



Analiza mejoze triploida šećerne repe

Snežana Mezei · Lazar Kovačev · Jovanka Atlagić · Nevena Nagl

primljeno / received: 08.07.2010. prerađeno / revised: 22.11.2010. prihvaćeno / accepted: 30.11.2010.
© 2011 IFVC

Izvod: U semenskoj proizvodnji triploida šećerne repe u toku žetve dolazi do osipanja semena. Zbog toga u narednih nekoliko godina niču triploidne i tetraploidne biljke. Cilj rada je bio da se uradi citogenetska analiza nepravilnosti u mejozi kod triploidne hibridne sorte šećerne repe. Triploidi šećerne repe u Metafazi I imaju 9 univalenata i 9 bivalenata i mogu da budu izvor aneuploidnih gameta. Pojava aneuploida kao i njihova posledica, delimična ili potpuna sterilnost, jesu problemi koji prate semensku proizvodnju šećerne repe. Acetokarmin *squash* metodom pregledano je ukupno 2124 mejocita, kod kojih su u 14,64% ustanovljene različite nepravilnosti. Konstatovane su nepravilnosti tipa dislociranih hromozoma, ubrzanih (izbeglih) i usporenih (izostalih), kao i hromozomski mostovi.

Ključne reči: citogenetska analiza, mejoza, šećerna repa, triploidi

Uvod

Triploidne hibridne sorte šećerne repe ($2n = 27$) imaju intermedijarne morfološke karakteristike u odnosu na roditelje, poseduju bolja kvantitativna svojstva i višu otpornost prema bolestima, kada je otpornost uslovljena većim brojem minor gena (Nakamura et al. 1992) kao što je to kod otpornosti na *Rhizoctonia* (Hecker & Ruppel 1976) i otpornosti na *Cervosporu* (Skaracis & Smith 1987). Pojedina istraživanja imala su za cilj da uporede F_1 hibride iste genetičke konstitucije na diploidnom, triploidnom i tetraploidnom nivou, da bi se ustanovio optimalni nivo ploidnosti u F_1 generaciji. Unošenjem 9 ili 18 hromozoma procesom ukrštanja u F_1 hibrid nije bilo ni korisnih, ali ni štetnih efekata za prinos korena i sadržaj šećera (Hecker et al. 1969). Većina triploida koji su bili bolji od roditelja, dobijeni su sa tetraploidne majčinske komponente. Triploidi dobijeni sa tetraploida u proseku su za 17 % bolji od recipročnih hibrida (Smith et al. 1979).

U komercijalnoj proizvodnji triploidnih hibrida sa tetraploidne majčinske komponente ograničavajući faktor je prinos semena, koji iznosi svega 50% u poređenju sa triploidnim hibridima dobijenim sa diploidne majčinske komponente. Razlog za ovo povećanje produktivnosti triploida se

ne zna sa sigurnošću. Jedna od pretpostavki je 4:3 odnos perisperma i embrija triploidnog semena sa tetraploida, u poređenju sa 2:3 odnosom kod recipročnog ukrštanja. Ovim se objašnjava brže rano razviće triploida sa tetraploidne majčinske komponente, mada se smatra da je ovo možda najmanji razlog za njihov bolji prinos korena (Bosemark 1977). Prema rezultatima McFarlane et al. (1972) prinos korena triploidnih hibrida je samo 10% bolji od genetički identičnih diploidnih hibrida. Stvaranje visoko produktivnih triploidnih hibrida zahteva širok program ispitivanja kombinacionih sposobnosti muško sterilnih (MS) linija i oprašivača. Triploidne hibridne sorte šećerne repe komercijalno su interesantne jer su potpuno ili parcijalno sterilne obzirom na dodati „n“ broj hromozoma, te je iz triploida teško koristiti određena pozitivna svojstva za stvaranje nove genetičke varijabilnosti (Kovačev i sar. 2005, Kovačev et al. 2008). Pored ovih saznanja u procesu parenja hromozoma u dijakinezi triploida prosek trivalenata je 7,8 % a frekvencija pojavljivanja je 3 do 9 po mejociti. Gamete triploida mogu da sadrže broj hromozoma koji varira od 9 do 18. Više od

Ovo istraživanje je deo projekta broj TR20020: „Poboljšanje germplazme šećerne repe u cilju povećanja prinosa i smanjenja gubitaka nastalih uticajem biotskih i abiotičkih faktora“ (01.04.2008-31.12.2010) Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije / This research results from project TR20020: „Improvement of sugar beet germplasm with aim to increase yield and reduce losses caused by biotic and abiotic factors,“ (01.04.2008-31.12.2010) financed by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

S. Mezei (✉) · L. Kovačev · J. Atlagić · N. Nagl
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: snezana.mezei@ifvcns.na.ac.rs

70% potomstva iz ukrštanja triploida sa triploidima ili diploidima sadrži 18 ili 19 hromozoma, a većina klijalog semena je dobijena sa biljaka sa 18, 19, 20, 26 i 27 hromozoma (Skaracis 2005). Srbija je vrlo pogodno agroekološko područje za semensku proizvodnju šećerne repe. Pojava osipanja semena u proizvodnji triploidnih hibrida ili sa biljke koja je triploidna proraslica, dovela bi do kontaminacije zemljišta i ono u narednih desetak godina ne bi bilo pogodno za proizvodnju semenskog useva. Seme triploida zadržava klijavost i sukcesivno niče tokom dužeg vremenskog perioda, te se ova činjenica ne sme zanemariti. Ako bi se na ovim površinama posejala semenska šećerna repa došlo bi do nekontrolisane oplodnje i narušavanja genetičke konstitucije hibridne sorte.

Obzirom da su abnormalnosti u mejotskom ciklusu uzrok parcijalne sterilnosti, cilj rada je bio da se utvrde nepravilnosti u mejozi triploida. Takođe, bolje poznavanje karakteristika mejoze triploida imaće značaj u daljem radu na oplemenjivanju šećerne repe.

Materijal i metod

Seme triploida šećerne repe (sorte Delta) posejano je u kadice u staklaru. Biljke su gajene u stakleniku u uslovima dugog dana, do faze desetak razvijenih listova. Jarovizacija sadnog materijala je obavljena u hladnoj komori na +4°C. Fototermaalna indukcija je trajala četiri meseca, a zatim

su biljke u rano proleće rasadene u polje. Sađeno je po pet biljaka u 10 redova na jednu parcelu, u izolaciju postignutu usevom konoplje.

Za citogenetske analize su uzete antere iz mladih cvetnih pupoljaka (vrhovi cvasti u dužini od oko 5 mm). Sa svake biljke skinuto je po 10 uzoraka i fiksirano 24 sata u smeši Carnoy I (3:1). Ukupno je analizirano pet stotina uzoraka. Do početka citogenetskih analiza uzorci su čuvani u 70% alkoholu, a predtretman je urađen sa 4% gvožđe amonijum sulfatom. Pravljeni su privremeni preparati, a bojenje je vršeno acetokarminom po metodi Snow (1963). Analizirano je 2124 mejocite na više stotina preparata. Analize su urađene na Laboval 4, Carl Zeiss Jena mikroskopu, uz korišćenje imerzionog objektiva HI 100/1,25.

Dobijeni rezultati su predstavljeni tabelarno kao procenat pojave nepravilnosti za analizirane faze mejoze, a najčešće zabeležene nepravilnosti u mejozi su prikazane mikrosnimcima koji su napravljeni na mikroskopu Amplival 30-G048c Carl Zeiss Jena, uz korišćenje video kamere Sony DXC151AP.

Rezultati i diskusija

Triploidne hibridne sorte šećerne repe po svojim kvantitativnim svojstvima prevazilaze roditeljske komponente od kojih su nastale. Razlog ovog povećanja se ne zna, iako je poznato da se kod triploida ispoljavaju dva efekta, poliploidija i heterozis.

Tabela 1. Analiza mejoze triploidne hibridne sorte šećerne repe Delta
Table 1. Meiosis of triploid hybrid sugar beet variety Delta

Faza Phase	Karakteristike deobe / Characteristics of cell division							
	Pravilna / Regular		Ubrzani (izbegli) hromozomi Fast chromosomes		Nepravilna / Irregular Usporeni (izostali) hromozomi Lagging chromosomes		Hromozomski most Chromosome bridge	
	Broj mejocita No.	% mejocita %	Broj mejocita No.	% mejocita %	Broj mejocita No.	% mejocita %	Broj mejocita No.	% mejocita %
	meiocytes	meiocytes	meiocytes	meiocytes	meiocytes	meiocytes	meiocytes	meiocytes
Meta I	291	78,44	80	21,56				
Ana I	593	84,96			79	11,32	26	3,72
Telo I	422	100						
Meta II	170	75,89	54	24,11				
Ana II	276	79,31			53	15,23	19	5,46
Telo II	61	100						
Ukupno Total	1813		134		132		45	
					311			
					2124			

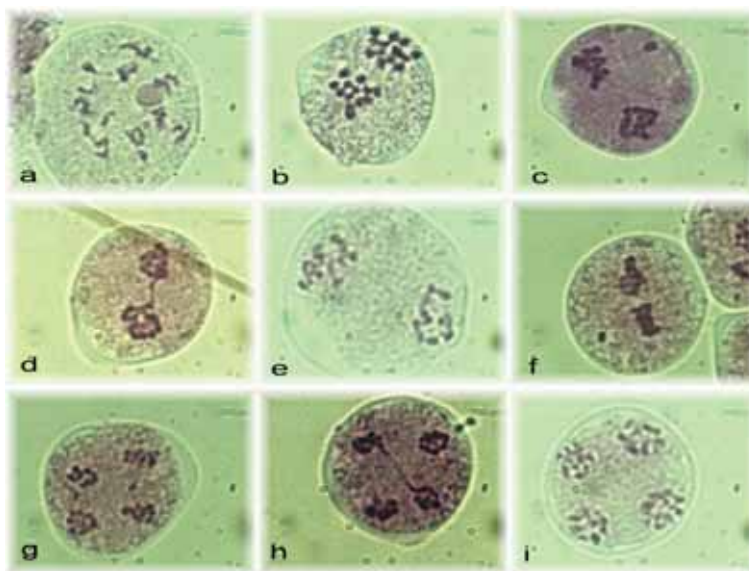
Poznato je da je mejoza triploidnih hibrida nepravilna i da nastaju gamete sa različitim brojem hromozoma. Iz tih razloga kod triploidne hibridne sorte Delta analizirana je mejoza po fazama. U rezultatima je naveden broj pregledanih mejozita i procenat pravilnosti ili odstupanja od normalne redukcionne deobe. Citogenetskom analizom mejozskog ciklusa analizirane su pojave dislociranih hromozoma i hromozomskih mostova u prvoj i drugoj fazi mejoze. Rane faze mejoze nisu analizirane (Sl. 1a). Pahiten i diploten u Profazi I nisu pogodni za analizu hromozomske konfiguracije kod šećerne repe, jer su hromozomi isprepleteni u vidu dugih tankih niti (Yu 1977, Tsuchiya & Nakamura 1979).

Od 2124 analizirane mejozite u 85,36% ćelija redukcionna deoba je proticala normalno. Faze mejoze su bile nepravilne kod 14,64% analiziranih ćelija (Tab. 1). Najčešće su uočene ćelije u Metafazi I, Anafazi I, kao i ćelije u Metafazi II i Anafazi II. Takođe je detektovana asinhrona deoba hromozoma u drugoj redukcionnoj deobi, a što se javlja i kod analize tetraploidnih populacija šećerne repe (Mezei et al. 2005).

Od ukupno 291 analizirane ćelije u Metafazi I, 78,88% ćelija nije imalo nepravilnosti u deobi.

Kod 21,56% mejozita nađeni su ubrzani (izbegli) hromozomi. Najčešće su izbegla jedan ili dva hromozoma. U Anafazi I analizirano je 593 ćelije od kojih je 84,96% imalo pravilnu deobu (Sl. 1b), dok je 11,32% mejozita bilo sa usporenim (izostalim) hromozomima (Sl. 1c). Hromozomski mostovi su zapaženi kod 3,72% analiziranih ćelija (Sl. 1d). Pregledom mejozita u Telofazi I ustanovljeno je da je mejozička deoba kod 422 analizirane mejozite proticala bez nepravilnosti (Sl. 1e) (Tab. 1).

U Metafazi II od analiziranih 170 mejozita 75,89% je imalo pravilan mejozski ciklus, dok je 24,11% mejozita bilo sa ubrzanim (izbeglim) hromozomima (Sl. 1f). Analizom 276 mejozita u Anafazi II 79,31% ćelija je prolazilo kroz pravilnu deobu, 15,23% ćelija je bilo sa usporenim (izostalim) hromozomima (Sl. 1g), a 5,46% sa hromozomskim mostom (Sl. 1h) (Tab. 1). U ovoj fazi se uočavaju formacije „v“ tipa rasporeda hromozoma, kao rezultat zadržavanja mostova iz Anafaze I. Pojava hromozomskih mostova ukazuje na postojanje hromozomskih aberacija tipa paracentričnih inverzija, koje je takođe detektovao Yu (1978) u Profazi I mejoze. U Telofazi I kao i u Telofazi II (Sl. 1i) nisu ustanovljene nepravilnosti u deobi.



Slika 1. Faze mejoze triploidnog hibrida šećerne repe

a) Dijakineza, b) Anafaza I pravilna, c) Anafaza I sa usporenim (izostalim) hromozomom, d) Anafaza I sa hromozomskim mostom, e) Telofaza I pravilna, f) Metafaza II sa ubrzanim (izbeglim) hromozomom, g) Anafaza II sa usporenim (izostalim) hromozomima, h) Anafaza II sa hromozomskim mostom, i) Telofaza II pravilna.

Fig. 1. Phases of meiosis of triploid hybrid sugar beet

a) Diakinesis, b) Anaphase I normal, c) Anaphase I with lagging chromosome, d) Anaphase I with chromosome bridge, e) Telophase I normal, f) Metaphase II with fast chromosome, g) Anaphase II with lagging chromosomes, h) Anaphase II with chromosome bridge, i) Telophase II normal

Zaključci

Kod triploidne hibridne sorte šećerne repe Delta analizirane su mejoците u različitim fazama redukcione deobe primenom acetokarmin metode. U 85,36% mejoćita mejoza je proticala normalno.

Od nepravilnosti koje su se pojavljivale u 14,64% analiziranih mejoćita najveći procenat se odnosio na pojavu neuključenih hromozoma, izbeglih (ubrzanih) u Metafazi I i Metafazi II, zatim izostalih (usporenih) u Anafazi I i Anafazi II, kao i pojava hromozomskih mostova u Anafazi I i Anafazi II.

Zbog pojave navedenih nepravilnosti u mejozi očekuje se veliki procenat gameta sa različitim brojem hromozoma, pojava aneuploida i delimične odnosno potpune sterilnosti. Ova saznanja su veoma važna u semenskoj proizvodnji šećerne repe jer mogu da budu izvor potencijalnih problema.

Literatura

- Bosemark N O (1977): Use of tetraploid monogerm male steriles in triploid hybrid seed production. *Proceeding Inst. Sugar Beet Res.* 271-287
- Hecker R J, Ruppel E G (1976): Polyploid and maternal effects on Rhizoctonia root rot resistance in sugarbeet. *Euphytica* 25: 419-423
- Hecker R J, Staford R E, Helmerich R H, Maag G W (1969): Comparison of the same sugar beets F_1 hybrids as diploids, triploids and tetraploids. *J. Amer. Soc. Sugar Beet Tech.* 16: 106-116
- Kovačev L, Čačić N, Mezei S, Nađl N (2005): Značaj genetike, oplemenjivanja i genetičkog inženjeringa u povećanju potencijala rodosti kod šećerne repe i produktivnost NS hibridnih sorti. *Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad* 41: 35-50
- Kovačev L, Čačić N, Stančić I, Mezei S (2008): Sugar beet breeding in Serbia. *International Conference «Conventional and Molecular Breeding of Field and Vegetable Crops»*, November 24-27, Novi Sad, Serbia, 513-517
- McFarlane J S, Skoyen I O, Lewellen R T (1972): Performance of sugar beet hybrids as diploids and triploids. *Crop Sci.* 12: 118-129
- Mezei S, Atlađić J, Kovačev L (2005): Pollen viability and meiosis in tetraploid populations of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Genet. Breed.* 59: 157-164
- Nakamura C, Skaracis N G, Romagosa I (1992): Cytogenetics and breeding in sugar beet. In: *Chromosome engineering in plants: Genetics, Breeding, Evolution.* Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 295-314
- Skaracis N G, Smith G A (1987): Ploidy level effect on resistance to cercospora leaf spot in sugar beet. *Proc. 24th Meet. ASSBT*, 24-26
- Skaracis N G (2005): Cytology and cytogenetics 19-52. In: *Bi-ancardi E, Campbell L G, Skaracis N G, De Biaggi M (eds.), Genetics and breeding of sugar beet*, Science Publishers Inc., Enfield, NH, USA, 367
- Smith G A, Hecker R J, Martin S S (1979): Effect of ploidy level on the components of sucrose yield and quality in sugarbeet. *Crop Sci.* 19: 319-323
- Snow R (1963): Alcoholic hydrochloric acid-carmin as stain for chromosomes in squash preparations. *Stain Technol.* 38: 9-13
- Tsuchiya T, Nakamura C (1979): Acetocarmine squash method for observing sugar beet chromosomes. *Euphytica* 28: 149-156
- Yu M H (1977): Preliminary study of pachytene morphology in a homologous line of sugar beet. *Crop Sci.* 17: 833-836
- Yu M H (1978): Meiotic behavior of a disomic nematode resistant sugarbeet. *Crop Sci.* 18: 615-618

Meiose Analyses of Sugar Beet Triploids

Snežana Mezei · Lazar Kovačev · Jovanka Atlađić · Nevena Nađl

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: During the seed crop growing there can be also problems with uncontrolled pollination if in the previous years there was seed shedding during the harvest, which can cause growth and flowering of diploid, triploid and tetraploid plants and that can present serious problem for the next sugar beet seed crop. Meiosis of triploid hybrids is irregular and can result in development of gametes with different chromosome number. Sugar beet triploids in metaphase I have 9 univalents and 9 bivalents and therefore can be source of aneuploid gametes. After cytological analysis that was performed on 2124 meiotic cells, in 14.64% different types of irregularities were detected, such as dislocated chromosomes and chromosome bridges.

Key words: chromosome, meiosis, seed, sugar beet, triploid