

## ВИКОРИСТАННЯ ГІНОГЕНЕЗУ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДНОГО ТА ГОМОДИПЛОЇДНОГО МАТЕРІАЛУ БУРЯКА ЦУКРОВОГО

**Л.О. РЯБОВОЛ**, доктор сільськогосподарських наук

**Я.С. РЯБОВОЛ**, аспірант\*

Уманський національний університет садівництва

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

**Ключові слова:** культура *in vitro*, гаплоїд, гомодиплоїд, гіногенез, маркерний ген забарвлення гіпокотилля R, буряк цукровий.

Перспективних методів отримання гомозиготних ліній для гетерозисної селекції буряка є гаплоїдія. Гаплоїдні матеріали можна використовувати не тільки для гомозиготизації з подальшим одержанням гібридів, а й для кількісного генетичного аналізу рослин, що включає вивчення взаємодії генів і генетичної мінливості, дослідження груп зчеплення, встановлення кількості генів, які діють на кількісні ознаки, а також локалізацію полігенів.

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

У наших дослідженнях для отримання гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового використовували культуру незапліднених насіннєвих зачатків.

Низький вихід гаплоїдних матеріалів буряка цукрового, а саме 2,6 % при використанні генетичних і біотехнологічних методів їх отримання, потребує розробки нових ефективних прийомів підвищення виходу гаплоїдних структур [6]. Окрім того, вихід гаплоїдного матеріалу — генетично зумовлений фактор [7]. Одним із дієвих способів підвищення виходу гаплоїдів є гіногенетична стимуляція. Гіногенез — одна із форм

апоміксису, що забезпечує розвиток зародка з незаплідненої яйцеклітини при стимуляції спермієм. Метод індукції

\*Науковий керівник — доктор біологічних наук Ф.М. Парій

гіногенезу в культурі насінневих зачатків і зав'язей є ефективним методом одержання гаплоїдних та гомодиплоїдних рослин. Успішні дослідження з одержання гаплоїдних матеріалів ячменю, пшениці, проса, буряка цукрового, тютюну дозволяють рекомендувати цю технологію для отримання гомозиготних форм у селекційних схемах [8–11]. Нині метод одержання гіногенних гаплоїдів застосовується в практиці вирощування рису, соняшнику, цибулі, гербери тощо [12].

У попередніх дослідках нами відпрацьовано перспективні технологічні схеми отримання гаплоїдів поєднанням культури ізольованих незапліднених насінневих зачатків та прийомів стимулювання: 1–затримання з опиленням; 2 – опилення рослини-донора експлантів опроміненим пилком [13, 14]. Проведені дослідження показали, що виділення насінневих зачатків на 7–9-й день цвітіння квітки підвищує вихід гаплоїдних матеріалів до 16,2 %, диплоїдних — до 4,4 % [14]. При використанні генетичних маркерів і розроблених способів візуальної ідентифікації гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів у дослідках із загальної кількості отриманих диплоїдів виділяли до 1,8 % спонтанно диплоїдизованих гаплоїдів [15–17].

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

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

**Метою досліджень** було підвищення виходу гаплоїдних і гомодиплоїдних форм буряка цукрового за використання гіногенетичної стимуляції та ізольованої культури насінневих зачатків.

**Методи досліджень.** Для підвищення виходу гаплоїдних та гомодиплоїдних матеріалів буряка цукрового поєднали культуру *in vitro* ізольованих насінневих зачатків та прийом стимулювання — опилення донорського матеріалу пилком виду *B. webbiana* L.

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

Пилком дикого виду запилювали дослідні рослини буряка цукрового в період цвітіння. Попередньо відмічали час відкриття квіток. Опилення проводили вручну тричі. Інтервал обробки — дві доби. Підготовлені таким чином рослини слугували донорами насінневих зачатків для введення в культуру *in vitro*. У контрольному варіанті насіннебруньки виділяли з бутонів.

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

**Результати досліджень.** Доведено, що ген забарвлення гіпокотилія *R* може слугувати ефективним маркером для добору отриманих з насінневих зачатків в ізольованій культурі гаплоїдних та спонтанно диплоїдизованих матеріалів, оскільки його дія проявляється на ранній стадії розвитку насінневого зачатку [15–17]. Окрім того встановлено, що при регенерації рослин з калюсу, отриманого із насіннебруньок, спостерігається ідентичний ефект.

Спрощення добору 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 отримано такі результати (табл. 1):

у контрольному варіанті кількість сформованих структур з насінневих

зачатків у середньому становила 6,9 %, з яких 5,5 % — калюс, 1,0 % — гаплоїдні та 0,5 % диплоїдні проростки;

у дослідному варіанті отримали достовірно вищий відсоток формувань: 20,7 % висаджених насіннебруньок регенерували калюсну тканину, 7,4 % — гаплоїдних та 4,8 % — диплоїдних проростків буряка цукрового.

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

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

Варіант дослідження (фактор А)	Генотип (фактор В)	Кількість висаджених насінневих зачатків, шт.	Сформовані структури							
			всього		калюс		проростки			
			шт.	%	шт.	%	гаплоїди		диплоїди	
						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>НІР<sub>01</sub></i>		фактора А		1,2		0,7		0,3		0,2
		фактора В		1,1		1,3		0,4		0,3
		взаємодії АВ		2,2		1,7		0,7		0,5

Калюсна тканина, яка мала розпушену консистенцію 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 культурі *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. Проростки різнилися за фенотипом і мали червоне або біле забарвлення гіпокотіля. Частина їх була гаплоїдною, а частина — диплоїдною природи (табл. 2).

Рослини з домінантними 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 формувалися з гаплоїдних клітин насінневого зачатку. Тому, з отриманих проростків без цитологічного дослідження можна відразу візуально виділити частину гаплоїдних рослин [16]. Використання цього способу спрощує і прискорює процес добору гаплоїдних матеріалів.

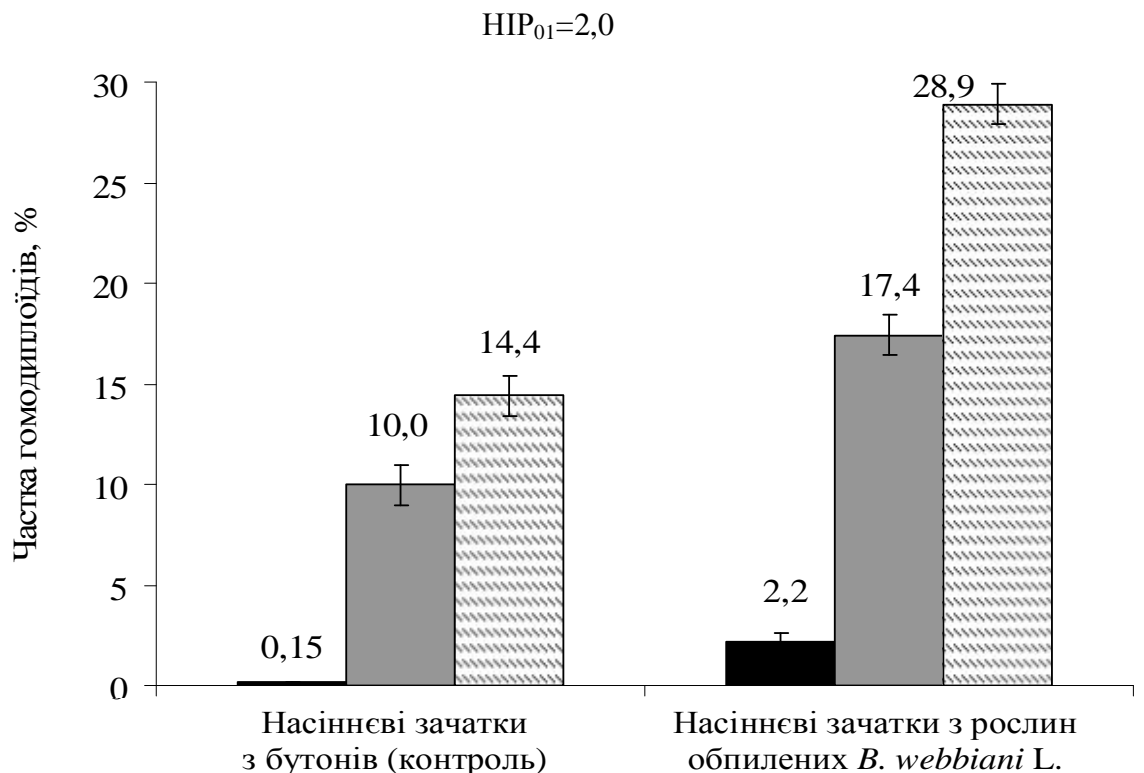
## 2. Забарвлення гіпокотіля проростків у досліді при запиленні рослини-донора експланта пилком *V. webbiana* L.

Варіант досліду (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)	З 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 донорського 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	105/4	12	5	41,7	7	58,3
		105/9	30	14	46,7	16	53,3

	набором хромосом	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
$HIR_{01}$	фактора А				1,5		1,8
	фактора В				1,5		1,8
	фактора С				1,4		2,2
	взаємодії АВ				2,2		3,5
	взаємодії АС				2,4		3,7
	взаємодії ВС				2,4		3,7
	взаємодії АВС				3,6		4,1

Разом з тим наші дослідження були спрямовані на отримання та добір спонтанно диплоїдизованих гомодиплоїдних тканин при використанні донорських гетерозиготних матеріалів за геном забарвлення гіпокотилу  $R$ .

На основі цитологічного аналізу матеріалів та аналізу забарвлення гіпокотилу отриманих проростків встановлено, що відсоток гаплоїдних рослин з рецесивною ознакою і домінантною ознакою за забарвленням гіпокотилу приблизно однаковий незалежно від варіанта. Проте відсоток диплоїдних рослин з червоним забарвленням гіпокотилу вищий, ніж з диплоїдним набором хромосом та білим гіпокотилем (рисунок).



**Рис.** Вихід гомодиплоїдів від загальної кількості:

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

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

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

У дослідному варіанті при запиленні рослин-донорів пилком *B. webbiana* L. вихід гомодиплоїдів був достовірно вищим і становив 2,2 % від загальної кількості висаджених насінневих зачатків та 17,4 % — від загальної кількості отриманих проростків.

У контрольному варіанті досліду вихід спонтанно диплоїдизованих гаплоїдів від кількості отриманих гаплоїдів у середньому за генотипами становить 14,4 %, а в дослідному варіанті — 28,9 %. Проте не виключено, що така сама кількість гомодиплоїдів з домінантним забарвленням гіпокотіля бракується, що пов'язано з неможливістю фенотипової ідентифікації їх щодо рослин, отриманих із клітин материнської тканини донора експлантів.

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.** Розроблено спосіб стимуляції гаплоїдії буряка 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 пилком рослин виду *Beta webbiana* L. Застосування цього способу дозволяє підвищити вихід гаплоїдів до 7,4 %, а спонтанно диплоїдизованого матеріалу — до 2,2 %.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Поведение пыльников пшеницы и ржи в изолированной культуре / [Б.А. Левенко, Г.Н. Юркова, В.А. Кунах, В.С. Легейда ] Экспериментальная генетика растений. – К.: Наукова думка, 1977. – С. 123–130.
2. Подвигина О.А. Путь морфогенеза при индукции гаплоидии *in vitro* у сахарной свеклы / О.А. Подвигина // Генетические основы эволюции и селекции: Материалы межрегион. конф. – Воронеж, 16–18 октября 2002г. —Воронеж: ВНИИСС, 2002. – С. 48–50.
3. Славова Й.В. Разработка методов вегетативного размножения и получения гаплоидов в культуре *in vitro* у сахарной свеклы: автореф. дис. на соискание научн. степени канд. с.-х. наук: спец. 06.01.05 «Селекция и семеноводство» / Й.В. Славова – Пловдив, 1983. – 28 с.
4. Тивари Ш. Морфогенез в культуре пыльников и изолированных микроспор ячменя: автореф. дис. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология» / Ш. Тивари – 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. – Умань: УСГА, 2000. – С. 207–210.
7. Рябовол Л.О. Вплив рівня плоїдності 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. 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, [et al] // Theor. Appl. Genet. – 1987. – V. 74, № 1. –



Р. 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. Парий // 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...на соиск. ученой степени канд. с.-х. наук: спец. 06.01.05 «Селекция растений» / Л.О. Рябовол – К., 1994. – 24 с.

15. Парий Ф.М. Патент на винахід 20959А ( Україна ). Спосіб одержання гаплоїдів рослин / Ф.Н. Парий, Л.О. Рябовол. – 1997.

16. Парий Ф.М. Патент на винахід 21237А (Україна). Спосіб відбору гаплоїдних рослин / Ф.Н. Парий, Л.О. Рябовол, Т.А. Небикова. – 1997а.

17. Парий Ф.М. Патент на винахід 21403А (Україна). Спосіб одержання гомозиготних рослин / Ф.Н. Парий, Л.О. Рябовол, Т.А. Небикова. – 1997б.

18. Melzer R. Nutzung vor Inzuchtlinien in der Zuckerrubenzucht / R. Melzer, H.O. Behrens // Fortschrittsberichte für die Landwirtschaft und Nahrungsgüterwirtschaft. – 1980. – Bd. 18, N4. – 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.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИНОГЕНЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНОГО И ГОМОДИПЛОИДНОГО МАТЕРИАЛА СВЕКЛЫ САХАРНОЙ

Л.О. Рябовол, Я.С. Рябовол

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

*Ключевые слова: культура in vitro, гаплоид, гомодиплоид, гиногенез, маркерный ген окраски гипокотыля R, свёкла сахарная.*

## THE USE OF GYNOGENESIS FOR PREPARATION OF HAPLOID AND HOMODIPLOID MATERIAL OF SUGAR BEETS

L.O. Riabovol, Y.S. Riabovol

*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%.*

*Key words: culture in vitro, haploidy, homodiploidy, gynogenesis, marker gene of color hypocotyl R, sugar beet.*

Л.О. Рябовол, Я.С. Рябовол  
Украина, 20305, Умань, Черкасская обл.,  
ул. Институтская 1, п/о «Софиевка-5»,  
e-mail: [usau@usau.ic.uk.ua](mailto:usau@usau.ic.uk.ua), телефони: 0995342730, 0995318368.