

УДК 633.63:631.52

В.І. РЕДЬКО, А.К. НУРМУХАММЕДОВ, Н.С. БЕХ,  
О.К. ДРАГУНОВА, Т.М. НЕДЯК, Л.В. ШАЮК  
Інститут цукрових буряків УААН

МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ ЯК СУЧАСНЕ ЗНАРЯДДЯ СЕЛЕКЦІЇ ЦУКРОВИХ  
БУРЯКІВ

### ОГЛЯДОВА СТАТТЯ

У статті висвітлені можливі шляхи прискорення селекційного процесу цукрових буряків за допомогою біотехнологічних методів. Показано результати застосування методів клонального мікророзмноження, культивування ізольованих зародків, незапліднених насінневих зачатків, експериментальної поліплоїдії *in vitro*, селективних середовищ, подвійних культур, соматоклональних варіантів, ДНК- технологій.

Біотехнологічні методи застосовують у селекційній практиці для розмноження і збереження цінних генотипів, створення нових вихідних матеріалів цукрових буряків та порівняльного вивчення генотипів. Пріоритет в дослідженнях з біотехнології цукрових буряків належить науковцям Інституту цукрових буряків, які ще 1976 р. розпочали роботу з культурами ізольованих клітин і тканин.

Нові біотехнологічні методи в рослинництві ставлять за мету створення цінних форм, які традиційними методами селекції отримати важко або неможливо, та розробку методів швидкого аналізу й оцінки селекційного матеріалу, отриманого як біотехнологічними методами, так і методами класичної селекції.

Використання нових молекулярно-біологічних методів, таких як ДНК-маркери, для порівняльного вивчення генотипів рослин дозволяє проводити критичний аналіз щодо філогенетичних зв'язків на різних рівнях, від окремих видів до найвищих таксономічних категорій [1]. Об'єкт наших досліджень - рід *Beta L.*, до якого належать всі форми культурних буряків.

За допомогою ПЛР-аналізу було досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм 12 диких видів та двох форм культурних буряків. Для цього використали 11 RAPD-праймерів з послідовностями довжиною від 10 до 21 нуклеотидів. Обрана маркерна система дозволила отримати 172 локуса, з яких 170 є поліморфними. Встановлено відповідність отриманого розподілу досліджуваних об'єктів літературним даним, особливо схемі, розробленій В.П.Зосимовичем ще у 1959 р. [3].

ДНК-маркери широко використовуються для картування рослинних геномів. Так, з їх допомогою уточнено та розширено генетичні карти для

багатьох сільськогосподарських культур [15]. Не менш важливим є використання ДНК-маркерів для встановлення закономірностей генетики популяцій. Практична значимість цих досліджень полягає у можливості ідентифікації селекційних матеріалів на рівні ДНК та маркуванні цінних сільськогосподарських ознак.

Отримання високопродуктивних гібридів ґрунтується на рекурентній селекції, яка спрямована на підвищення концентрації бажаних генів, що контролюють ознаки врожайності, високої технологічної якості і стійкості до стресових факторів.

Селекційна робота вимагає збереження чистоти генотипів, що є досить складним завданням для такої перехреснозапильної культури, як цукрові буряки. Цього можна досягти вегетативним розмноженням. Раніше *найчастіше застосовували метод розрізання коренеплоду на частини, щеплення бруньок, укорінення вилучених від коренеплоду бруньок та черешків з пазушною брунькою з висадків*. Проте ефективність отримання рослин цим шляхом була невеликою.

Нами було розроблено технологію клонального мікророзмноження цукрових буряків, яка є найбільш ефективною для вегетативного розмноження та отримання групи ідентичних рослин. Вона дозволяє від бруньки, введеної в стерильну культуру, за 6 місяців отримувати до 5000 рослин. Завдяки можливості довгостроково підтримувати ріст і розмноження цінних селекційних матеріалів клонуванням *in vitro* можна створити меристемні колекції цукрових буряків, які в будь-який час забезпечать селекціонера генотипами, необхідними для його роботи [6, 11].

Метод культури зародків, ізольованих на ранніх стадіях ембріогенезу, є ефективним для отримання рослин із маложиттєздатних зародків. Так нами були регенеровані рослини, навіть коли вони вилучалися на стадіях "серця" і "торпеди" [2, 9].

Необхідність створення гомозиготних ліній при селекції на гетерозис привернула увагу до гаплоїдів. Вони відкрили можливість швидкого досягнення гомозиготності порівняно з альтернативним шляхом, який полягає в багаторазовому самозапиленні. Для отримання гаплоїдних рослин розроблена методика культури *in vitro* незапліднених насіннєвих зачатків. Вихід гаплоїдів складав 0,8-16,7 %. Основними факторами, які впливали на вихід гаплоїдних структур, були умови культивування, генотип та фізіологічний стан рослини-донора [17].

Збільшення кількості гаплоїдів спостерігалось при вилученні незапліднених насіннєвих зачатків з розкритих квіток, а також при запиленні опроміненим пилком донорських рослин. Слід зазначити, що введення в генотип рослини-донора маркерних генів дає змогу візуально виділяти гаплоїди [14]. Переведення їх на дигаплоїдний рівень здійснювали в умовах *in vitro* на живильних середовищах з колхіцином. Вживання бруньок після обробки колхіцином в середньому складало 87,8%, а вихід дигаплоїдів - 62% [17].

Необхідною умовою селекції високопродуктивних триплоїдних гібридів цукрових буряків є створення тетраплоїдних вихідних матеріалів. Тому була розроблена методика отримання тетраплоїдів у культурі *in vitro*. Оцінка плоїдності після колхіцинування в другому пасажі на стандартному живильному середовищі  $C_2O_0$  показала, що кількість бруньок, меристемні клітини яких мали змінену кількість хромосом, становила 42,0-59,0%, а вихід стабільних тетраплоїдів - 8-26% залежно від генотипу [16]. Цей метод дозволяє підвищити вихід тетраплоїдів порівняно з традиційним, робить операції з колхіцином більш безпечними та економічно вигідними, шляхом клонування *in vitro* швидко їх розмножити і отримати укорінені рослини.

При розробленні підходів до проведення селекції в умовах *in vitro* було встановлено, що культивовані *in vitro* рослини проявляють подібний до донорських характер онтогенезу і що між утилітарними ознаками рослин і ознаками їх вегетативних аналогів у культурі *in vitro* існують кореляції [4, 7].

Стійкість рослин - генетично зумовлена ознака. Але оскільки вона є потенційною, то здатна проявлятися лише в умовах стресу. Тому успіх досліджень у галузі селекції стійких до біотичних і абіотичних стресових факторів сортів та гібридів багато в чому залежить від наявності надійних методів створення і діагностики вихідних матеріалів.

З використанням селективних середовищ, які імітують у культурі *in vitro* стресові умови, були отримані форми, стійкі до засолення субстрату та дефіциту в ньому води [8]. Розроблена методика оцінки селекційних матеріалів на стійкість до гнилей коренеплодів на середовищах з екстрактом і культуральною рідиною грибів роду *Fusarium* та в подвійній культурі калусу і патогенного гриба. [12, 13]. Методи культури *in vitro* з використанням соматональної мінливості дають можливість розширити генетичну різноманітність цукрових буряків. Клітина, переведена в умови культивування *in vitro*, зберігає основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може реалізувати її. Проте фізичні та хімічні фактори культивування, що мають мутагенну дію, а також генетична гетерогенність соматичних клітин експланта створюють передумови для отримання генетично змінених рослин.

У регенованих із калусної культури соматональних варіантів цукрових буряків спостерігали відмінності як у порівнянні з вихідною формою, так і між ними. В культурі *in vitro* соматоклони відрізнялися за кольором і формою листків і черешків, за їх кількістю, здатністю до коренеутворення та калусогенезу, за електрофоретичними спектрами пероксидази. У польових умовах - за габітусом, строками дозрівання. Крім того, серед рослин другого року життя були виявлені форми з чоловічою стерильністю [10, 18].

Таким чином, в Інституті цукрових буряків УААН при розробці біотехнологічних методів одержано ряд вагомих результатів, які сприятимуть подальшим успіхам селекційної роботи.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений - М.: Наука, 2000. - 136 с.
2. Белоус В.Е., Ильенко И.И., Редько В.И., Осавлюк С.Н. Влияние условий культивирования на развитие изолированных зародышей сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. - М.: Госагропромиздат. - 1989. - С. 32-41.
3. Зосимович В.П. Эволюция маревых и рода *Beta* L. // Сборник научных трудов по селекции, агротехнике, механизации и защите растений сахарной свеклы и других культур. - К.:ВНИС. - 1959. - 38. - С. 59-73
4. Зубенко В.Ф., Ильенко И.И., Редько В.В., Редько В.И. Селекция форм сахарной свеклы с повышенной продуктивностью в условиях культуры *in vitro* // Доклады ВАСХНИЛ. - 1987. - №11. - С. 13-15.
5. Зубенко В.Ф., Ильенко И.И., Редько В.И., Редько В.В. Отбор устойчивых к хлоридному засолению форм сахарной свеклы в условиях культуры тканей // Доклады ВАСХНИЛ. - 1987. - №5. - С. 18-20.
6. Редько В.И., Ильенко И.И., Недяк Т.Н. Вегетативное размножение сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Труды Междунар. науч.-произ. конф. «Пути интенсификации свеклосахарного производства в республике Беларусь». - Минск: «Юнипак». - 2002. - С.161-163.
7. Редько В.И., Ильенко И.И., Редько В.В., Самойлова Т.М. Культура меристем *in vitro* и селекция сахарной свеклы // Труды V съезда ВОГиС. - Москва. - 1987. - Т.IV, 4.4. - С. 161.
8. Редько В.И., Редько В.В., Сахно Л.А. Реакция меристем сахарной свеклы на солевой стресс в условиях *in vitro* // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. - М.: Госагропромиздат. - 1989. - С. 27-32.
9. Редько В.И., Белоус В.О., Ковальчук Н.С. Перспективи використання культури недозрілих зародків *in vitro* в селекції цукрових буряків // Труды Міжн. конф. "Селекція і вирощування польових культур". - Кам'янець-Подільський. - 1992. - С.72.
10. Редько В.И., Недяк Т. М., Драгунова О.К., Дубін О.В. Калусогенез і соматональна мінливість у цукрових буряків // Збірник наукових праць ІЦБ. -2000. - Вип. 2., Кн.1. - С.138-143.
11. Редько В.И., Недяк Т. М., Дубін О.В., Ніколаєнко А.П. Розмноження та збереження селекційних матеріалів цукрових буряків у культурі *in vitro* // Збірник наукових праць ІЦБ. - 2000. - Вип. 2., Кн. 1. - С. 123-130.
12. Редько В.И., Нурмухаммедов А.К., Недяк Т.М. Подвійна культура калусу буряків і грибів роду *Fusarium* // Захист рослин. - 2000. - №7. - С. 20-21.
13. Роїк М.В., Нурмухаммедов А.К., Редько В.И., Недяк Т.М. Нова методика оцінки стійкості цукрових буряків проти збудників гнилей // Вісник аграрної науки. - 2004. - №5. - С.24-26.

14. Рябовол Л.О. Розробка способів одержання гаплоїдів і дигаплоїдів цукрових буряків, як вихідного матеріалу для селекційного процесу: Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: 01.05.06 - селекція та насінництва / ІЦБ УААН-К., 1994.-24с.
15. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство / Ю.М. Сиволап, Р.Н. Календарь, Т.Г. Вербицкая, А.Ф. Брик, Н.Э. Кожухова, А.Е. Солоденко, С.В. Чеботарь, И.А. Балашова, И.А. Барышева, Е.А. Топчиева / Под. ред. Ю.М. Сиволапа. - К.: Аграрна наука, 1998. - 156с.
16. Спосіб отримання тетраплоїдів цукрових буряків у культурі in vitro I Пат. №45656А Україна, МПК 7 А 01 Н 4/00 I М.В. Роїк, В.І. Редько, Ю.В. Кірсанова, Т. М. Недяк, А.П. Ніколасенко; Інститут цукрових буряків УААН . - Заявлено 25.05.01.; Опубл. 15.04.02, бюл. "Промислова власність". №4.
17. Red'ko V., Dragunova O.K. Obtaining haploid and dihaploid lines of sugar beet under in vitro conditions // Abstr. II Intern. Symp. on Plant Biotechnology. - Kyiv. - 1998. - P.33.
18. Red'ko V., Dragunova O.K., Nedyak T.M., Dubin A.V. Somaclonal variants of sugar beet // Abstr. II Intern. Symp. on Plant Biotechnology. - Kyiv. - 1998.-P.106.

#### Аннотация

УДК 633.63:631.52

Методы биотехнологии как современное орудие селекции сахарной свеклы

В.І. Редько, А.К. Нурмухаммедов, Н.С. Бех,  
О.К. Драгунова, Т.М. Недяк, Л.В. Шаюк

В статье представлены возможности ускорения селекционного процесса сахарной свеклы с помощью биотехнологических методов. Показаны результаты развития методов клонального микроразмножения, культивирование изолированных зародышей, неоплодотворенных семязпочек, экспериментальное in vitro полиплоидии, селективных сред, двойных культур, соматоклональных вариантов, ДНК- технологий.

## **Annotation**

UDC 633.63:631.52

**Methods of biotechnology as a modern implement of breeding sugar beet**

**V. Redko, A. Nurmukhammedov, N. Bekh,  
O. Dragunova, T. Nedyak, L. Shayuk**

The article presents the possibilities of acceleration of breeding sugar beet with biotechnological methods. The results of development of methods of clonal micromultiplication, cultivation of isolated unripe embryos, unfecundated ovules, experimental in vitro polyploidy, selective media, double cultures, somaclonal variants, DNA- technologies are submitted.