УДК 633.63.581.1

О.К. ДРАГУНОВА
Інститут цукрових буряків УААН

ІНДУКЦІЯ ГАПЛОЇДНОГО ПАРТЕНОГЕНЕЗУ В УМОВАХ КУЛЬТУРИ IN VITRO У ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Вивчали умови індукції морфогенезу у експлантованих незапліднених насіннєвих зачатках з метою отримання гаплоїдів цукрових буряків як вихідного матеріалу для створення гомозиготних ліній. Розвиток експлантів проходив по типу калусогенезу та ембріогенезу. Встановлено, що найбільший вихід структур спостерігали при передобробці експлантів низькою температурою та культивуванні на живильному середовищі B_5, яке містить 2 мг/л БАП, 2 мг/л кінетину і 0,1 мг/л НОК.

Вступ. **Гаплоїди все частіше використовують у селекційно-генетичних програмах як вихідний матеріал для створення моносомних рослин, для дослідження цитогенетичної структури виду, закономірностей багатьох генетичних явищ [6]. Гемізиготний стан генів, що характерний для гаплоїдів, дозволяє швидше виявляти рецесивні мутації, що скорочує строки відбору і створення мутантних ліній. Таким способом отримані лінії цукрових буряків, стійкі до гербіцидів, та кормових - з підвищеною продуктивністю амінокислот [9].**

Практичний інтерес у гетерозисній селекції цукрових буряків мають подвоєні гаплоїди, отримані шляхом колхіцинування, що є аналогами селекційних гомозиготних ліній. Крім того, дигаплоїдні лінії дають глибше розуміння генетики моногенних і полігенних ознак [9].

Традиційні шляхи отримання гаплоїдів у цукрових буряків in vivo ґрунтуються на таких способах стимуляції розвитку гаплоїдних клітин зародкового мішку материнської рослини як схрещування цих рослин з дикими видами роду Beta L., формами різного рівня плоїдності, запилення опроміненим у-промінням пилком столових буряків [4, 8]. Гаплоїдні рослини, що отримані шляхом індукованого гіногенетичного гаплоїдного партеногенезу, схожі за ознаками на материнську рослину. Однак ці методи трудомісткі і мають низький процент виходу гаплоїдів [2, 8].

Використання культури in vitro значно прискорює створення чистих ліній зі збагачених у генетичному відношенні гібридів без негативного впливу інцухт-депресії [2, 3, 5].

Спроби отримати андроклінні гаплоїди in vitro на основі індукції розвитку елементів чоловічої генеративної сфери - пиляків і мікроспор не

були успішними. Деякі автори навіть вважають цукрові буряки неандрогенним видом [8].

Отримані в культурі пиляків регенеранти мали рівень плоїдності, тотожний плоїдності донорної рослини, оскільки морфогенез проходив з тканин пиляків. В основному ж спостерігали такі морфогенетичні процеси я калусогенез і ризогенез [1, *5].* Причиною цього є слабка *диференціація* пиляків у культурі in vitro, що пов'язують з запасанням амілопластів у пилкових зернах цукрових буряків [8].]|

Ефективне використання гіногенезу в культурі in vitro описане для таких видів рослин, як ячмінь, пшениця, тютюн, рис, цибуля, соняшник, цукрові буряки, гербера. Хоча тільки у цукрових буряків культура зав"язей і незапліднених насіннєвих зачатків рекомендована як альтернатива використанню андрогенезу. Частота виходу гаплоїдів у культурі зав'язей і незапліднених насіннєвих зачатків фертильних і ЧС форм складала 2,2% [9]. Тому актуальним є питання вивчення умов індукції гаплоїдного партеногенезу в культурі in vitro.

Збільшення частоти формування гіногенетичних макроструктур можливе з використанням селекційно-генетичних і біотехнологічних підходів [3, 4]. В даній статті представлені результати досліджень впливу умов вирощування, генотипу рослин-донорів незапліднених насіннєвих зачатків, передобробки експлантів і складу живильного середовища на частоту виходу гіногенетичних макроструктур в умовах in vitro..

Матеріали і методи досліджень. Донорами незапліднених насіннєвих зачатків були насінники диплоїдних фертильних (ММ 1, ММ 2, ММ 3) і чоловічостерильних форм (ЧС 1, ЧС 2, ЧС 3) 6 селекційних номерів Верхняцької дослідно-селекційної станції. Коренеплоди кожного номера вирощувалися в умовах закритого і відкритого ґрунту. В культуру in vitro експланти були введені у період з травня по липень 2004 року індивідуально з кожної рослини номеру.

Верхівки центрального і бічних генеративних пагонів зрізали з насінника на стадії "початок цвітіння", яка є оптимальною для введення в культуру. Стерилізацію проводили розчином NaOCl в концентрації від 1 до 2% протягом 20-40 хв, потім рослинний матеріал промивали тричі стерильною дистильованою водою.

У стерильних умовах з нерозкритих бутонів вилучали незапліднені насіннєві зачатки, які культивували на модифікованому за складом гормонів і органічних добавок агаризованому живильному середовищі Гамборга-Евелега B_5.

Для індукції ембріогенезу використали знижену температуру (+4°С) протягом 4 діб і підвищену (+32°С) протягом 2 діб. Експланти після холодової і теплової передобробок витримували в термостаті протягом 2 тижнів, потім переносили на світло при +25°С і 16-годинному фотоперіоді. Сформовані макроструктури культивували на середовищі для клонального мікророзмноження цукрових буряків на основі B_5 (БАП - 0,1 мг/л, ГК - 1 мг/л).

Рівень плоїдності гіногенетичних регенерантів визначали шляхом підрахунку кількості хромосом у соматичних клітинах точки росту за загальноприйнятою методикою, розробленою для польових рослин цукрових буряків [7].

Результати досліджень і їх обговорення. **Проведені дослідження були спрямовані на вивчення факторів індукції морфогенетичних процесів у ході гаплоїдного гіногенетичного партеногенезу в культурі in vitro.**

В процесі культивування експлантів спостерігали зміну кольору інтегументу від білого до коричневого і збільшення в розмірі самих насіннєвих зачатків. Макроструктури, тобто калус або зародок, формувалися на мікропілярному кінці насіннєвого зачатку. Ці морфогенетичні процеси проходили через 3 місяці після введення експлантів у культуру.

За даними досліджень, проведених у 2004 р., на вихід макроструктур впливали як генотип рослин-донорів незапліднених насіннєвих зачатків, так і умови їхнього вирощування (табл. 1).

У фертильних рослин лише у номера ММ 2 спостерігали формування макроструктур з експлантів тепличних і польових рослин-донорів. Частота формування структур у польових рослин була у 2 рази вища, ніж у тепличних (1,4 та 0,6% відповідно).

В цілому, для фертильних запилювачів, вирощених в теплиці, середня частота виходу макроструктур склала 0,9%. Польові фертильні рослини мали вихід макроструктур в середньому 0,6% (у 1,5 разу менше). Це можна пояснити тим, що у двох номерах не спостерігали формування макроструктур у польових і тепличних рослин.

У стерильних форм вдалося отримати макроструктури лише у польових рослин, що не дало можливість порівняти вплив умов вирощування рослин-донорів на частоту виходу структур. Формування макроструктур у номері ЧС 2 склало 2,4%, що у 4 рази більше, ніж у фертильних рослин, вирощених у польових умовах (0,6%).

Таблиця 1

Формування макроструктур в залежності від умов вирощування та генотипу рослин-донорів незапліднених насіннєвих зачатків

Селекційний номер рослини-донора	Кількість експлантів, введених в культуру in vitro, шт.	Кількість сформованих макроструктур	
		шт.	%
Тепличні рослини			
ММ 1 (фертильні)	484	2	0,4
ММ 2 (фертильні)	352	5	1,4
Середнє			0,9
Польові рослини			
ММ 2 (фертильні)	170	1	0,6
ММ 3 (фертильні)	169	1	0,6
Середнє			0,6
ЧС 2(стерильні)	83	2	2,4

Стимулювання морфогенезу у незапліднених насіннєвих зачатків **можливе при використанні дії стресових факторів на початкових** етапах **культивування експлантів і підбором складу живильного середовища.**

Досліджували вплив таких температурних стресових факторів:

1. **ПОТ/т - передобробка підвищеною температурою - експланти поміщали в термостат при температурі +32°С на 2 доби, потім культивували при +25°С у термостаті протягом 14 діб.**
2. **ПОХ/т - передобробка зниженою температурою - експланти поміщали в холодильник при +4°С на 4 доби, потім культивували** при **+25°С у термостаті протягом 14 діб.**
3. **ПОХ/св - передобробка зниженою температурою - експлант- поміщали в холодильник при +4°С на 4 доби, потім культивували** при **+25°С на світлі при 16-годинному фотоперіоді.**
4. **ПОХ/г - передобробка зниженою температурою - експлантит вилучали з бутонів, попередньо оброблених гормонами(БАП 2 мг/л, ГК мг/л), потім поміщали їх у холодильник при +4°С на 7 діб, дал культивували при +25°С на світлі при 16-годинному фотоперіоді.**

У складі живильного середовища були використані різні концентрації цукрози, амінокислот, мезоінозиту і гідролізату казеїну, а також гормонів БАП, кінетину і НОК (табл. 2).

Таблиця 2

Склад живильного середовища для культивування незаі піднених насіннєвих зачатків(на основі середовища B_5)

Варі-ант серед-овищ-а	Компоненти живильного середовища, мг/л							
	мезоі-нозит	глу-тамін	аскор-бінова к-та	гідролізат казеїну	цукроза	БАП	кіне-тин	НОК
V1	**100**	**20**	**0,50**	**100**	**60**	**2**	**2**	0,10
V2	**50**	**20**	**0,50**	**50**	ЗО	**1**	**1**	0,05
V3	**100**	**10**	-	**100**	**60**	**2**	-	0,10
V4	**100**	**10**	**–**	**100**	**60**	**– ,**	**2**	0,10

При всіх використаних варіантах передобробки у морфогенезі експлантів переважав процес ембріогенезу. Більш ефективним виявився варіант передобробки незапліднених насіннєвих зачатків зниженою температурою, при цьому експланти сформували 10 з 13 індукованих макроструктур (табл. 3).

З чотирьох варіантів живильного середовища лише два - V1 і V2 індукували розвиток культивованих насіннєвих зачатків. Ці два варіанти порівняно з V3 і V4 містили аскорбінову кислоту, підвищену концентрацію глутаміну і гормони БАП, кінетин і НОК. Варіант середовища V1 індукував як

калусогенез, так і процес ембріогенезу. При культивуванні експлантів у варіанті V2 у них переважали процеси калусогенезу.

Таблиця 3

Індукція морфогенезу в залежності від передобробки експлантів і варіантів живильного середовища культивування

Індивідуальний номер рослини-донора	Тип сформованих макроструктур	Варіант передобробки експлантів	Варіант поживного середовища
ММ 1/1	Зародок	ПОТ/т	V2
ММ 1/1	Калус	ПОТ/т	V1
ММ 2/1	Калус	ПОХ/т	V2
ММ 2/1	Калус	ПОХ/т	V1
ММ 2/1	Зародок	ПОХ/т	V1
ММ 2/1	Зародок	ПОТ/т	V1
ММ 2/3	Зародок	ПОХ/т	V2
ММ 2/3	Зародок	ПОХ/т	V1
ММ 2/3	Зародок	ПОХ/св	V2
ММ 2/3	Калус	ПОХ/г	V1
ММ 3/5	Калус	ПОХ/г	V1
ЧС 2/2	Зародок	ПОХ/г	V1
ЧС 2/2	Зародок	ПОХ/г	V2

На основі отриманих даних оптимальною схемою для стимулювання індукції морфогенезу у незапліднених насіннєвих зачатках в умовах культури in vitro можна вважати таку: експланти культивують на середовищі V1 при +4°С 4 доби, потім - при +25°С у термостаті протягом 14 діб і переносять на світло при 16-годинному фотоперіоді і +25°С.

З 13 сформованих макроструктур шляхом клонального мікророзмноження були отримані гаплоїдні рослини (рис.1), плоїдність яких була встановлена цитологічним аналізом (рис.2).

Як показали багаторічні дослідження гаплоїдний рівень регенерантів цукрових буряків зберігається уже протягом 15 років. На підставі цього можна зробити висновок про стабільність гаплоїдного рівня геному і і відсутність спонтанної диплоїдизації в умовах культури in vitro.

Висновки. **Отримані результати підтвердили вплив умов вирощування і генотипу рослин-донорів незапліднених насіннєвих зачатків на частоту виходу гіногенетичних макроструктур у культурі in vitro. Умови передобробки експлантів і склад живильного середовища не лише стимулювали розвиток експлантів, а і впливали на шляхи формування макроструктур.**

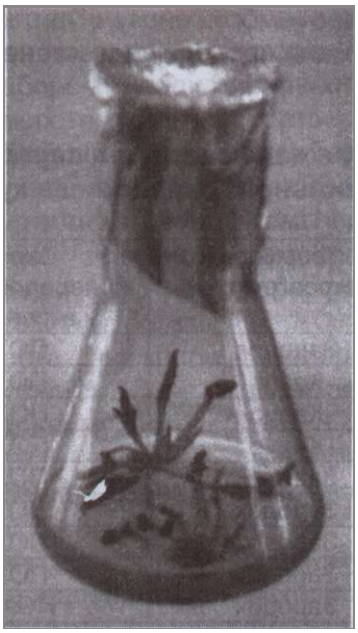

Рис. 1 Гаплоїдні рослини цукрових буряків

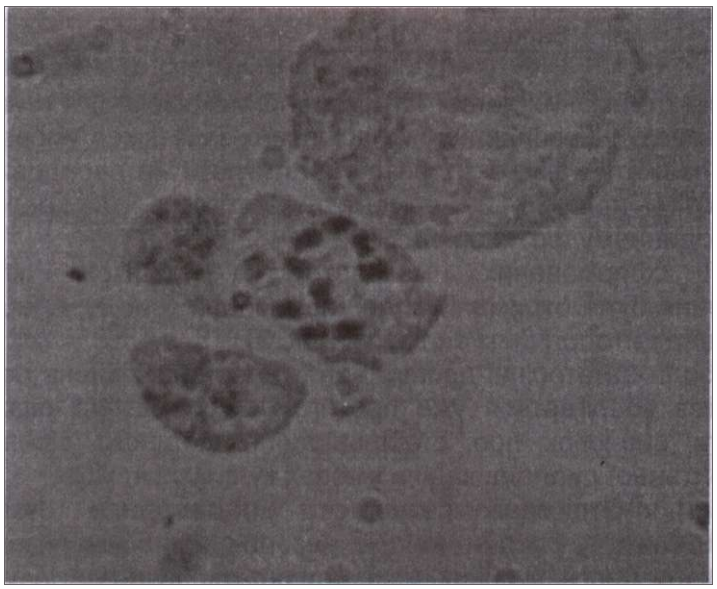

Рис. 2 Хромосомний набір галоїдної рослини цукрових буряків

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Атанасов А.И., Бутенко Р.Г. Культура изолированных пыльников сахарной свеклы // Физиология и биохимия культурных растений-1980.-Т. 12, № 1. - С.49-56.

2. Белоус В.Е., Ильенко И.И., Редько В.И., Бабьяж И.А., Чемерис Л.Н., Олейник Н.А. Применение метода культуры изолированых семяпочек и зародышей для получения гаплоидов сахарной свеклы//Цитогенетические и цитоэмбриологические исследования в селекции сахарной свеклы - К.: ВНИС. - 1988. - С.140г148.
3. Подвигина О.А., Знаменская В.В. Индуцирование гаплоидии у сахарной свеклы/Доклады Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика А.Л.Мазлумова. - Часть I. Биотехнология, селекция и семеноводство. - Рамонь: ВНИИСС. - 1996. - С.57-58.
4. Рябовол Л.О. Розробка способів одержання гаплоїдів і дигаплоїдів цукрового буряка, як вихідного матеріалу для селекційного процесу: Автореф. дис. ...канд. сільськогосподарських наук:05.05.69. - К., 1994. -20 с.
5. Свирщевская А.Н., Бормотов В.Е. Культура тканей сахарной свеклы. Генетические и физиологические аспекты. - Минск: Навука и техника, 1994.-142 с.
6. Хохлов С.С. и др. Гаплоидия у покрытосеменных растений. - Изд-во Саратовского университета, Ч.1., 1970. - 140 с.
7. Ярмолюк Г.И., Ширяева Э.И. Цитоэмбриологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. Методические рекомендации. - К.: Наукова думка, 1982. - 56 с.
8. In Vitro Haploid Production in Higher Plants. Vol. !..Fundamental aspects and methods. - Kluwer Academic *Publishers:* Dodrecht/Boston/London, 1996.-358 p.
9. J.Van Geyt, G.J. Speckmann Jr., K.D'Halluin and M.Jacobs In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugar beet(Beta vulgaris L.)//Theor Appl Genet.-1987.-V.73.-P.921-925.

Аннотация

УДК 633.63.581.1

Индукция гаплоидного партеногенеза в условиях культуры in vitro у сахарной свеклы

О.К. Драгунова

Изучали условия индукции морфогенеза у эксплантированных неоплодотворенных семяпочек с целью получения гаплоидов сахарной свеклы как исходного материала для создания гомозиготных линий. Развитие эксплантов проходило путем каллусо- или эмбриогенеза. Наибольший выход структур наблюдали после предобработки эксплантов низкой температурой и культивированием их на питательной среде B_5 с 2 мг/л БАП, 2 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК.

Annotation

UDC 633.63.581.1

Induction of haploid parthenogenesis under conditions of in vitro culture of sugar beet

0. Dragunova

The morphogenesis induction conditions of explanted unfertilized ovules for obtaining sugar beet haploids have been studied. The haploids are used as initial materials for creation of homozygous parental lines. Development of explants has taken place through embryo- or callus formation. It was established that the highest output of the structures was under low temperature pre-treatment of explants and cultivation on a B_5 basal medium, supplemented with 2 mg/l BAP, 2 mg/l kinetin and 0,1 mg/l NAA.