

-
4. Жуков М.С., Грабовський Н.П. Изменение основных свойств почвы под влиянием тридцатилетнего применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов. – М.: 1968. – С. 140–164.
 5. Носко Б.С., Дуда Г.Г., Непочатов О.П. Вплив добрив на зміну основних показників родючості чорноземних ґрунтів Лівобережного Лісостепу в умовах локального агроекологічного моніторингу // Агрохімія і ґрунтознавство. Міжвідомчий темат. наук. зб. – Харків, вид-во "Аграрна наука", 1998. – С. 41–43.
 6. Сапожников П.М., Уткаева В.Ф., Аbruкова В.В. Структурно-механические и гидрофизические свойства чернозема типичного при применении удобрений // Почвоведение. – 1988. – № 10. – С. 67–74.
 7. Лебедь Є.М., Андрусенко І.І., Пабат І.А. Сівозміни при інтенсивному землеробстві. – К.: Урожай, 1992. – 224 с.
 8. Недвига М.В., Галасун Ю.П. Динаміка структурно-агрегатного стану чорнозему опідзоленого за тривалого застосування добрив у сівозміні // Зб. наук. праць Уманського ДАУ.– Умань. – 2003. Вип. 57. – С. 11–620.
 9. Королев В.А., Стахурлова Л.Д. Изменение основных показателей плодородия выщелоченных черноземов под влиянием удобрений // Почвоведение. – 2004. – № 5.
 10. Галасун Ю.П. Вплив тривалого застосування різних систем удобрення в польовій сівозміні на водостійкість структурних агрегатів// Матеріали конференції молодих вчених. –Умань, 2004. – С. 41–43.
 11. Николаева И.Н. Изменение физических свойств дерново-подзолистой почвы при внесении высоких доз удобрений // Почвоведение. 1987. – № 2. – С. 52–59.
-

УДК 631.52:581.143.5:633:78

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО ГАПЛОЇДНОГО ТА ГОМОДИПЛОЇДНОГО МАТЕРІАЛУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО З ВИКОРИСТАННЯМ ГІНОГЕНЕТИЧНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ

**Л.О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук
Я.С. РЯБОВОЛ, аспірант**

*Наведено результати досліджень з вивчення гіногенетичної стимуляції рослин буряка цукрового. Встановлено, що опилення рослини-донора експланта пилком виду *Beta webbiana* L. стимулює процеси формування вихідних гаплоїдних і гомодиплоїдних форм буряка у культурі *in vitro*.*

Гаплоїдія є одним із перспективних методів отримання вихідних гомозиготних ліній для гетерозисної селекції буряка. Найефективнішим способом отримання гаплоїдних і гомодиплоїдних форм є використання біотехнологічних методів.

Гаплоїдний матеріал у культурі *in vitro* можна отримати при культивуванні на живильному середовищі пилку, пиляків і незапліднених насінневих зачатків [1–5].

У наших дослідженнях для отримання гаплоїдних і гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового використовували культуру незапліднених насінневих зачатків.

Низький вихід гаплоїдних матеріалів буряка цукрового, а саме 2,6 % за використання генетичних і біотехнологічних методів їх отримання, потребує розробки

нових ефективних прийомів підвищення виходу гаплоїдних структур [6]. Окрім того, вихід гаплоїдного матеріалу є генетично обумовленим фактором [7].

Одним із дієвих способів підвищення виходу гаплоїдів є гіногенетична стимуляція. Гіногенез — одна із форм апоміксісу, що забезпечує розвиток зародка з незаплідненої яйцеклітини при стимуляції спермія. Метод індукції гіногенезу в культурі насінневих зачатків і зав'язей є ефективним методом одержання гаплоїдних і гомодиплоїдних рослин. Успішні дослідження з одержання гаплоїдних матеріалів ячменю, пшениці, проса, буряка цукрового, тютюну дозволяють рекомендувати дану технологію для отримання гомозиготних форм у селекційних схемах [8–11]. На сьогодні метод одержання гіпогенних гаплоїдів застосовується в практиці вирощування рису, соняшнику, цибулі, гербери [12].

У попередніх досліджах нами відпрацьовані перспективні технологічні схеми отримання гаплоїдів шляхом поєднання культури ізольованих незапліднених насінневих зачатків та прийомів стимулювання: 1 – затримання з опиленням; 2 – опилення рослини-донора експлантів опроміненним пилком [13, 14].

Проведені дослідження показали, що виділення насінневих зачатків на 7–9-тий день цвітіння квітки підвищує вихід гаплоїдних матеріалів до 16,2 %, диплоїдних — 4,4% [14]. За використання генетичних маркерів і розроблених способів візуальної ідентифікації гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів у досліджах, із загальної кількості отриманих диплоїдів, виділяли до 1,8% спонтанно диплоїдизованих гаплоїдів [15–17].

При опиленні рослини-донора насінневих зачатків опроміненним пилком (доза опромінення летальна) частка гаплоїдних проростків підвищувався з 0,9% (контрольний варіант — донорні рослини не опиливали) до 9,2%, диплоїдних — до 2,3 %, з яких спонтанно диплоїдизованих було 1,0 % [14].

Відомі прийоми стимулювання гаплоїдії шляхом запилення рослин буряка цукрового пилком виду *B. webbiana* L., *B. procumbens* L. Із загальної кількості отриманих матеріалів виділяли від 0,03 % до 0,4 % форм з гаплоїдним набором хромосом [18].

Методика досліджень. Для підвищення виходу гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового у своїх досліджах ми поєднали культуру *in vitro* ізольованих насінневих зачатків та прийому стимулювання — опилення донорного матеріалу пилком виду *B. webbiana* L.

Пилок даного виду не здатний запліднювати рослини виду *B. vulgaris* L., проте, гормонально впливає на яйцеклітину та центральне ядро зародкового мішка, пробуджуючи їх до розвитку [19].

Пилком дикого типу запилювали дослідні рослини буряка цукрового у період цвітіння. Попередньо відмічали час відкриття квіток. Опилення проводили вручну тричі. Інтервал обробки — дві доби.

Підготовлені таким чином рослини були донорами насінневих зачатків для введення в культуру *in vitro*. У контрольному варіанті насіннебруньки виділяли з бутонів.

Щоб спростити відбір гаплоїдних та монодиплоїдних форм використовували гетерозиготний за маркерною ознакою донорний матеріал.

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень доведено, що ген забарвлення гіпокотіля *R* може бути ефективним маркером для відбору отриманих з насінневих зачатків в ізольованій культурі гаплоїдних і спонтанно диплоїдизованих матеріалів, так як його дія проявляється на ранній стадії розвитку насінневого зачатку

[15–17]. Окрім того встановлено, що під час регенерації рослин з калюсу, отриманого із насіннебруньок, спостерігається ідентичний ефект.

Спрощення відбору досягається тим, що серед сформованих структур за маркерною (рецесивною) ознакою виділяють гаплоїдні та гомодиплоїдні рослини, що в своєму генотипі відповідно мають гени (*r*, *rr*).

Плоїдність сформованих структур визначали за допомогою цитологічного аналізу.

У процесі досліджень було отримано наступні результати (табл. 1):

1. Кількість сформованих структур з насінневих зачатків при запиленні донорних рослин буряка цукрового пилком *B. webbiana* L.

Варіант досліджу (фактор А)	Генотип (фактор В)	Кількість висаджених насінневих зачатків, шт.	Сформовані структури							
			всього		калюс		проростки			
			шт.	%	шт.	%	гаплоїди		диплоїди	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Рослина-донор без запилення (контроль)	105/4	200	12	6,0	8	4,0	3	1,5	1	0,5
	105/9	280	22	7,9	17	6,1	4	1,4	1	0,4
	105/19	322	16	4,9	13	4,0	2	0,6	1	0,3
	230/9	235	20	8,5	16	6,8	2	0,8	2	0,8
	230/14	279	19	6,8	15	5,4	3	1,0	1	0,4
Запилення донорного матеріалу пилком <i>B. webbiana</i> L.	105/4	200	66	33,0	36	18,0	18	9,0	12	6,0
	105/9	746	263	35,2	172	23,1	61	8,2	30	4,0
	105/19	831	246	29,6	157	18,9	50	6,0	39	4,7
	230/9	706	228	32,3	146	20,7	52	7,4	34	4,8
	230/14	540	179	33,1	108	20,0	44	8,1	33	6,1
<i>HIP₀₁</i>		фактору А		1,2		0,7		0,3		0,2
		фактору В		1,1		1,3		0,4		0,3
		взаємодії АВ		2,2		1,7		0,7		0,5

– у контрольному варіанті кількість сформованих структур з насінневих зачатків у середньому склала 6,9%, з яких 5,5% — калюс, 1,0% — гаплоїдні та 0,5% диплоїдні проростки;

– у дослідному варіанті отримали достовірно вищу частку формувань: 20,7% висаджених насіннебруньок регенерували калюсну тканину, 7,4% — гаплоїдні та 4,8% — диплоїдні проростки буряка цукрового.

Проростки в ізолюваній культурі формувалися через три–чотири тижні культивування насінневих зачатків на живильному середовищі.

Калюсна тканина, яка мала розпушену консистенція та світло-зелений або жовтувато-коричневий колір, утворювалась через чотири–п'ять тижнів культивування. Після пересаджування на регенераційні середовища спостерігали морфогенез калюсної біомаси, який характеризувався активною проліферацією клітин та формуванням мікропагонів у зоні інтенсивного наростання калюсу.

Використання прийомів стимулювання при культивуванні насіннебруньок у

культури *in vitro* не впливало на зміну морфологічних ознак сформованих структур.

У процесі культивування насінневих зачатків в ізольованій культурі отримали рослинні матеріали, які відрізнялись за маркерними ознаками. Отримані проростки різнилились фенотипово і мали червоне або біле забарвлення гіпокотіля. Окрім того, частина проростків мала гаплоїдну, а частина — диплоїдну природу (табл. 2).

2. Забарвлення гіпокотіля проростків у досліді при запиленні рослини-донора експланта пилком *V. webbiana* L.

Варіант досліді (фактор А)	Плоїдність проростків (фактор В)	Генотип (фактор С)	Кількість отриманих проростків, шт.	Забарвлення гіпокотіля проростків				
				біле		червоне		
				шт.	%	шт.	%	
Рослина-донор без запилення (контроль)	3 гаплоїдним набором хромосом	105/4	3	2	66,7	1	33,3	
		105/9	4	2	50,0	2	50,0	
		105/19	2	0	0,0	2	100	
		230/9	2	1	50,0	1	50,0	
		230/14	3	1	33,3	2	66,7	
	Проростки з диплоїдним набором хромосом	105/4	1	0	0,0	1	100	
		105/9	1	0	0,0	1	100	
		105/19	1	1	100	0	0,0	
		230/9	2	0	0,0	2	100	
		230/14	1	1	100	0	0,0	
Запилення донорного матеріалу пилком <i>V. webbiana</i> L.	Проростки з гаплоїдним набором хромосом	105/4	18	9	50,0	9	50,0	
		105/9	61	28	45,9	33	54,1	
		105/19	50	29	58,0	21	42,0	
		230/9	52	25	48,1	27	51,9	
		230/14	44	18	40,9	26	59,1	
	Проростки з диплоїдним набором хромосом	105/4	12	5	41,7	7	58,3	
		105/9	30	14	46,7	16	53,3	
		105/19	39	16	41,0	23	59,0	
		230/9	34	15	44,1	19	55,9	
		230/14	33	15	45,5	18	54,5	
		<i>фактору А</i>			1,5	1,8		
		<i>фактору В</i>			1,5	1,8		
		<i>фактору С</i>			1,4	2,2		
<i>взаємодії АВ</i>			2,2	3,5				
<i>взаємодії АС</i>			2,4	3,7				
<i>взаємодії ВС</i>			2,4	3,7				
<i>взаємодії АВС</i>			3,6	4,1				

Рослини з доміантними ознаками можуть бути гаплоїдними або диплоїдними, отриманими з диплоїдних клітин материнської рослини-донора. Їх можна розділити за допомогою цитологічного аналізу. Рецесивні ознаки успадковують рослини з гаплоїдним набором хромосом, які формувались з гаплоїдних клітин насінневого зачатку. Тому отримавши проростки, можна відразу візуально виділити частину гаплоїдних рослин, не звертаючись до цитологічного методу дослідження [16]. Використання даного способу спрощує і прискорює процес відбору гаплоїдних матеріалів.

Разом з тим наші дослідження були направлені на отримання та відбір спонтанно диплоїдизованих гомодиплоїдних тканин при використанні донорних гетерозиготних матеріалів за геном забарвлення гіпокотилу R.

На основі цитологічного аналізу матеріалів та аналізу забарвлення гіпокотилу отриманих проростків встановлено, що частка виходу гаплоїдних рослин з рецесивною ознакою приблизно дорівнює виходу рослин з доміантною ознакою за забарвленням гіпокотилу незалежно від варіанту. Проте частка диплоїдних рослин з червоним забарвленням гіпокотилу вищий, аніж з диплоїдним набором хромосом та білим гіпокотилем (рис. 1).

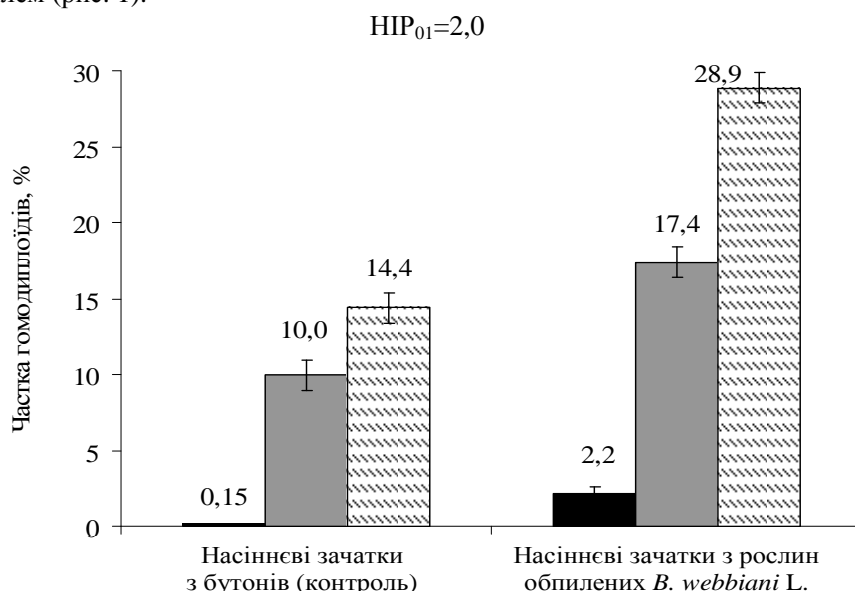


Рис. 1. Вихід гомодиплоїдів від загальної кількості:

- – висаджених насінневих зачатків;
- – отриманих проростків;
- ▨ – отриманих гаплоїдів.

Згідно закону про розщеплення гетерозигот та успадкування генів у потомстві можна зробити висновок, що проростки з диплоїдним набором хромосом і доміантною ознакою (червоне забарвлення гіпокотилу) можуть бути спонтанно диплоїдизованими гаплоїдами або проростками, що сформувались випадково з клітин материнської гетерозиготної тканини. Ці проростки не можна розділити між собою, тому їх бракують. Рослини з диплоїдним набором хромосом і рецесивною ознакою (біле забарвлення гіпокотилу) — це спонтанно диплоїдизовані гаплоїди [17].

У контрольному варіанті досліді вихід проростків з білим гіпокотилем і диплоїдним набором хромосом у середньому за генотипами склав 0,15 % від загальної кількості висаджених насінневих зачатків та 10,0 % — від загальної кількості отриманих проростків.

У дослідному варіанті при запиленні донорних рослин пилкою *B. webbiana* L. вихід гомодиплоїдів був достовірно вищим і склав 2,2 % від загальної кількості висаджених насінневих зачатків та 17,3 % — від загальної кількості отриманих проростків.

У контрольному варіанті досліді вихід спонтанно диплоїдизованих гаплоїдів від кількості отриманих гаплоїдів у середньому за генотипами склав 14,3 %, а в дослідному варіанті — 28,9 %. Проте не виключено, що така ж кількість гомодиплоїдів з домінантним забарвленням гіпокотиля бракується, що пов'язано з неможливістю фенотипової ідентифікації їх щодо рослин, отриманих із клітин материнської тканини донора експлантів.

Аналізуючи серію дослідів зі стимуляції гаплоїдії, можна зробити висновок, що гіногенез у поєднанні з культурою ізольованих насінневих зачатків є ефективним прийомом стимуляції гаплоїдії.

При використанні прийомів стимулювання — опилення донорного матеріалу опроміненим пилкою та пилкою *B. webbiana* L. вихід гаплоїдів склав 9,1 % та 7,4 % відповідно від загальної кількості висаджених насіннебруньок, що є достовірно вищим, ніж у контрольному варіанті (1,1%) (табл. 3, 4).

3. Вихід проростків від загальної кількості висаджених насінневих зачатків

Варіант досліді	Кількість висаджених насінневих зачатків, шт.	Гаплоїди, %	Гомодиплоїди, %
Рослина-донор без запилення (контроль)	1316	1,1±0,4	0,1±0,1
Запилення донорного матеріалу пилкою <i>B. webbiana</i> L.	3023	7,7±1,3	2,2±0,4
Запилення донорного матеріалу опроміненим пилкою	2670	9,1±0,5	1,0±0,2

Окрім того, даний прийом впливає і на спонтанну диплоїдизацію гаплоїдного матеріалу, в результаті чого вихід гомодиплоїдів (тобто їх частини, що мають рецесивну маркерну ознаку) склав 1,0% при опиленні рослини донору експланта опроміненим пилкою та 2,2% при опиленні пилкою дикого типу, що є вищим, ніж у контрольному варіанті.

Необхідно зауважити і те, що при опиленні рослини-донору експлантів пилкою *B. webbiana* L. частка гомодиплоїдних форм була достовірно вищою, порівняно з варіантом опилення рослин опроміненим пилкою, і склав у середньому за генотипами 2,2 % від загальної кількості висаджених насінневих зачатків та 17,4 % від загальної кількості отриманих проростків.

Даний факт ми пов'язуємо з вищою біологічною активністю пилкового зерна без опромінення, що стимулює спонтанну диплоїдизацію, індукуючи переведення гаплоїдного матеріалу на природний диплоїдний збалансований рівень. Окрім того для опромінення матеріалу необхідно спеціальне обладнання.

4. Вихід гомодиплоїдів від загальної кількості отриманих проростків

Варіант Дослід (фактор А)	Генотип (фактор В)	Кількість отриманих проростків, шт.	Гомодиплоїди	
			шт.	%
Рослина-донор без запилення (контроль)	105/4	4	0	0,0
	105/9	5	0	0,0
	105/19	3	1	33,3
	230/9	4	0	0,0
	230/14	4	1	25,0
	Σ	20	2	10,0
Запилення донорного матеріалу пишком <i>B. webbiana</i> L.	105/4	30	5	16,7
	105/9	91	14	15,4
	105/19	89	16	17,9
	230/9	86	15	17,4
	230/14	77	15	19,5
	Σ	373	65	17,4
Запилення донорного матеріалу опроміненим пишком	105/4	57	5	8,8
	105/9	53	5	9,4
	105/19	48	4	8,3
	230/9	70	6	8,5
	230/14	74	7	9,5
	Σ	302	27	8,9
<i>НІР₀₁</i>	<i>фактору А</i>			1,4
	<i>фактору В</i>			1,1
	<i>взаємодії АВ</i>			2,0

Отримані таким методом гомодиплоїдні рослини можуть використовуватись у селекції буряка цукрового, як вихідний гомозиготний матеріал. Такі прийоми стимулювання скорочують затрати праці, часу та коштів на диплоїдизацію.

Висновок. Гіногенез у поєднанні з культурою ізольованих насінневих зачатків є ефективним прийомом створення вихідних гаплоїдних та гомозиготних форм буряку. Розроблено спосіб стимуляції гаплоїдії буряку цукрового, що дає змогу підвищити вихід гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів за рахунок поєднання культури ізольованих насінневих зачатків з прийомом гіногенетичного стимулювання — запилення рослини-донора експлантів пишком рослин виду *Beta webbiana* L. Застосування даного способу дозволяє підвищити вихід гаплоїдів до 7,4%, а спонтанно диплоїдизованого матеріалу — до 2,2%.

Список використаних джерел

1. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – С. 223–240.

2. Подвижина О.А. Путь морфогенеза при индукции гаплоидии *in vitro* у сахарной свеклы / О.А. Подвижина // Генетические основы эволюции и селекции: Материалы межрегион. конф. – Воронеж, 16–18 октября 2002 г. – С. 48–50.
3. Славова Й.В. Разработка методов вегетативного размножения и получения гаплоидов в культуре *in vitro* у сахарной свеклы: Автореф. дисс.... канд. с.-х. наук. – Пловдив, 1983. – 28 с.
4. Тивари Ш. Морфогенез в культуре пыльников и изолированных микроспор ячменя: Автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.00.12 / ТСХ. Акад. – М., 1980. – 24 с.
5. Anonymous A. Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. / A. Anonymous // Acta Genet. Sinica, 1975. – V. 1. – P. 138–143.
6. Рябовол Л.О. Вплив генотипу на вихід гаплоїдних матеріалів цукрових буряків / Л.О. Рябовол, А.О. Манько, О.А. Сливченко // Зб. наук. пр. УСГА. – Умань, 2000. – С. 207–210.
7. Рябовол Л.О. Вплив рівня плідності донорного матеріалу цукрових буряків на вихід, ріст і розвиток макроструктур з насінневих зачатків / Л.О. Рябовол, Ф.М. Парій // Зб. наук. пр. «Вісник Причорномор'я». – Одеса, 2002. – С. 28–31.
8. Кашин А.С. Гаметофитный апомиксис и проблема хромосомной нестабильности геномов у покрытосеменных / А.С. Кашин // Генетика. – 1999. – Т. 35. – № 8. – С. 1041–1053.
9. Кашин А.С. Активация мегагамет и регуляция эмбриогенеза у неоплодотворенных завязей проса *in vitro* / А.С. Кашин, Е.А. Блюднева, М.А. Силкин // Физиология растений – 2000. – Т. 47, – № 2. – С. 291–301.
10. Ницше В. Гаплоиды в селекции растений / В. Ницше, Г. Вензель. – М.: Колос, 1980. – 128 с.
11. Rode A. Gametoclonal variation detected in the nuclear ribosomal DNA from doubled haploid lines of a spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Cesar) / A. Rode, C. Hartmann, A. Benslimane, E. Picard, F. Quetier // Theor. Appl. Genet. – 1987. – V. 74, № 1. – P. 31–37.
12. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах – К.: Логос, 2005. – 730 с.
13. Рябовол Л.О. Повышение выхода гаплоидов у сахарной свеклы / Л.О. Рябовол, Ф.Н. Парій // Селекция и семеноводство. – 1992. – № 6. – С. 30.
14. Рябовол Л.О. Разработка способов получения гаплоидов и дигаплоидов сахарной свеклы, как исходного материала для селекционного процесса: Автореф. дисс.... канд. с.-х. наук. – Киев, 1994. – 24 с.
15. Парій Ф.М. Патент на винахід 20959А (Україна). Спосіб одержання гаплоїдів рослин / Ф.Н. Парій, Л.О. Рябовол. – 1997.
16. Парій Ф.М. Патент на винахід 21237А (Україна). Спосіб відбору гаплоїдних рослин / Ф.Н. Парій, Л.О. Рябовол, Т.А. Небикова. – 1997а.
17. Парій Ф.М. Патент на винахід 21403А (Україна). Спосіб одержання гомозиготних рослин / Ф.Н. Парій, Л.О. Рябовол, Т.А. Небикова. – 1997б.
18. Melzer R. Nutzung vor Inzuehtlinien in der Zuckerrubenzuechtung / R. Melzer, H.O. Behrens // Fortschrittsberichte für die Landwirtschaft und Nahrungsgüterwirtschaft. – 1980. – Bd. 18, N 4. – S. 1–24
19. Красочкин В.Т. Корнеплодные растения / В.Т. Красочкин, Б.И. Сечкарёв, Л.В. Сазонова, Л.И. Левандовская // Культурная флора СССР. – Ленинград: Колос, 1971. – С. 184.

*Изучено процессы гиногенетической стимуляции для получения исходного гаплоидного и гомодиплоидного материала свёклы сахарной в изолированной культуре. Установлено, что опыление растерия-донора экпланта пыльцой вида *Beta webbiana* L. позволяет увеличить выход гаплоидов до 7,4 %, а гомодиплоидов до 2,2%.*

*The processes of gynogenetic stimulation for preparation of haploid and homodiploid material of sugar beets in the isolated culture are studied. It is established that fertilization of the plant-donor explant with pollen of the variety *Beta webbiana* L. makes it possible to increase the haploidy yield to 7,4% and homodiploidy yield to 2,2%.*