

Н.С. БЕХ, В.І. РЕДЬКО, Н.В. БІЛОУС
Інститут цукрових буряків УААН

ЯКІСТЬ ПИЛКУ БАГАТОНАСІННИХ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗАЛЕЖНО ВІД
УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO

Проведено вивчення впливу умов культивування in vitro на пилкоутворюючу здатність мікроклонів диплоїдних цукрових буряків в умовах in vivo. Встановлено, що умови культивування in vitro і колхіцин суттєво не впливають на мікроспорогенез диплоїдних рослин і не змінюють тип пилку вихідного селекційного матеріалу.

Вступ. Використання культури in vitro в селекції дозволяє значно прискорити процес отримання нового вихідного матеріалу. Так, культивування мікроклонів на живильному середовищі з колхіцином є досить поширеним методом отримання тетраплоїдних форм рослин. Він є економічно доцільний і більш безпечний у використанні, скорочує срок одержання тетраплоїдів до 2-х років.

Але дослідники, які вивчали дію колхіцину на рослини при отриманні експериментальних тетраплоїдів, відзначають зниження життєздатності та продуктивності рослин у першому поколінні. Причиною цього є виникнення анеуплоїдів та підвищення кількості відхилень у мейозі. Ці порушення пов'язані з появою від 2 до 8-10 унівалентів на стадії діакінезу, а при досить великій чутливості до 18. При другому поділі мейозу ці відхилення можуть посилюватися, що призводить до створення замість 4 однакових ядер декількох різних за розмірами та кількістю хромосом [1,2].

Тому пилок тетраплоїдних рослин у F₁ значно відрізняється за розмірами і може мати домішок карликових, дегенерованих, а іноді дуже великих пилкових зерен.

Фертильність пилку вивчених тетраплоїдів дуже поступається фертильності диплоїдного вихідного матеріалу. Зустрічаються тетраплоїдні рослини з дуже високою стерильністю - до 80%. Кількість рослин, які мають знижену фертильність пилку (65-75%), становить біля 10% від кількості дослідних рослин [3].

За даними Хасанової М.Г., кількість дегенерованого пилку у тетраплоїдів змінюється від 3 до 20% [5]. Таким чином, порушення процесів мейозу призводить до невіривності, часткової деградації пилку, що є причиною зниження фертильності та насінневої продуктивності тетраплоїдних цукрових буряків.

Також залежно від коливання температур спостерігали так в/дхилення від нормального проходження мейозу як викидання хромосом) плазму з утворенням мікронуклеусів [6].

У культурі *in vitro* при одержанні експериментальних тетраплоїдів вихідний селекційний матеріал у вигляді проростків чи мікроклонів знаходиться під впливом декількох факторів. По-перше, це склад живильного середовища, гормональний фон, концентрація колхіцину. По-друге - умови культивування: температура, освітлення. При розмноженні, колхіцинуванні й подальшому доборі вихідний селекційний матеріал проходить 10-15 пасажів на різні живильні середовища. 1]

При цитогенетичному дослідженні калусних культур цукрових буряків, після тривалого культивування, спостерігається посилення поліплоїдизації клітин з віком культури, що призводить до появи рослин-регенерантів зі зміненими кількістю хромосом і морфологічними ознаками. В клітинних популяціях калусних культур вже другого пасажу з'являється значна кількість клітин з відхиленнями від нормального процесу мітозу. В анафазах клітин спостерігається відставання однієї чи декількох хромосом, мости. Виявлені триполюсні і багатополюсні мітози, дво- та чотириядерні клітини [6].

Пилок диплоїдних цукрових буряків, як і тетраплоїдних, теж варіює за розмірами. Він ділиться на три групи. До першої групи належить пилок розміром від 7 до 27 мікрметрів із переважанням пилку середнього розміру (19,1-23,0 мкм).

До другої групи - пилок із більшою кількістю великих пилкових зерен (23,1-27,0 мкм).

До третьої - пилок середніх розмірів, але з великою часткою дрібних мікроспор (15,1-19,0 мкм) [8].

Матеріали і методи досліджень. Для введення в стерильну культуру цукрових буряків було використано насіння диплоїдних ліній багатонасінних запилювачів Веселоподільської дослідно-селекційної станції.

Проростки отримали на модифікованому живильному середовищі Гамборга і Евелєга (В₅) без фітогормонів. Подальше розмноження мікроклонів проводили на середовищі В₅ з БАП - 5 мг/л; GA - 1 мг/л. Дослідний матеріал культивували при освітленні 2 клк, 16-годинному фотоперіоді, температурі 23±2 °С. Кожні 4 тижні проводилась пересадка дослідних мікроклонів.

Для визначення дії колхіцину диплоїдні бруньки були висаджені на живильне середовище з 0,05 % колхіцину й культивувались 6 діб. Для експерименту відібрали бруньки, які не змінили плоїдності.

Для укорінення мікроклонів застосовували середовище В₅ з НОК - 2,0 мг/л. Укорінені бруньки переносили в ґрунт.

Таким чином, у якості експериментального матеріалу були вирощені коренеплоди:

1 - з насіння вихідного селекційного матеріалу - контроль (2х) - 20 шт.;

2 - 3 мікроклонів, розмножених *in vitro* (12 пасажів) - I варіант (2x) - 15 шт.;

3 - 3 мікроклонів, оброблених 0,05% колхіцином *in vitro* - II варіант (2x) —15 шт.

Для вивчення пилку брали пиляки з нерозкритих дозрілих бутонів центральної гілки і роздавлювали їх на склі в краплі метиленової синьки.

За допомогою окулярного мікрометру із застосуванням об'єктива 40x і окуляра 7x вимірювали діаметр пилкових зерен. Статистичну обробку результатів дослідів проводили за допомогою критерію Фішера за Снедекором [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Слід відмітити, що кількість пилку різних розмірів була неоднаковою у окремих рослин контролю і першого та другого варіантів (табл. 1). Як видно з таблиці, частка малих пилкових зерен у рослин контролю варіювала від 15,39 до 80,44 % і в середньому становила 50,52%, варіація карликових була від 10,82 до 81,23 %, що в середньому складало 39,50 %, середніх від 0 до 24,86 %, в середньому 6,41 %, дегенерованих від 1,14 до 7,15 %, у середньому 3,49 %. Пилка великого розміру зустрічався тільки у двох рослин у незначній кількості - 0,11 і 1,59 %, у середньому 0,09 %.

У рослин, отриманих із мікроклонів, збільшується частка середніх пилкових зерен на 2,90 % і варіює в межах 0,79 до 25,06 %, дегенерованих збільшується на 0,62 %, і становить у межах 0,07 - 6,27 %, а частка карликових, малих і великих зменшується на 0,04 %; 3,47 і 0,03 % відповідно при варіації 21,21 -78,09 %, і 15,96-65,24 %, і 0-0,31 %.

Рослини варіанту 2, вирощені за таких же умов у культурі *in vitro*, але додатково оброблених колхіцином в концентрації 0,05 %, мають в середньому 3,74 % дегенерованого пилку при варіації від 0,59 до 7,06 %; Карликового - 37,35 % при варіація 17,06 - 76,11 %; дрібного - 51,76 % при варіації 20,83 - 75,23 %; середнього - 7,13 % при варіації від 0 - 18,22 %; великого - 0,02 % при варіації 0 - 0,30 %.

Статистична обробка результатів експерименту показала, що різниця у відсотку пилку різних розмірів у варіантах досліді і контролю є статистично недостовірною на 5%-вому рівні значущості.

Таблиця

Варіювання розмірів пилкових зерен у диплоїдних цукрових буряків

Варіанти	Повторення	Кількість пилку %				
		дегенеро- ваний	карликовий, 7,1-15,0 мкм	малий, 15,1- 19,0 мкм	середній, 19,1-23,0 мкм	великим, 23,1-27,0 мкм
Контроль	1	2.33	81.23	15.39	1.05	0.00
	2	7.15	59.31	33.53	0.00	0.00
	3	1.68	51.28	46.74	0.30	0.00
	4	1.18	74.77	23.63	0.42	0.00
	5	4.63	27.11	60.37	7.89	0.00
	6	6.21	22.64	62.91	8.24	0.00
	7	6.43	35.04	56.61	1.92	0.00
	8	4.10	17.26	71.74	6.90	0.00
	9	3.23	23.70	68.40	4.67	0.00
	10	2.50	24.91	59.29	13.30	0.00
	11	4.81	48.26	45.59	1.34	0.00
	12	3.19	20.05	70.26	6.50	0.00
	13	2.27	42.44	55.21	0.08	0.00
	14	1.70	31.26	63.58	3.46	0.00
	15	4.08	10.82	80.44	4.66	0.00
	16	5.94	41.06	34.49	16.91	1.59
	17	2.79	54.76	26.44	15.90	0.11
	18	2.21	34.18	38.76	24.86	0.00
	19	1.14	74.10	21.73	3.03	0.00
	20	2.16	15.78	75.21	6.85	0.00
Варіанті	1	4.75	45.90	43.45	5.90	0.00
	2	3.07	78.09	15.96	2.78	0.10
	3	0.07	60.05	39.09	0.79	0.00
	4	4.72	27.23	58.30	9.44	0.31
	5	6.27	25.17	60.42	8.15	0.00
	6	6.03	37.73	54.23	2.01	0.00
	7	5.05	41.67	47.75	5.53	0.00
	8	6.10	20.28	64.88	8.74	0.00
	9	5.43	21.21	65.06	8.15	0.15
	10	4.05	23.61	56.84	15.51	0.00
	11	4.81	22.82	65.24	7.13	0.00
	12	3.01	33.15	61.42	2.41	0.00
	13	2.43	29.30	52.06	15.92	0.29
	14	3.68	40.37	33.66	22.19	0.09
	15	2.22	33.94	38.78	25.06	0.00
Варіант2	1	0.59	76.11	20.83	2.48	0.00
	2	0.59	41.12	50.88	7.41	0.00
	3	4.29	17.10	75.23	3.08	0.30
	4	0.90	41.33	57.14	0.57	0.05
	5	1.78	39.31	58.84	0.06	0.00
	6	0.76	39.93	59.31	0.00	0.00
	7	3.59	41.43	51.91	3.07	0.00
	8	3.96	37.08	46.93	12.03	0.00
	9	4.90	47.85	29.03	18.22	0.00
	10	4.66	50.34	27.36	17.64	0.00
	11	3.74	42.93	48.13	5.20	0.00
	12	6.23	19.20	66.00	8.56	0.00
	13	6.27	26.37	61.63	5.73	0.00
	14	6.80	23.12	53.63	16.45	0.00
	15	7.06	17.06	69.48	6.41	0.00

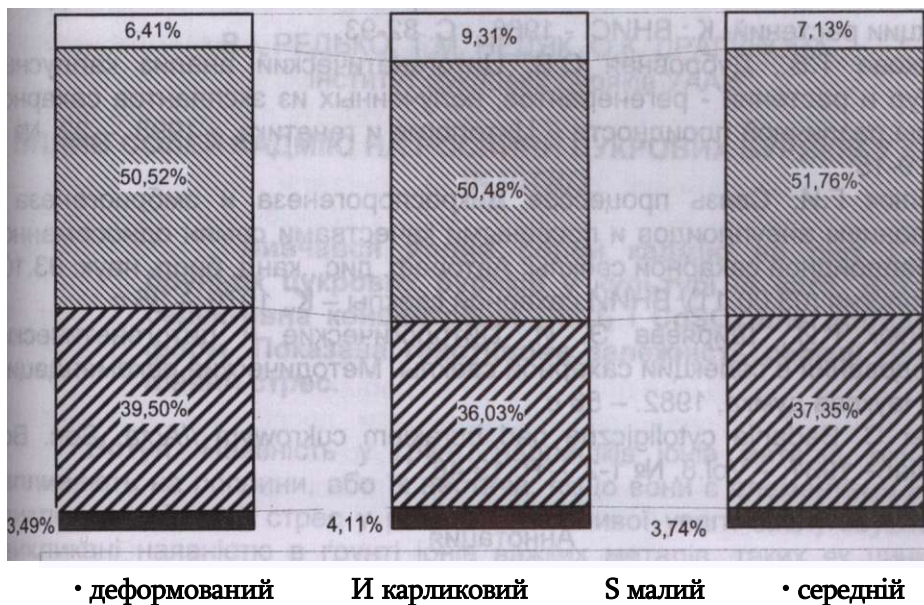


Рис. Співвідношення кількості пилку різних розмірів у варіантах дослідів.

Висновки. Умови культивування *in vitro* мікроклонів диплоїдних багатонасінних запилювачів цукрових буряків та колхидин в концентрації 0.05 суттєво не впливають на процеси мікроспорогенезу, не змінюють співвідношення пилоквіткових зерен за величиною та типом пилку. Для переведення диплоїдних запилювачів на тетраплоїдний рівень необхідно відбирати рослини з високими показниками фертильності та життєздатності пилку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Зайковська Н.Е. Цитоплазматична чоловіча стерильність у цукрового буряка // Укр. бот. ж. - Т. XX. - №5. - 1963. - С. 20-31.
2. Зайковская Н.Э., Ярмолюк Г.И. Некоторые особенности развития пыльцы у тетраплоидной сахарной свеклы // Основные выводы научно - исследовательских работ по сахарной свекле за 1966г. - К.: ВНИС. - 1966, Т. 1. - С. 49-52.
3. Панина Е.Б. Мейоз и микроспорогенез у полиплоидной сахарной свеклы // Укр. бот. ж. - Т. XXI, - № 6. - 1964. - С. 22-38.
4. Снедекор Дж. У. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. - М.: Сельхозгиз, 1961. - 503 с.
5. Хасанова М.Р., Чередыева В.С., Савоськин И.П. Получение и изучение тетраплоидных форм односемянной сахарной свеклы Бийская 01426 и

- многосемянной Бийская 074 // Экспериментальная полиплоидия в селекции растений- К.: ВНИС. - 1966. - С. 82-93.
6. Чугункова Т.В., Дубровная О.В. Цитогенетический анализ каллусных культур и растений - регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной пloidности // Цитология и генетика. - 1998. - 32, №4. - С. 9-15.
 7. Ярмолюк Г.И. Связь процессов микроспорогенеза и эмбриогенеза с появлением анеуплоидов и посевными качествами семян односемянной • тетраплоидной сахарной свеклы: Автореф. дис...канд. биол. наук: 03.104 I - цитология (03.00.11)/ ВНИИ сахарной свеклы - К., 1970. - 35 с.
 8. Ярмолюк Г.И., Ширяева Э. И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. Методические рекомендации. - К.: Наукова думка, 1982. - 56 с.
 9. Prywer S. Badania cytologiczne nad burakiem cukrowym //Acta. Soc. Bot. Polonial. -1931. - Vol.8, № 1-2. - P. 19-46.

Аннотация

УДК 633.63:631.52

Качество пыльцы многосемянной сахарной свеклы в зависимости от условий культивирования *in vitro*

Н.С. Вех, В.И. Редько, Н.В. Белоус

Проведено изучение влияния условий культивирования *in vitro* на тип пыльцы микроклонов диплоидной сахарной свеклы в условиях *in vivo*. Установлено, что условия культивирования *in vitro* и колхицин существенно не влияют на микроспорогенез диплоидных растений и не меняют тип пыльцы исходного селекционного материала.

Annotation

UDC 633.63:631.52

Quality of multigerm sugar beet pollen depending on conditions of growing *in vitro*

N. Bekh, V. Redko, N. Bilous

Effect of growing conditions *in vitro* on the pollen type of microclones of diploid sugar beet under *in vivo* conditions was studied. It was established that conditions *in vitro* of growing and colchicine have no significant effect on microsporogenesis of diploid plants and do not change the type of pollen of initial breeding material.