

Н.С. КОВАЛЬЧУК, В.І. ВЛАСЮК, К.О. ВАРЕНИК,
Л.М. СМІРНИХ, В.М. СИНЕЛЬНИК
Інститут цукрових буряків УААН

**МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ТЕТРАПЛОЇДНИХ БАГАТОНАСІННИХ
ЗАПИЛЮВАЧІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ В ПРИРОДНО-КЛІМАТИЧНИХ
УМОВАХ ВЕСЕЛОПОДІЛЬСЬКОЇ ДОСЛІДНО-СЕЛЕКЦІЙНОЇ СТАНЦІЇ**

Створені нові тетраплоїдні багатонасінні запилювачі 7009 та 7010 на основі високоцукристих селекційних матеріалів цукрових буряків Веселоподільської дослідно-селекційної станції ІЦБ (ВПДСС). Впроваджені методи диференціації та добору генотипів 4x, за кількістю ядерної ДНК в клітині. На модельному експерименті досліджено ефективність нового способу формування синтетичних тетраплоїдних популяцій на цитогенетичній основі. Схожість насіння та *продуктивність насінників тетраплоїдної форми аналізуються залежно від способів добору та рівнів генерації насіння після індукції колхіцином.*

Вступ. Ринок цукру ставить сьогодні завдання конкурентоздатності культури цукрових буряків. Лише значне підвищення врожайності без збільшення економічних затрат може позитивно вирішити це питання. Якраз використання генетичного потенціалу вітчизняних тетраплоїдних багатонасінних цукрових буряків, стійких до екстремальних екологічних факторів, як компонентів схрещування триплоїдних високогетерозисних гібридів на ЧС основі є перспективним напрямом, що може привести до задовільного вирішення цієї проблеми.

Поліплоїдія, явище кратного збільшення числа хромосом, відкриває широкі можливості для проявлення ефекту дози генів. Серед кращих високопродуктивних гібридів і сортів є сьогодні поліплоїдні - у цукрових і кормових буряків [1,2], конюшини [3], жита [4] і багатьох інших сільськогосподарських рослин.

Незважаючи на те, що дією колхіцину при занурюванні в його розчин насіння [5], накапуванні на зони апікальних меристем [6], введенні в склад живильних середовищ в умовах *in vitro* [7] ми отримуємо тетраплоїдні форми, для використання їх в селекційному процесі необхідний тривалий строк стабілізації плоїдності гамет, а зрештою, якості насіння триплоїдних гібридів [8, 9].

Визначені цитогенетичні фактори, які значною мірою впливають на ці показники: полісомний характер кон'югації хромосом, утворення гамет з незбалансованим числом хромосом, участь цих гамет в заплідненні і

формування значного відсотку в структурі поліплоїдних популяцій анеуплоїдів. Анеуплоїди і сьогодні значно впливають на ефективність використання триплоїдних гібридів порівняно з диплоїдними через низьку схожість і насінневу продуктивність [10]. Слід визнати, що фактори природного добору спричиняють певну мінливість геному і викликають адаптацію, а зрештою, виживання в екстремальних умовах найбільш пристосованих генотипів. Тривала селекція під впливом специфічних екстремальних екологічних факторів високої температури та низької зволоженості формує у тетраплоїдній популяції відповідні фізіологічні особливості, а також впливає на формування стабілізованих за кількістю хромосом рослин цукрових буряків.

Дані дослідження виконані з метою збагачення генофонду вітчизняних тетраплоїдних запилювачів новим конкурентоздатним селекційним матеріалом, адаптованим до високих температур зони східного Лісостепу України, а також з метою вдосконалення існуючих способів добору для стабілізації рівня геному. Відповідно мети були поставлені наступні завдання:

- дослідити частоту анеуплоїдних і тетраплоїдних форм у різних генераціях насіння при постійній браковці анеуплоїдів, міксоплоїдів, триплоїдів і низькофертильних тетраплоїдів IIa і IIb типів;

- впровадити в селекційний процес новий метод класифікації та добору тетраплоїдів за кількістю ядерної ДНК в клітині для заміни працездатних методик цитологічного аналізу;

- на модельному експерименті вивчити ефективність нового способу стабілізації тетраплоїдних форм за результатами цитогенетичного аналізу мейозу.

Матеріал і методика досліджень. Вихідним матеріалом для індукції тетраплоїдів використані диплоїдні високоцукристі лінії багатонасінних цукрових буряків ВПДСС, стійкі до корневих гнилей, за селекційними номерами 7009, 7010, 7233, 7209, 7210.

Насіння було висіяне в теплиці у квітні 1996 р. Колхіцинувано проводили 10 днів капельним методом по 250-500 зразків кожного селекційного номера. Для експерименту були забезпечені умови високої вологості і підвищеної температури протягом 10 днів. Концентрація колхіцину змінювали від 1 % до 0.2 %. У червні рослини були висаджені \ відкритий ґрунт. Для того, щоб не травмувати клітини із зони апікальної меристеми, індукований матеріал, вкорінений в ґрунті, відбирали з морфологічними ознаками:

- асиметричність листкових пластинок;
- потовщені черешки і листкові пластинки;
- гофроване листя.

У 1997 р. були сформовані вихідні тетраплоїдні популяції (C_0) умовах просторової ізоляції. Аналізували з використанням мікроскоп стадію метафази мітозів молодих листочків в фазі стрілкування насінників. Для скорочення хромосом використовували розчин 8-ортооксихінолін;

забарвлюючи 3%-вим ацетоорсеїном. Цитологічний аналіз проводили на тимчасових препаратах з використанням мікроскопів NF фірми "Carl Zeiss" при збільшенні 40x10; 90x10. В процесі аналізу бракували міксоплоїди, диплоїди та анеуплоїди. Для аналізу пилкоутворюючої здатності використовували класифікацію тетраплоїдів цукрових буряків за розмірами і фертильністю пилкових зерен [1].

З 1999 р. на ВПДСС впроваджується новий метод ідентифікації рівня геному за кількістю ядерної ДНК в рослинних клітинах [12] з використанням аналізатора плоїдності (АП) "Partec". АП "Partec" - це проточний цитометр, що вдосконалений комп'ютерними програмами. За 2-3 хвилини рівень геному визначається як результат аналізу декількох тисяч ядер на один зразок. Впровадженням нового методу вирішується одна із проблем поліплоїдної селекції - працездатність а також тривалість хромосомного аналізу при випадковості мітотичного поділу клітини та довільному розміщенню хромосом в цитоплазмі. Аналізували селекційний матеріал в секторі цитології Інституту цукрових буряків УААН на листочках насінників, взятих до фази цвітіння, та на буряках першого року вегетації.

В процесі експериментальних досліджень визначений найбільш дійовий об'єкт для отримання оптимальних гістограм з низьким коефіцієнтом варіації (CV). Ним виявились листки насінників у фазі стрілкування та бутонізації, молоді листки буряків першого року вегетації протягом вегетаційного періоду, мікроклони, розмножені в умовах культури *in vitro*.

Цим способом проводився добір тетраплоїдів на буряках першого року вегетації, вибірка міксоплоїдів, диплоїдів, анеуплоїдів та формування клумб насінників 4x в умовах просторової ізоляції. Мінливість якісних показників насіння вивчали за методикою аналізу їх схожості та абсолютної маси, затвердженою Державною інспекцією. Експериментальний матеріал багатонасінних запилювачів 7010, 7009 для екологічного сортопробування у 2003-2004 рр. за програмою „Бетаінтеркрос" виділявся на буряках першого року вегетації методом індивідуального добору кореневого матеріалу за плоїдністю. На модельному експерименті за участю двох високофертильних клональних ліній № 1 і № 15 досліджувалась ефективність нового способу формування синтетичних тетраплоїдних популяцій на цитогенетичній основі за структурою хромосомних асоціацій в мейозі. Впродовж 1999-2001 рр. аналіз мейозу та статистичний аналіз результатів експериментальних досліджень проводили за раніше описаними методами [13, 14, 15].

Результати досліджень та їх обговорення. Цитологічний аналіз у 1997р. показав, що вихід тетраплоїдів серед відбраного на буряках першого року вегетації за морфологічними ознаками селекційного матеріалу становив від 23,5 до 34,5 % . Так, при колхіцинуванні 250-500селекційних зразків кожного з 6-ти селекційних номерів, тетраплоїдні популяції 7010 та 7009 нульової генерації включали після браковки міксоплоїдів і диплоїдів здебільшого 42-49 із 500 насінників як вихідний поліплоїдний матеріал для стабілізації за плоїдністю гамет та якістю насіння. Запилювачі 7233; 7208;

7210; 7209, де колхіцинували всього по 250 зразків, після першого добору за рівнем геному включали всього від 4 до 15 рослин тетраплоїдної форми, що явно недостатньо для майбутньої стабілізації. 134

Слід відмітити, що ряд дослідників з поліплоїдії буряків відмовились від добору тетраплоїдів з метою стабілізації якості пилкоутворюючої здатності, за кількістю класів більше двох [16]. Проте, диференціація та добір рослин 4x за класифікацією Зайковської Н.Е. та Ярмолюк Г.І. [11] в даному експерименті дозволили вибракувати з вихідних поліплоїдних популяцій (C₀) тетраплоїди I_{1a} типу зі значною кількістю мікроядер та мінливістю розміру пилкових зерен від 8 до 28 мкм як потенціальне джерело анеуплоїдії у потомстві (табл. 1).

Таблиця 1

Структура вихідних тетраплоїдних популяцій ВПДСС за якістю пилкоутворюючої здатності (1997р.).

Тетраплоїдна популяція	Проаналізовано тетраплоїдів, шт.				
	всього	з них за розмірами пилку, %			
		Ia	Iб	IIa	IIб
		26-32 мкм	14-38 мкм	8-28 мкм	9-38 мкм
7009, C ₀	41	29.3	17.1	53.6	0
7010, C ₀	45	11.1	20.0	68.9	0

За даними таблиці, частка тетраплоїдних насінників I_a типу у вихідній тетраплоїдній популяції становила відповідно 29,3 і 11,1 % залежно від генетичного походження селекційного матеріалу.

Відомо немало способів добору тетраплоїдів-родоначальників для прискорення тривалого (8-10 років) строку стабілізації плоїдності насіння, серед яких за якістю насінневої продуктивності насінників, розміром, фертильністю і стерильністю пилкових зерен, за результатом валентних схрещувань [9, 11, 16, 17]. Слід визнати складність і довготривалість вирішення цієї проблеми. Добір анеуплоїдів і їх браковка часто не приводить до позитивних результатів, так як анеуплоїдні фертильні гамети постійно формуються в мейозі [9, 11, 18]. Деякі вчені дійшли висновку, що поліплоїдні популяції зберігають рівномірне генетично детерміноване співвідношення анеуплоїдних і еуплоїдних гамет [18]. Фертильність пилку у анеуплоїдів також буває досить висока. Крім того за фертильністю і вирівняністю пилку у цукрових буряків тетраплоїдної форми аналізують до 30 % гамет з анеуплоїдним числом хромосом від 13 до 23 [9].

На даний час, коли біотехнологічні методи дозволяють нам зберігати генотип, а також синтезувати вихідний матеріал за бажаними генотипами [18, 19], добір за результатами аналізу мейозу у тетраплоїдів, їх збереження і мікророзмноження в умовах *in vitro* дозволяють сформувати тетраплоїдні популяції за цитогенетичними факторами. Так, серед високофертильних вирівняних за розміром пилкових зерен насінників 4x запилювача 7010 були

відібрані окремі біотики і введені в стерильну культуру. За результатом аналізу мейозу серед них виділені два селекційні номери № 1 і № 15 для побудови модельного експерименту з використанням високофертильних клональних ліній. Після депонування та вкорінення в умовах вегетаційних судів кореневий матеріал був переданий у 1999 р. відділу селекції ВПДСС для формування тетраплоїдної популяції 7010 (1:15). Аналізували вплив способів добору на структуру поліплоїдних популяцій за рівнем геному. Дані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив способів добору на структуру поліплоїдних популяцій цукрових буряків № 7010 за рівнем геному*

№ пп.	Походження насінневого матеріалу	Спосіб добору насінників	Кількість рослин, шт.	у т.ч. за плоідністю, %				
				2п	3п	4п	анеуплоїд	міксоплоїд
1	ВПДСС: 7010 С ₁	Ia; Iб**	732	18,5	33,0	8,2	40,3	
2	ВПДСС: 7010(1:15) С ₁	Клональні лінії Ni: 15***	494	2,8	31,1	64,7	0,8	0,4
3	ВПДСС 7010 С ₃	Ia; Iб	300	2,6	36,6	47,3	13,3	
4	ВПДСС: 7010(1:15) С ₂	Ia; Iб	596	0,6	11,7	83,5	4,0	

Примітки. * Аналіз плоідності проведений на АП "Partec" за кількістю ядерної ДНК в клітині
 **Ia, Iб - добір насінників 4х за класифікацією Зайковської Н.Е., Ярмолюк Г.І., 1982р.
 ***Ni: 15 - добір насінників 4х за результатом цитогенетичного аналізу мейозу.

Дані таблиці свідчать, що вихід тетраплоїдів в першій генерації насіння після індукції колхіцином в результаті добору лише за вирівняністю пилкових зерен становить 8.2 %, а кількість анеуплоїдів досягає 40,3 %. Серед біотипів синтетичної популяції 7010 (1:15) С₁, що сформована від двох клональних ліній, вихід тетраплоїдів в насінному потомстві становив 64.7 %. Слід визнати, що селекційний матеріал синтетичної популяції 7010 (1:15) С₁ краще стабілізувався за плоідністю в наступній генерації С₂ порівняно з тетраплоїдною популяцією 7010 С₃. Вихід тетраплоїдів становив 83.5 %, при цьому кількість анеуплоїдів була також мінімальною і становила 4%.

Насіння кожного тетраплоїдного насінника походження 7010, 7009 та 7010 (1:15) урожаю 1997 і 2001рр. аналізували за схожістю та масою 1000 плодів (табл. 3).

Дані таблиці свідчать, що добір за плоідністю, фертильністю і вирівняністю пилкових зерен, за якістю насіння впродовж лише трьох

генерацій добору після індукції колхіцином суттєво не вплинув на серед показники схожості.

Таблиця 3

Мінливість показників схожості та маси 1000 плодів насіння залежно від генетичних особливостей матеріалу

Походження	Кількість насінників, шт.	Схожість, %			Маса 1000 плодів, г		
		$\bar{X} \pm S \bar{X}$	CV	Sx %	$\bar{x} \pm S \bar{x}$	CV	Sx %
7010 C ₁ ур. 1997р.	48	88.58 0.26	15.9	0.29	23.74 1.04	28.8	4.38
7009 C ₁ ур. 1997р.	40	83.25 2.28	17.3	2.73	25.90 0.15	26.7	0.57
7010 C ₃ ур. 2001р.	79	87.44 2.28	23.1	2.60	26.54 0.59	19.2	2.22
7009 C ₃ ур. 2001р.	90	84.97 1.48	16.5	1.74	25.62 0.6	22.3	2.38
7010 1:15 C ₂ ур. 2001р.	58	85.31 2.43	18.5	2.85	28.34 0.74	19.9	2.61

Слід визнати тенденцію щодо збереження середніх показників схожості за період трьох циклів добору і збільшення діапазону мінливості за цією ознакою в межах тетраплоїдної популяції 7010. Коефіцієнт варіації впродовж трьох циклів добору змінився від 15,9 до 23,1 %. Таку мінливість можна пояснити як самою природою багатонасінних цукрових буряків, такі залежністю від генетичної збалансованості гамет і зародків. При цьому діапазон мінливості і коефіцієнт варіації за показниками абсолютної маси насіння зменшився для запилювача 7010 від 28,8 до 19,2 % а для запилювача 7009 від 26,7 до 22,3 %, що вказує на позитивну залежність від основних факторів добору і явну недостатність стабілізації показників насінневої продуктивності впродовж лише трьох його циклів. Зустрічаються насінники 4х з показниками схожості більше 90 % і при цьому показниками абсолютної маси насіння від 11 до 15 г. Дані свідчать про можливу позитивну стабілізуючу дію природного добору шляхом ранньої ембріональної летальності зародків з незбалансованим числом хромосом. Це явище важливо вивчати з застосуванням цитоембріологічних методів дослідження. Для синтетичної тетраплоїдної популяції 7010 1:15 середні показники маси 1000 плодів насіння становили 28,73 % \pm 0,79 пр коефіцієнті варіації 19,9 % і середні показники схожості 85,31 \pm 2,43%.

Показником стабільності індукованого колхіцином селекційного матеріалу є поліплоїдний ефект, що визначається долею тетраплоїдів в насінневому потомстві наступних генерацій. Слід визнати, що при цьому насіння другої генерації запилювача 7010 1:15 характеризувалось значно більшою стабільністю за плоїдністю насіння. Вихід тетраплоїдів на буряк першого року вегетації за результатами аналізу на АП "Partec" становив

74-93,9 % порівняно з показниками 34-60 % тетраплоїдів у запилювача 7010 Сз. Мінливість за кількістю тетраплоїдних форм у насінні запилювача 7009 Сз відповідно становила 29,8-52,2 %. Методом індивідуального добору за результатом аналізу плідності на буряках першого року вегетації відібраний кореневий матеріал походження 7009 Сз та 7010 Сз для екологічних сортовипробувань за програмою "Бетаінтеркрос" у 2003 р. Запилювач 7010 (1:15) БТ включений у 2004 р до екологічних сортовипробувань, як експериментальна тетраплоїдна популяція, де відсоток тетраплоїдів за результатами аналізу на АП "Partec" більше 83,5 %.

Висновки:

1. В результаті спільних експериментальних досліджень сектору цитології ІЦБ та відділу селекції ВПДСС створені нові поліплоїдні вихідні матеріали для гібридної селекції, адаптовані до природно-кліматичних умов Східного Лісостепу України на основі вітчизняних диплоїдних високоцукристих ліній.
2. Для прискорення селекційного процесу впроваджені нові методи ідентифікації та добору тетраплоїдів за кількістю ядерної ДНК в клітині з використанням АП "Partec".
3. Досліджений на модельному експерименті новий спосіб формування тетраплоїдних популяцій з використанням біотехнологічних методик значно прискорив селекційний процес стабілізації рівня геному після індукції колхіцином тетраплоїдних форм цукрових буряків впродовж двох-трьох циклів добору.

Отримані наукові результати матимуть значення для розробки і обґрунтування нових і вдосконалення існуючих методів диференціації та добору селекційно-цінних тетраплоїдних форм у цукрових буряків з урахуванням екстремальних факторів довкілля.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бормотов В.Е., Турбин Н.В. Экспериментальная полиплоидия и гетерозис у сахарной свеклы - Минск: Наука и техника, 1972. - 230с.
2. Шевцов И.А., Фомичев А.И. Биология и агротехника кормовой свеклы. - К.: Наукова думка, 1980. - 252с.
3. Bieniaszewski T., Pordonski D. Zalesznost podstawowych skladnikow pokarmowich w koniczunach di-i tetraploidalnuch od termine zbioru roslin. Acta Acad. Agr. Techn. Olsten. Agr.-1996.-№62-P. 97-106.
4. Титаренко А.В. Направление скрещивания в селекции аутотетраплоидной озимой ржи // Научно- технологический бюлетень ВНИИ растениеводства. - 1992. - №226 - С. 31-34.
- f 5 Зайковская Н.Е., Петрушина М.П. Методика быстрого подсчета хромосом. //Агробиология. - 1961. - №246. - С. 630-632.
- [6 Неговский Н.А., Болелова З.А., Демчинская Е.Н., Бережко С.Т. Полиплоидия в селекции сахарной свеклы //Весник с.-х. науки. - 1965. -

- №4.-С. 11-12.
7. Захариев А., Славова И. Первые результаты полученных дигаплоидов и тетраплоидов //Генетика и селекция. - 1992. - 25, №5. - С. 375-378.
 8. Deuter M. Fischer H., Melzer R. Zur Problematik der Verbesserung der Keimfähigkeit polyploider Zuckerruben auf genetischen and zytologischen Grundlage // Der Internationalen Arbeitstagung vom 20 bis 24. October. - Berlin, - 1976. -P. 170-176
 9. Бормотов В.Е. Исследование по цитогенетике полиплоидных форм сахарной свеклы. - Минск: Наука и техника, 1976. - 180с.
 10. Шевцов И.А. Частота и продуктивность аутоплоидов у триплоидных гибридов сахарной свеклы //Цитология и генетика. - 1999. - 33, №5-С.3-7.
 11. Ярмолюк Г.И., Ширяева Э.И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. - К.: Наукова думка. - 1982.- С. 24-34.
 12. Роїк М.В., Ковальчук Н.С. Проблема ідентифікації рівня геному трансгенних триплоїдних гібридів цукрових буряків //Генетично модифіковані рослини: перспективи та проблеми. - К.: УААН. - 2003. • С. 120-126.
 13. Бердышев Г.Д., Голда Д. М. Общая и молекулярная генетика. Практикум. - К.: Вища школа. - 1984. - С. 52-62.
 14. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. -М.: Колос, 1979. - 351 с.
 15. Долбик А. М., Бычко Е.А. Клональное микроразмножение тетраплоидных форм сахарной свеклы. //Биологические методы в селекции сахарной свеклы. - М.: Агропромиздат. - 1989. - С. 11-14.
 16. Панин В.А., Драч Н.П., Рыбак Д.А. Принципы и методы создания стабильных тетраплоидных популяций свеклы // Экспериментальная полиплоидия у культурных растений. - К.: Наукова думка. - 1974. - С. 157-166.
 17. Юсубов А.М., Мосина Н.Р. Митотические и мейотические тетраплоиды сахарной свеклы // Генетика сахарной свеклы. - Новосибирск: Наука. •] 1984.-С. 178-182.
 18. Шевцов И.А. Чугункова Т.В. Плодовитость аутотетраплоидов и частота встречаемости анеуплоидов в процессе размножения у *Heliorharpus gracilis* // Цитология и генетика. - 2001. - 35, №3. - С. 10-13.
 19. Ильенко И.И. Микрклональное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. - 1983.- 15, №4. - С.351-355.

Аннотация

УДК 633. 63: 631. 52

Методы создания тетраплоидных многосемянных опылителей сахарной свеклы в природно-климатических условиях Веселоподольской опытно-селекционной станции

**Н.С. Ковальчук, В.И. Власюк, К.А. Вареник,
Л.Н. Смирных, В.М. Синельник**

Применены новые методы идентификации уровня генома за количеством ядерной ДНК в клетке для создания тетраплоидных многосемянных опылителей сахарной свеклы происхождения Веселоподольской опытно-селекционной станции. Исследована эффективность нового способа формирования синтетических тетраплоидных популяций на основании аутофертильных клональных линий.

Annotation

UDC 633. 63:631. 52

Methods of development of tetraploid multigerm pollinators under agroclimatic conditions of the Veselyi-Podil Experimental Breeding Station

**N. Kovalchuk, V. Vlasiuk, K. Varenyk,
L. Smirnykh, V. Synelnyk**

New methods of identification of genome level on the basis of amount of nuclear DNA in the cell are used for development of tetraploid multigerm pollinators of sugar beet of the Veselyi-Podil Experimental Breeding Station origin.

The efficiency of the new method of formation of synthetic tetraploid populations on the basis of self-fertile clonal lines was investigated.