

В.В. Поліщук
Уманський національний університет садівництва

ПІДБІР ЕКСПЛАНТІВ ТА УМОВ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO* КОМПОНЕНТІВ ГІБРИДІВ БУРЯКУ ЦУКРОВОГО

Досліджено вплив умов вирощування донорного матеріалу на швидкість наростання біомаси *in vitro* вихідних форм гібридів буряку цукрового, вихід стерильних макроструктур, їх інфікованість та ефективність введення в культуру.

Вступ

Буряк цукровий — *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Doell convar. *saccharifera* (Alef.) Krass.), належить до роду *Beta* L., секції *Beta* (syn. *Vulgares* Ulbrich) родини *Amaranthaceae* Juss. (колишня *Chenopodiaceae* Vent.) [2, 8, 14]. Нині сировину для промислового виробництва цукру в світі отримують внаслідок вирощування лише двох культур: тростина цукрова (*Saccharum officinarum* L.), яка є провідною цукроносною рослиною в Бразилії, Індії Австралії, Кубі та деяких інших тропічних країнах, і буряк цукровий, що вирощується в регіонах з помірним і субтропічним кліматом. Основними країнами-виробниками буряку цукрового й бурякового цукру є Франція, США, Німеччина, Польща, Росія, Туреччина та Україна [8, 10, 12]. Хоча листовий буряк, що належить до іншого підвиду цього ж виду (*Beta vulgaris* ssp. *cicla* [L.] Alef.) було одомашнено як овочеву рослину ще в доісторичні часи, буряк цукровий є відносно новою сільськогосподарською культурою, що не культивувалась до початку 1800-х рр. [10], тобто його історія нараховує лише дещо більше 200 років. Однак завдяки цілеспрямованій селекції за цей, порівняно короткий час, вміст цукру в його коренеплодах зріс з 4–5 до 18, а у кращих генотипів до 20 відсотків [7]. При цьому після років стрімкого поліпшення врожайності й цукристості генотипів нових сортів і особливо гібридів буряку цукрового з середини минулого сторіччя настав період застою, коли валові збори коренеплодів зростали, а виробництво цукру не збільшувалось [6]. Однією з причин цього можна вважати вузьку генетичну базу зародкової плазми, що через короткий час окультурення і відповідно

за незначного впливу «народної селекції» залишило буряк цукровий з більш вузьким генофондом, ніж у інших перехреснозапилюваних сільськогосподарських культур [8, 10].

Нині це одна з основних технічних культур, яка займає провідне місце в структурі сільськогосподарського виробництва Лісостепу України. В Україні цукровий буряк висівають на площі близько одного млн. га при середній врожайності 3т/га. Це значно менша врожайність, ніж у провідних бурякосіючих державах з розвиненим аграрним сектором. Тому створення і впровадження у виробництво нових високопродуктивних гібридів, придатних для інтенсивних енергоощадних технологій [6, 7], адаптованих до умов середовища і потреб виробника, споживача й переробника, тобто підвищення загальної антропоадаптивності нині є найважливішим завданням вітчизняних селекціонерів. Йдеться про розвиток генетичних методів селекції (індукованого мутагенезу, усього спектру рекомбіногенезу, маніпуляцій на рівні геномів і окремих генів, технологій *in vitro* тощо), що значно розширюють можливості регулювання (аж до векторизування) генетичної мінливості [4, 9, 16]. Отже, вдосконалення антропоадаптивного потенціалу буряківництва в Україні відповідає потребам вітчизняного агропромислового виробництва і може бути досягнуто шляхом поєднання технологічного, селекційно-генетичного і організаційно-економічного компонентів адаптивного потенціалу галузі [4, 6].

Селекціонер буряку цукрового стикається з рядом специфічних труднощів зумовлених дворічним способом життя, перехресним запиленням, самонесумісністю тощо, які гальмують селекційний процес.

Тому розробка і вдосконалення способів прискореного розмноження рослинного матеріалу є одним із важливих селекційних завдань. Хоча публікації з питань запровадження технологій *in vitro* у селекційно-генетичні дослідження з'являються в Україні [1] і за кордоном у достатній кількості [3, 11, 13, 15, 16] низка питань щодо можливості розмноження компонентів гібридів буряку цукрового у біотехнологічних лабораторіях ще не з'ясовано. Насамперед потребує розв'язання проблема збереження і розмноження материнських компонентів гетерозисних гібридів буряку цукрового із застосуванням техніки *in vitro*, ефективність якої вже доведена на багатьох культурних рослинах [1, 3, 5, 13, 16, 17].

Експланти, які вводяться *in vitro*, виділяють з різних органів рослин (коренів, пагонів, листків, меристем тощо). Біологічний матеріал компонентів гібридів буряку цукрового повинен мати швидкі темпи наростання та розвитку. Сезон року і фаза розвитку маточних рослин буряку цукрового має важливе значення для добору експланту. Найбільш регенераційноздатним матеріалом є апікальна меристема рослин, у клітинах якої швидко проходять процеси метаболізму та поділу клітин. Окрім того, мікроклональне розмноження апікальних меристем забезпечує генетичну стабільність рослинного матеріалу [1, 3]. Прискорене вегетативне розмноження *in vitro* відібраних на провокаційних фонах унікальних рослин буряку цукрового набуває великого значення в зв'язку з поширенням у селекційних програмах рекурентного добору, без якого наразі неможливе створення гібридів на ЧС-основі (чоловічостерильній основі).

Досліди проводили з метою вивчення можливості масового вегетативного розмноження чоловічостерильних форм буряку цукрового у лабораторії мікроклонального розмноження, а саме з'ясування питань підготовки і підбору вихідного матеріалу як джерела експлантів та створення оптимальних умов для введення і проліферації стерильних генотипів *in vitro* з наступним індукуванням морфогенезу. Роботу виконували в лабораторії біотехнології кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва спільно з лабораторією біотехнології Інституту коренеплідних культур НААН України у 2010–2012 рр.

Матеріали та методи досліджень

За вихідний матеріал використано насіння чоловічостерильних форм буряку цукрового відібране

на провокаційному фоні при його пророщуванні за пониженої до $+10^{\circ}\text{C}$ температури. Це стійкі до «цвітущості» аналоги материнських компонентів пробних гібридів. За розробленою нами методикою, апробованою на кукурудзі, насіння вищезгаданих вихідних форм відбирали в кількості 100 насінин, ставили на пророщування у чашки Петрі в чотирьох повторностях. У першому варіанті рослинний матеріал пророщували на зволоженому дистильованою водою (вода) фільтрувальному папері у темнових умовах, у другому — на зволоженому фільтрувальному папері у світлових умовах, у третьому варіанті — на ґрунтовій суміші у темнових умовах, а у четвертому варіанті — на ґрунтовій суміші у світлових умовах. У першому і третьому варіанті насіння вихідних форм перед введенням *in vitro* пророщували в термостаті при температурі $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$. У другому і четвертому — в кімнаті при температурі $18\text{--}20^{\circ}\text{C}$. Вологість повітря в усіх варіантах була у межах $75\text{--}80\%$. Ґрунтова суміш включала $2/3$ ґрунту і $1/3$ піску.

Для зрізування апікальних меристем з рослинного матеріалу використовували пропарені при $180\text{--}200^{\circ}\text{C}$ інструменти — скальпель і пінцет. Процес стерилізації включав промивання рослинного матеріалу милом і стерильною водою $15\text{--}20$ хвилин, щоб з поверхні проростка змити грибково-бактеріальні інфекції. Для стерилізації використовували хлорамін з експозицією стерилізації 25 хвилин.

Зрізані зі стерилізованого матеріалу експланти вводили на крає (за рекогносцирувальними дослідженнями) живильне середовище приготовлене за прописом Гамборга і Евелега (B5) [18], яке було модифіковане нами сірчанокислим залізом ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) — $27,8$ мг/л з антиоксидантом Na_2EDTA — $37,3$ мг/л, а також додатково введеним Міо-інозитолом — 100 мг/л та збільшенням вмісту джерела вуглеводів до 27 г/л сахарози.

Результати досліджень та їх обговорення

Найкращі темпи проростання насіння у чашках Петрі виявились у варіанті досліду, де насіння чоловічостерильних компонентів гібридів буряку цукрового пророщували на зволоженому фільтрувальному папері у темнових умовах, а найгірші — у ґрунтовій суміші в темнових умовах. У першому варіанті кількість пророслих насінин становила на четвертий день 20 , на шостий — 26 , на десятий — 78 та 96 шт. на 15 день (рис. 1).

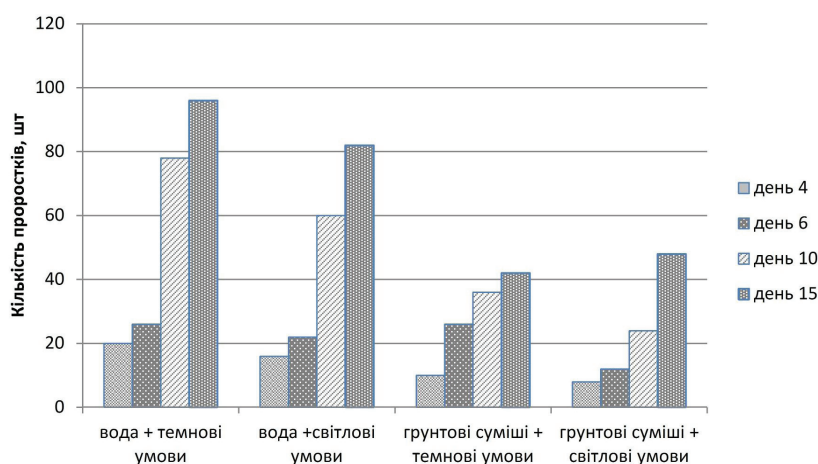


Рис. 1. Темпи проростання насіння чоловічостерильних компонентів гібридів буряку цукрового залежно від умов та термінів пророщування

Також з'ясувалось, що на зволоженому фільтрувальному папері у світлових умовах кількість пророслого насіння збільшувалась від 16 на четвертий до 22, 60, 88 шт., відповідно, на шостий, десятий та 15 день, що дещо нижче, ніж у темнових умовах, однак краще, ніж в обох варіантах з ґрунтовими сумішами. В обох варіантах з ґрунтовими сумішами з різним освітленням кількість пророслих насінин виявилась низькою. При цьому, дещо кращі результати зафіксовано у варіанті ґрунтова суміш + світлові умови. У варіанті досліді ґрунтова суміш + темнові умови отримано найменшу в досліді кількість пророслого насіння — 10, 26, 36 і 42 шт., відповідно

при тій самій кількості днів, що і у перших двох варіантах.

Велике значення для селекціонера на початковому етапі введення *in vitro* має отримання максимально можливої кількості стерильного вихідного матеріалу. Серед чинників, які суттєво впливають на вихід макроструктур є середовище та умови пророщування. Так, за умов пророщування насіння на водному середовищі в темнових умовах вихід стерильного матеріалу з чашок Петрі становив 95,5%. У цьому ж варіанті була найменша в досліді кількість інфікованого матеріалу після його введення *in vitro* — 21,6% (табл. 1).

1. Проліферативна активність буряку цукрового *in vitro* залежно від умов пророщування насіння

Варіант	Вихід стерильного біоматеріалу у чашках Петрі, %	Кількість інфікованого <i>in vitro</i> матеріалу, %	Ефективність введення, %	Проліферативна активність, %
1. Вода + темнові умови	95,5	21,6	59,3	89,2
2. Вода + світлові умови	88,3	38,9	49,2	72,1
3. Ґрунтова суміш + темнові умови	79,1	59,1	24,3	58,2
4. Ґрунтова суміш + світлові умови	62,6	75,8	16,8	34,3
<i>HIP</i> ₀₅	4,2	2,9	3,1	4,4

Проліферативна активність (кількість спроможного до швидкого розмноження матеріалу) при цьому досягла 89,2%. Ефективність введення *in vitro* у даному варіанті виявилась найвищою в досліді і становила 59,3%.

Схожі результати одержано за умов пророщування — вода + світлові умови, де вихід стерильного матеріалу з чашок Петрі становив 88,3% при ефективності введення *in vitro* — 49,2%. При цьому спостерігали певне збільшення кількості інфікованого

матеріалу *in vitro* — 38,9%. Однак загальна проліферативна активність у цьому варіанті була задовільною, хоча й нижчою на 17,1% при показникові $НІР_{05}=4,4\%$.

У варіантах, де були використані експланти, заготовлені з пророщеного в ґрунтових сумішах насіння, кількість інфікованого матеріалу після їх введення *in vitro* була істотно більша, ніж при використанні експлантів, заготовлених з насіння пророщеного на зволоженому фільтрувальному папері, як у темнових, так і в світлових умовах.

За кількістю інфікованого матеріалу найгіршим виявився варіант ґрунтового суміші + світлові умови — 75,8%, при найменшому виході стерильного матеріалу з чашок Петрі 62,6%. При цьому ефективність введення становила лише 16,8%, а загальна проліферативна активність 34,3%. У варіанті ґрунтового суміші + темнові зазначені показники були дещо вищими, однак жоден з варіантів пророщування на ґрунтових сумішах не може бути рекомендованим для використання пророщеного насіння за джерело експлантів.

Отримані результати загалом закономірні, адже ймовірність інфікування у чашках Петрі на порядок менша, однак паралельно гірші результати світлових умов при пророщуванні, як у чашках Петрі, так і в ґрунтових сумішах, ще потребують осмислення.

Важливість світла щодо результатів взаємодії рослина-патоген здається очевидною: світло впливає на реакцію господаря і вірулентність деяких патогенних мікроорганізмів. Очікується, що світлові умови мають підвищувати імунітет, проте експериментальні дані засвідчили протилежне. Можна припускати, що у темнових умовах пори менш відкриті, що зменшує ймовірність інфікування, однак вивчення цих питань може стати метою подальших досліджень.

Висновки

З'ясовано, що за темпами проростання насіння у чашках Петрі кращі результати одержано у варіанті, де насіння чоловічостерильних компонентів гібридів буряку цукрового пророщували на зволоженому фільтрувальному папері у темнових умовах, що дало змогу на 15 день отримати проростки у 96% насіння.

На етапі культивування *in vitro* апікальних меристем, заготовлених з матеріалу отриманого саме в цьому варіанті пророщування насіння, спостерігали найменший прояв бактеріально-грибкового інфікування, що дає підстави рекомендувати для підготовки рослинного матеріалу

у дослідах з мікроклонального розмноження буряку цукрового пророщування насіння на зволоженому фільтрувальному папері у темнових умовах.

Перелік посилань

1. Головка А. Е. Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) в культурі *in vitro*: регенерація, морфогенез і генетична трансформація: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.20 „Біотехнологія» / Андрій Єрастович Головка. — Київ, 2003. — 24 с.
2. Зосимович В. П. Дикіе види и происхождение культурной свеклы / В. П. Зосимович // Свекловодство. — К.: Госколхозиздат, 1940. — Т. 1. Биология, генетика и селекция сахарной свеклы. — С. 17–44.
3. Мишуткина Я. В. Изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на частоту регенерации растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* / Я. В. Мишуткина, А. К. Гапоненко // Генетика. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 210–218.
4. Опалко А. И. Проблема повышения антропоадаптивного потенциала культурных растений / А. И. Опалко, О. А. Опалко // Актуальные проблемы сохранения устойчивости живых систем: Мат. VIII Международ. науч. экологической конф. (Белгород, 27–29 сентября 2004 г.). — Белгород: изд-во БелГУ, 2004. — С. 152–153.
5. Поліщук В. В. Удосконалення методів мікроклонального розмноження кукурудзи / В. В. Поліщук, І. В. Ковальчук, Д. М. Адаменко, А. О. Яценко, В. А. Доронін // Зб. наук. праць Уманського НУС. — Вип. 75. — 2011. — С. 139–149.
6. Яценко А. О. Підвищення антропоадаптивного потенціалу — головне завдання селекції цукрового буряку / А. О. Яценко, А. І. Опалко // Генетичні ресурси для адаптивного рослинництва: мобілізація, інвентаризація, збереження, використання: Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції (Оброшино, 29 червня–1 липня 2005 року). — Оброшино, 2005. — С. 207–208.
7. Яценко А. О. Селекційно-генетичні основи вдосконалення адаптивного потенціалу буряківництва в Україні / А. О. Яценко, А. І. Опалко // Зб. наук. праць ЦДБ УААН. — К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. — Вип. 8. — С. 36–45.
8. Biancardi E. Sugar beet / Enrico Biancardi, J. Mitchell McGrath, Leonard W. Panella et al. // Root and tuber crops: Handbook of plant breeding [Ed. John E. Bradshaw]. — N.Y.: Springer, 2010. — Vol. 7, Ch. 6. — P. 173–219.
9. Bosemark N. O. Genetics and breeding / Nils Olof

- Bosemark // Sugar beet [ed. A. Philip Draycott].— Oxford: Wiley-Blackwell, 2006.— Ch. 4.— P. 50–88.
10. De Bock T.S.M. The genus *Beta*: domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding / Th.S.M. de Bock // Acta Horticulturae.— 1986.— Bock 182 (1).— P. 335–343.
 11. Dovzhenko A. Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): Shoot regeneration from callus and callus protoplasts / A. Dovzhenko, H.U. Koop // Planta.— 2003.— Vol. 217, № 3.— P. 374–381.
 12. Draycott A.P. Introduction / A. Philip Draycott // Sugar Beet [Ed. A. Philip Draycott].— Oxford: Wiley-Blackwell, 2006.— Ch. 1.— P. 1–8.
 13. Harm C.T. Clonal propagation *in vitro* of red beet (*Beta vulgaris* ssp.) by multiple adventitious shoot formation / Christian T. Harm, Ibrahim Baktir, Johann J. Oertli // Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC).— 1983.— Vol. 2, № 2.— P. 93–102.
 14. Lange W. Taxonomy and culonomy of beet (*Beta vulgaris* L.) / Wouter Lange, Willem A. Brandenburg, Theo S.M. De Bock // Botanical journal of the Linnean society.— 1999.— Vol. 130, № 1— P. 81–96.
 15. Levall W.L. Selection *in vitro* for UV-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris*) somaclones / Mats W. Levall, Janet F. Borman // Physiologia Plantarum.— 1993.— Vol. 88, № 1.— P. 37–43.
 16. Sliwinska E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level / Elwira Sliwinska, Ewelina Lukaszewska // Plant Science.— 2005.— Vol. 168, № 4.— P. 1067–1074.
 17. Zhang J. Highly efficient induction of sugar beet plant regeneration / J. Zhang, T. Li, X. Deng // Chinese journal of biotechnology.— 1997.— Vol. 13, № 3— P. 185–191.
 18. Gamburg O.L. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley / O.L. Gamburg, D.E. Eveleigh // Canadian Journal of Biochemistry.— 1968.— Vol. 46 № 5.— P. 417–421.

Рекомендує до друку
Опалко А. І.

ПОДБОР ЕКСПЛАНТОВ И УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ *IN VITRO* КОМПОНЕНТОВ ГИБРИДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

В. В. Полищук

Уманский национальный университет садоводства

Показано влияние условий выращивания донорного материала на темпы прорастания семян в культуре *in vitro* исходных материалов сахарной свеклы, выход стерильных макроструктур и эффективность введения в культуру.

COMPONENTS HYBRIDS SUGAR BEET EXPLANTS SELECTION AND *IN VITRO* CONDITIONS OF THEIR GROWING

V.V. Polishchuk

Uman national university of horticulture

The influence of donor material growing conditions on the rate of germination of *in vitro* biomass of initial hybrid forms of sugar beets, sterile macrostructures yield, their infestation and the effectiveness of introduction in culture were investigated.