

Получение максимального массива информации – одно из важнейших методологических заданий эксперимента. Обнаружена необходимость установления и анализа не только аддитивной, но и мультипликативной, части дисперсии экспериментальной системы. В частности за счет учета полного спектра фенотипической изменчивости на векторно-градиентном поле онтогенетического развития компонентных и комплексных макропризнаков значительно повысилась точность идентификации генотипов и соответственно эффективность отбора. За счет внедрения в селекционную практику системы нелинейно синергетического принципа отбора создан ряд сортов люпина узколистного, гороха полевого, ржи озимой разных направлений хозяйственного использования адаптированных к условиям Полесья.

Ключевые слова: аддитивная, мультипликативная дисперсия, отбор, синергетика макропризнаков, сорта

Annotation

Chernusskiy V.

Methodological going near creation of the system automated complexes of collection and analysis of data in the process of selection in connection with the selection of agricultural cultures

Obtaining the maximum data array is one of the most important methodological objectives in an experiment. Found was a need to establish and analyze not only additive, but multiplicative variation in an experimental system. In particular, having recorded the full range of phenotypic variance in the gradient vector field of ontogenetic development component and integrated macrosign, we significantly increase the accuracy of genotype identification and therefore the efficiency of selection. Owing to the nonlinear synergetic selection principle introduced into breeding practice, created were crops cultivars adapted to the local environment, such as blue lupine, field pea, and winter rye.

Keywords: additive, multiplicative variance, selection, macrosign synergy, cultivars

Отримано редакцією – 23.05.2014 р.

УДК:633/635.63.52

ЯЦЕВА О.А., науковий співробітник

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

e-mail: olesyadim@mail.ru

МЕТОДИ ІНДУКЦІЇ АПОЗИГОТІЇ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ В УМОВАХ СЕЛЕКЦІЙНО-ТЕПЛИЧНОГО КОМПЛЕКСУ

Розглядаються методи індукції апозиготичного розмноження у пилкостерильних ліній цукрових буряків у селекційно-тепличному комплексі. Визначено методичні підходи для отримання стерильних та роздільноквіткових ліній з апозиготичним зав'язуванням насіння. Встановлено необхідність поєднання стресових факторів (безпилковий режим і контрастність температур під час цвітіння) для індукції цього явища. Визначено способи ідентифікації апозиготії.

Ключові слова: безпилковий режим, апозиготія, контрастні температури, міксоплоїдія, цукрові буряки

Вступ. В еволюційному аспекті у багатьох рослин безстатеве розмноження, яке виникає за певних умов, є формою збереження виду. Це явище відоме під назвою «апоміксис» від грецького *apo* – без, *mixis* – змішування, привертає особливу увагу генетиків і біологів, які досліджують різні форми мікроеволюції в природі. У літературі терміни «апоміксис», «агамоспермія» та «апозиготія» синонімічні, вони використовуються для

позначення безпилкового (однобатьківського) способу отримання насіння. Апоміксис – спосіб насінневого розмноження без запліднення, де зародок розвивається з клітин гаметофіту за різноманітних порушень статевого процесу. Це явище досить розповсюджене в природі і має велике значення для розвитку еволюції [6, 11].

Однією із важливих проблем в селекції польових культур є створення нових сортів і гібридів, які характеризуються корисними господарськими ознаками і цінними біологічними властивостями. Пріоритетним напрямом при цьому залишається скорочення термінів їх створення. На сучасному етапі розвиток селекції неможливий без використання нових методів і технологічних процесів, що дозволяють прискорено створювати різноманітні генотипи, які можна залучати як вихідний матеріал з новими ознаками [1]. Безпилковий метод репродукції передбачає зміни в статевому способі репродукції насіння, відкриваючи нові можливості в селекційному процесі цукрових буряків як на галоїдному, так і на дигаплоїдному рівнях. Даний метод репродукції насіння спрямований на розширення генофонду пилкостерильних ліній, спрощення та здешевлення селекційної програми отримання гібридів [7]. Тому актуальним для створення нового вихідного матеріалу є використання методу апозиготичної репродукції насіння.

Метою дослідження було визначити комплекс чинників, що спонукають індукцію апозиготії у пилкостерильних ліній цукрових буряків

Матеріали і методика досліджень. Дослідження проводили на Ялтушківській дослідно-селекційній станції ІБКіЦБ НААН в умовах селекційно-тепличного комплексу впродовж 2009-2012 рр. Як вихідний матеріал використовували 150 різних за походженням диплоїдних ліній цукрових буряків з ЦЧС. Це були самозапильні лінії глибокого інцухту, що підтримувалися в ізоляції, і прості стерильні гібриди, які запилювалися із некомплементарними лініями О-типу.

Для прискорення селекційного процесу селекційні матеріали вирощували у селекційно-тепличному комплексі за циклом «від насінини до насінини» [6].

У підготовлений ґрунт у серпні місяці висівали насіння цукрових буряків, складаючи план посіву за зразком, наведеним у табл. 1. Основним субстратом для вирощування рослин цукрових буряків у теплиці є ґрунт. Ґрунт заздалегідь готується на спеціально відведеній для цього ділянці і зберігається в буртах. Для засипки ділянок слід дотримуватися таких пропорцій: 40% ґрунту, 30% перегною, 20% гною, і 10% піску. Також перед засипкою ділянок потрібно внести мінеральні добрива (з розрахунку на 100 кг ґрунту): KNO_3 (34%) – 40-50 г., суперфосфату (19 %) – 100-110 г, калійної солі (40%) – 30-40 г.

Таблиця 1

План посіву селекційних матеріалів у теплиці

№п/п	Селекційний номер	Номер рослини	Посіяно рядків
1	11-136ЧС	1	10
		2	20
2	11-133ЧС	1	30
		2	10

Після посіву насіння проводиться полив до вологості ґрунту 60-70% від повної вологоємності. У тепличних комплексах передбачено полив рослин напівавтоматичною дощувальною установкою.

У зв'язку із невеликим об'ємом ґрунту за довготривалого вирощування рослини цукрових буряків мають потребу в елементах мінерального живлення. Для цього необхідно передбачити періодичне підживлення, потребу проведення якого встановлюють за інтенсивністю росту і стану розвитку листкового апарату [2].

Для забезпечення повного циклу розвитку «від насінини до насінини» посів у теплиці проводили в серпні місяці, для того щоб отримати повноцінні рослини до початку холодів. Враховуючи невелику кількість апозиготичного насіння, сівбу проводять вручну, розкладаючи насінини через 5 см у рядку. Проводять також обліки за схожістю насіння в умовах закритого ґрунту за ДСТУ 2292-93 (ГОСТ 22617.2-94) [3].

Догляд за рослинами в теплиці складається із регулярного і своєчасного поливу, рихлення поверхні ґрунту, видалення сухих листків, а також бур'янів, попередження появи шкідників і хвороб. Насінники повинні бути своєчасно підв'язані [5].

Результати досліджень. Для індукції апозиготичного способу розмноження і його ідентифікації нами одночасно було застосовано чотири методи:

Метод безпилкового режиму в умовах селекційно-тепличного комплексу. Визначення ступеню стерильності і однонасінності проводили у фазі добре розвинутих бутонів. Для виділення апозиготичних рослин потрібно використовувати метод безпилкового режиму. Щоб позначити покоління апозиготичної репродукції використовуються наступні символи. Літера «А» вказує на те, що насінневе потомство було отримано апозиготичним способом, а індекс вказує на номер покоління [12]. При вирощуванні апозиготичних потомств використовували метод індивідуального добору.

Метод безпилкового режиму включає вирощування рослин цукрових буряків з фенотипом ЧС-0 в ізольованих ґрунтових боксах селекційно-тепличного комплексу. У травні наступного року до розкриття квіток у кожній рослині визначають її фенотип за ознаками пилку. На репродукцію залишають рослини з повністю стерильним пилком – фенотип ЧС-0. Ідентифікацію рослин за фенотипами проводять впродовж усього періоду цвітіння. Рослини з мозаїчним фенотипом і мінливістю ознак стерильності, які мають напівфертильний пилкок на бокових пагонах, видаляють класифікуючи як фертильні. Класифікацію рослин проводять за Оуеном [4].

Метод контрастних температур під час цвітіння. Другим стресовим фактором, що спонукає до апозиготії, є температурний режим, який добре регулюється в умовах селекційно-тепличного комплексу. Оскільки адаптивні можливості цукрових буряків як культури досить високі, тобто рослини добре переносять як підвищенні, так і пониженні температури під час цвітіння, за стресовий фактор ми використовували їх контрастність (різницю між денною та нічною температурою) [9].

Температура в середньому піднімається від 38 °С до 51 °С у денні години і знижується від 20°С до 24°С у нічні (рис. 1). За нашими даними, контрастність температур в умовах безпилкового режиму індукує розвиток апозиготичних зародків.

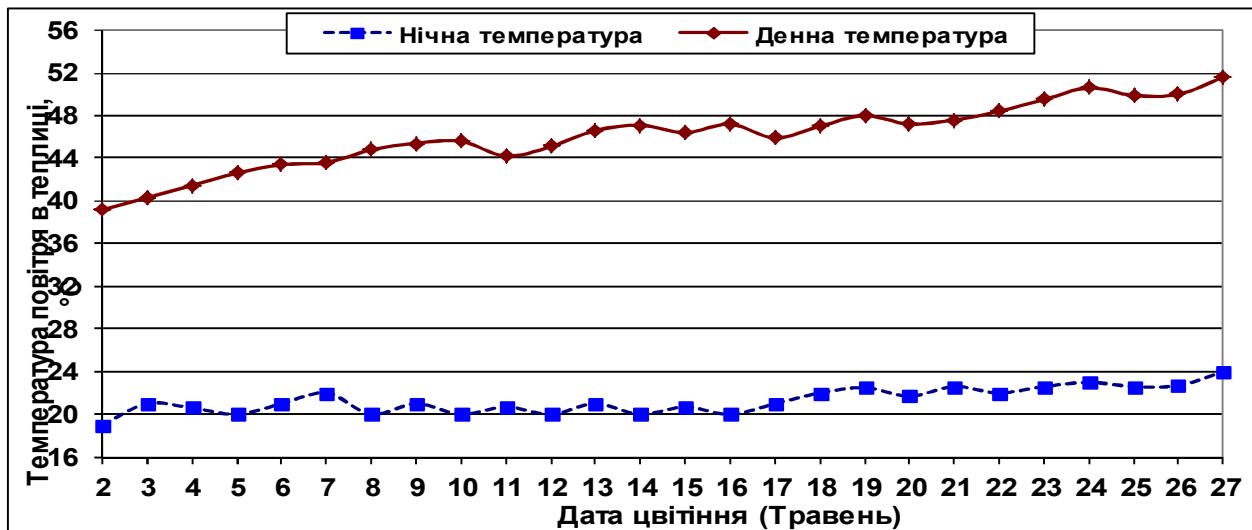


Рис. 1 Температурний режим у селекційно-тепличному комплексі

На повторну репродукцію залишали потомства, що зав'язали насіння більше 5 г. Із 150 ЧС - ліній після чотирьох репродукцій у 62 зразків спостерігали зав'язування насіння (рис. 2).

Ембріологічний метод застосовували для підтвердження апозиготії та визначення її типу. Для цього проводили відмітку цвітіння на селекційних матеріалах стерильних ліній, отриманих методом безпилкового режиму під час цвітіння та використовувати прискорений метод визначення ембріонального розвитку зародків у цукрових буряків Ширяєвої Е.І. [10].

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

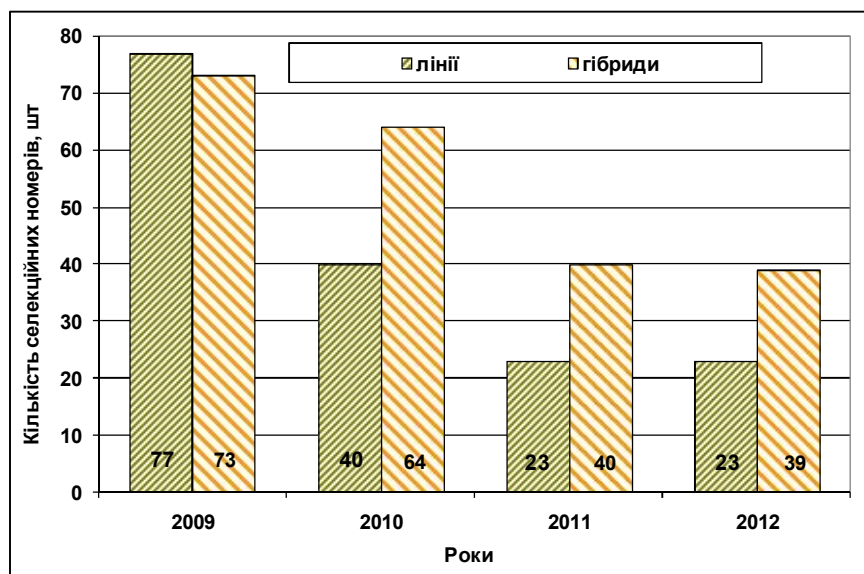


Рис. 2. Селекційні номери, що були задіяні у селекційному процесі 2009-2012 рр.

На апозиготичний спосіб розмноження вказують відставання в розвитку зародків, а також порушення розвитку жіночого гаметофіту (рис. 3, 4, 5, 6)

На рис. 3, як приклад, зафіксовано явище поліембріонії, а на рис. 4 розвиток зародку на стадії «шар»

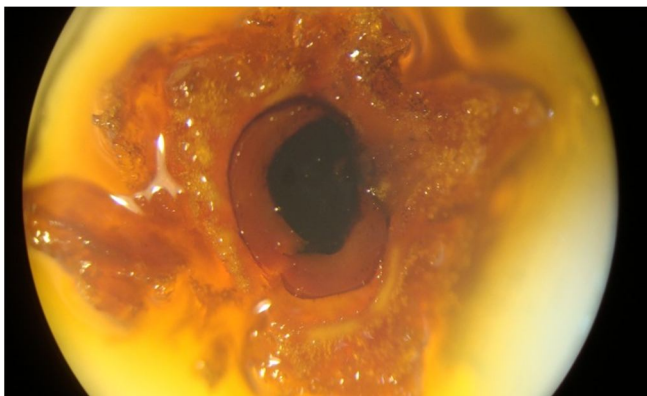


Рис. 3. Розвиток двох зародків одночасно (поліембріонія) на 28 день після фіксації

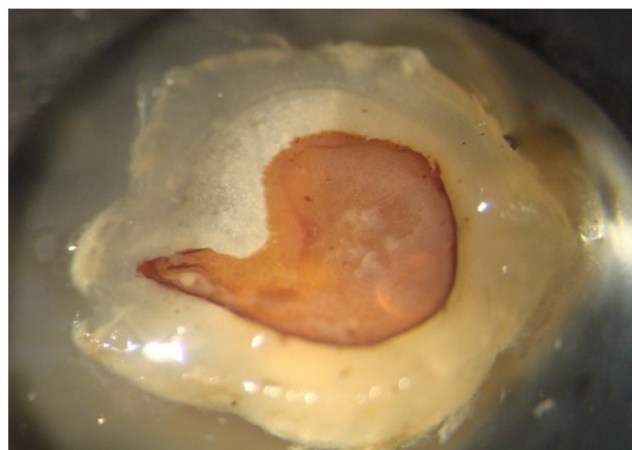


Рис. 4. Розвиток зародка на стадії «шар»

Розвиток зародку з клітин нуцелусу та тканин інтегументів наведено на рис. 5, 6.

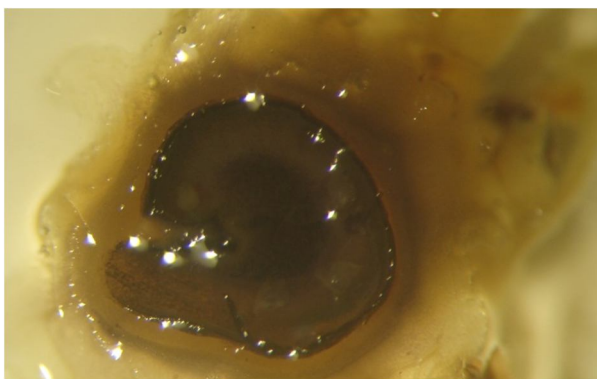


Рис. 5. Розвиток апозиготичного зародка, що сформувався з клітин нуцелусу

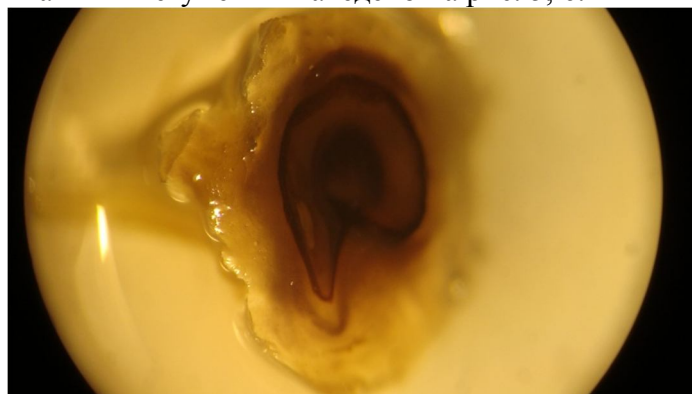


Рис. 6. Розвиток апозиготичного зародка з тканин інтегументу

Метод визначення міксоплоїдії клітинних популяцій у цукрових буряків з апозиготією. Поряд із безпилковим і температурним режимом фактором ідентифікації апозиготії у цукрових буряків є також міксоплоїдія клітинних популяцій.

Аналіз плоідності з використанням цитологічних методів включає фіксацію, скорочення хромосом, забарвлення, а позитивний результат залежить як від якості препарату, так і від того, чи вдалося відібрати певну стадію поділу клітинного циклу – метафазу. Часто хромосоми в метафазі лежать не в одній площині. Новий метод проточної цитометрії з використанням автоматичного аналізатора плоідності «Partec» спрощує дослідження. Для роботи беруть не клітини активного поділу – апікальні меристеми, а легкодоступні для аналізу клітинні популяції листків цукрових буряків.

Для визначення рівня плоідності нових апоміктичних матеріалів проводять етикетування селекційного матеріалу та відбирають молоді листки з черешками. На черешках обв'язують тонким шпагатом або ниткою смужки пергаментного паперу із зазначеним номером. За необхідності дослідні зразки перевозять в пакетах із зволоженого фільтрувального паперу. Для приготування суспензії ядер використовують живу тканину верхньої і середньої частини листка (1-2 см²), яку подрібнюють лезом (уникаючи роздавлення) в чашках Петрі з додаванням 0,5 мл буфера «Ф» (ІБКіЦБ). Після подрібнення листків в чашку Петрі додають 0,5 мл розчину флуорохрому ДАПІ (Partec, Німеччина) та 1 мл буферного розчину «Ф» (ІБКіЦБ). Витримують суміш упродовж 5-ти хвилин при кімнатній температурі у чашках Петрі і фільтрують через нейлоновий фільтр для очистки ядер від великих клітинних фрагментів та залишків листя. Вимір інтенсивності флуоресценції та числа ядер в 1 см³ розчину виконують на цитометрі «Partec» [7]. Пробірки з суспензією клітин підключають до електродів і за гістограмами визначають рівень плоідності. Отримані дані заносять у таблицю (табл. 2).

Таблиця 2

Плоідність рослин-апоміктів вирощених в теплиці

№ п/п	Селекційний номер	Номер рослини (куща)	Кількість проаналізованих рослин	2х	3х	4х	х; 2х; 4х;	2х; 4х;8х;
1	12-136ЧС	1	30	30				
		2	30	30				
2	12-138ЧС	3	30	20		5	2	3
		4	30	15	1	10	3	1

Примітка: *х; 2х; 4х; міксоплоїдна популяція, якій відповідає середнє значення інтенсивності флуоресценції на каналах; 50;100;200;

**2х; 4х; 8х; міксоплоїдна популяція, якій відповідає середнє значення інтенсивності флуоресценції на каналі; 100;200;400.

За нашими даними, після четвертого покоління стабілізується рівень плоідності. У подальшу селекційну практику залучають лінії з 90-100% поєднанням ознак стерильності, роздільноквітковості і диплоїдного рівня геному.

Висновки. Отже, дослідженнями встановлено, що для індукції апозиготії у ЧС-ліній цукрових буряків необхідно створити поєднання стресових факторів: безпилковий і відповідний температурний режим під час цвітіння насінників. Ідентифікацію рослин А₁ з апозиготичними способом розмноження, необхідно здійснювати на основі аналізу клітинних популяцій на плоідність цитофотометричним методом із застосуванням АП «Partec» та обов'язковим ембріологічним контролем.

Список використаних літературних джерел

1. Богомолів М.А. Особенности использования апомиксиса у сахарной свеклы при создании нового исходного материала / М.А. Богомолів // Сахарная свекла. – 2008. – № 5. – С. 18-20.

2. Методика исследований по сахарной свекле / [Л.А. Барштейн, Н.Г. Гизбулин та ін.]. – К.: ВНИС, 1986. – 292 с.
3. Насіння цукрових буряків. Методи визначення схожості, одноростковості та доброякісності: ДСТУ 2292-93 (ГОСТ 22617.2-94). – [Чинний від 1996-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 1995. – 8 с. – (Національний стандарт України).
4. Owen F.V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet / F.V. Owen // *Agric. Res.* – 1945. – V. 71 (10). – P. 423-440.
5. Роик Н.В. Создание одноростковых сортов и гибридов сахарной свеклы / Н.В. Роик // *Энциклопедия рода Beta. Биология, генетика и селекция* / Под. ред. С. Малецкого. – Новосибирск: Сова, 2010. – С. 248-265.
6. Роїк М.В. Апоміксис у цукрових буряків / М.В. Роїк, Н.С. Ковальчук, О.А. Яцева // *Вісник аграрної науки.* – 2010. – № 8. – С. 37-39.
7. Окраска корнеплодов в апозиготических потомствах сахарной свёклы (*Beta vulgaris* L.) / [Н.В. Роик, Н.С. Ковальчук, О.А. Яцева, С.И. Малецкий] // *Сахарная свекла.* – 2012. – № 10. – С. 85-93.
8. Аналіз мінливості рівня плоідності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технології аналізатора плоідності Partec: методичні рекомендації / М.В. Роїк, Н.С. Ковальчук, Л.В. Алексійчук. – Київ, 2006. – 39 с.
9. Череднічок О.І. Підвищення адаптаційного потенціалу вихідних селекційних матеріалів: автореф. канд. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція і насінництво» / О.І. Череднічок. – К.: Наукова думка, 2011. – 17 с.
10. Ширяева Э.И. Цитоэмбриологические исследования в селекции сахарной свеклы: методические указания / Э.И. Ширяева. – К.: ВНИС, 1983. – 34 с.
11. Ярмолук Г.И. Апомиксис у сахарной свеклы / Г.И. Ярмолук, С.П. Белгородская, И.Я. Балков // *Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований: тр. междунар. симпозиума.* – Саратов, 1994. – С. 166-168.
12. Изменчивость завязываемости плодов при апозиготическом способе репродукции у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) / [С.С. Юданова, С.И. Малецкий, С.И. Позняк, Е.И. Малецкая] // *Генетика.* – 2011. – Т. 47. – С. 147-156.

Аннотация

Яцева О.А.

Методы индукции апозиготии сахарной свеклы в условиях селекционно-тепличного комплекса

Рассматриваются методы индукции апозиготического размножения в пыльцестерильных линиях сахарной свеклы в селекционно-тепличном комплексе. Определены методические подходы для получения стерильных и отдельноцветковых линий с апозиготическим завязыванием семян. Установлена необходимость сочетания стрессовых факторов (безпыльцевой режим и контрастность температур во время цветения) для индукции этого явления. Определены способы идентификации апозиготии.

Ключевые слова: *безпыльцевой режим, апозиготия, контрастные температуры, миксоплоидия, сахарная свекла*

Annotation

Yatseva O.

Methods for apozygosis induction in sugar beet in environment of breeding and greenhouse complex

The article surveys methods for induction of apozygosis in pollensterile sugar beet breeding lines at breeding and greenhouse complex. Shown is a methodology approach to obtain sterile and dialyflower lines with apozygosis seed formation. The necessity of a stressors (pollenless mode and contrast of temperatures during flowering) to induce this phenomenon is established. Determined are methods for apozygosis identification.

Keywords: *pollenless mode, apozygosis, contrasting temperature, microploidy, sugar beet*

Отримано редакцією – 13.05.2014 р.