4, 5, 21]. Показано, что изменчивость в агамоспермном потомстве крупноплодной земляники является вполне достаточной для осуществления отбора по селекционно-значимым признакам [21, 22].

Заключение

У крупноплодной земляники условия среды (интенсивность солнечной инсоляции, температура и влажность воздуха, длина вегетационного периода, влажность почвы произрастания и др.) могут вызывать различную степень стерильности цветков, вплоть до полной стерильности [12]. Выявленное в эксперименте варьирование фертильности пыльцы по годам у одного и того же потомка, свидетельствует о зависимости активности генетических систем, ответственных за формирование полноценного мужского гаметофита, от условий произрастания растений в год вегетации. При агамоспермном размножении крупноплодной земляники обнаружена изменчивость по фертильности пыльцы как среди потомков первого, так и второго поколения. Изменчивость по фертильности пыльцы среди потомков агамоспермного происхождения, открывает перспективы отбора сеянцев, обладающих гораздо лучшей фертильностью пыльцы, чем исходный материнский сорт, для их дальнейшего включения в селекционные программы [22].

Список литературы

1. Малецкий С.И., Левитес Е.В., Батурин С.О., Юданова С.С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений. Генетический словарь. Новосибирск: Институт цитологии и генетики СО РАН, 2004. - 106 с.
2. Шангин-Березовский Г.Н. О материнском наследовании у земляники // Тр. ин-та генетики. - М., 1962. - Т.26. - С. 68-84.

3. Сухарева Н.Б. Об апомиксисе у земляники. В сб.: Апомиксис и его значение для эволюции и селекции. Новосибирск: Наука, 1976. - С. 152-164.
4. Батурин С.О. Экспериментальный апомиксис у крупноплодной земляники (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Новосибирск, 1997. - 16 с.
5. Малецкий С.И., Сухарева Н.Б., Батурин С.О. Наследование пола у апомиктических семян Земляники крупноплодной (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Генетика. - 1994. - Т.30. - № 2. - С. 237-243.
6. Galletta G.J., Maas J.L. Strawberry genetics // HortScience. - 1990. - Vol. 25. - № 8. - P. 871-879.
7. Scott D.H., Lawrence F.J. Strawberries // Advances in fruit breeding / Ed. J.Janick, J.N.Moore. Purdue University Press, West Lafayette, Ind., 1975. - P. 71-97.
8. Valleau W.D. Inheritance of flower types and fertility in the strawberry // Americ. J. of Botany. - 1923. - № 10. - P. 259-274.
9. Голубовская И.Н. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе / Цитология и генетика мейоза. М.: Наука, 1975. - С. 312-343.
10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - М.: Колос, 1988. - 272 с.
11. Абрамова З.В., Карлинский О.А. Практикум по генетике. - Л.: Колос, 1979. - 192 с.
12. Darrow G.M. The strawberry - history, breeding and physiology / Holt, Rinehart and Winston, New York, 1966. - 447 p.
13. Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. - М.: Наука, 1990. - 296 с.
14. Урбах В.Ю. Непараметрические критерии различия // Биометрические методы (статистическая обработка опытных данных в биологии, сельском хозяйстве и медицине). М.: Наука, 1964. - С. 166-171.
15. Амброс Е.В. Мужская фертильность в партеногенетическом потомстве *Fragaria x ananassa* Duch. // Сб. тез. ВОГиС «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития». - Москва, 2004. - Т. I. - С. 143.
16. Фадеева Т.С. Генетика земляники. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975. - С. 43-49.
17. Erlanson E.W. Sterility in wild rose in some species hybrids // Genetics. - 1931. - V. 16. - P. 75-96.
18. Яндовка Л.Ф., Шамров И.И. Фертильность пыльцы *Cerasus vulgaris* и *Cerasus tomentosa* (ROSACEAE) // Ботанический журнал. - 2006. - Т. 91. - № 2. - С. 206-218.
19. Niemirowicz-Szczytt K. Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) haploids and their generative progeny. Induction and characteristics. Warszawa. Warsaw Agricultural University Press, 1987. - 71 p.
20. Bauer R. Grundlagen und Methoden der zuchtung bei gartenerdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Z. Pflanzenzuchtg. - 1960. - Bd 44. - № 1. - S. 73-100.
21. Батурин С.О. Сравнительно-морфологический анализ апомиктического потомства крупноплодной земляники // Сельскохозяйственная биология. - 2001. - № 1. - С. 39-43.
22. Амброс Е.В., Батурин С.О. Перспективы использования семян агамоспермного происхождения в селекции крупноплодной земляники (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Сиб. вестн. с.-х. науки. - 2010. - № 9. - С. 36-42.

VARIABILITY OF POLLEN FERTILITY IN AGAMOSPERMIC OFFSPRINGS *FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.

S.O. Baturin¹
E.V. Ambros²

¹*Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Department of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk,
630090, Russia*

e-mail: SO_baturin@mail.ru

²*Central Siberian botanical garden,
Siberian Department of the Russian
Academy of Sciences, Novosibirsk,
630090, Russia*

e-mail: ambros@ngs.ru

A variability of pollen fertility among seedlings of the first as well as the second agamospermic generation have been appeared on. A variation values of pollen fertility of one sample (genotype) has been revealed in different years. Such variation indicates a dependence of genetic systems which responsible for male gametophyte development. The fertility variability among agamospermic progenies offers the challenge for choosing such seedlings which have better fertility then, original parents cultivars. These seedlings can be successfully involved in garden strawberry selection programs.

Key words: variability, pollen fertility, garden strawberry, agamospermy, *Fragaria x ananassa*, selection, environment conditions.