

revealed. Their share of influence was 36.4 and 23.8%, respectively. High-yielding hybrid combinations of parent genotypes were selected. They are transferred to reproduction and testing for ecological plasticity. **Conclusions.** Genetic control of the yield sign in diallel hybrids is found based on the Hayman model. The influence of the combination ability of sugar beet pollinators was determined and the best parent genotype pairs were selected. According to the effects of specific gene interaction, the best combinations have been identified that can be used as sources of economically valuable traits.

Keywords: yield; pollinators; hybrids; sugar beet; general combination ability; specific combination ability.

Надійшла / Received 26.07.2021

Погоджено до друку / Accepted 11.08.2021

УДК 633.635.63.52

DOI: <https://doi.org/10.47414/np.29.2021.249934>

Вплив біотехнологічних параметрів на вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового

О. А. Зінченко¹, Н. С. Зацерковна¹, О. А. Українець², А. В. Заболотна³

¹Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна

²Уманський національний університет садівництва, вул. Інститутська, 1, м. Умань, Черкаська обл., 20305, Україна

³Уманський державний педагогічний університет імені Павла Тичини, вул. Садова 2, м. Умань, 20300, Україна

Мета. Визначити вплив біотехнологічних параметрів на вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового. **Методи.** Біотехнологічні, лабораторні, аналітичні, статистичні. **Результати.** Встановлено, що використання 35 % розчину гіпохлориту натрію за експозиції 40 хв дозволяє отримати від 73,13 до 75,83 % стерильних насінневих зачатків. Експозиція 50 хв дозволяє отримати стерильність вихідного матеріалу від 83,58 до 85,39 %. Стерилізація експлантів упродовж 60 хв дозволяє отримати стерильність вихідного матеріалу від 86,88 до 92,80 %. Частка інфікованих насінневих зачатків зі збільшенням експозиції знижувалась від 20,09–22,14 до 6,52–12,61 % залежно від селекційного номера буряка цукрового. Експериментально підтверджено, що вихід макроструктур істотно залежить від селекційного номера та виду середовища. Найбільше утворилось калюсу за використання живильного середовища Гамборга і Евелега – 10–80 % залежно від селекційного номера. За використання середовища Мурасіге і Скуга їх частка була 10–35 %. Слід відзначити, що в селекційного номера 07–181 за використання середовища Гамборга і Евелега утворилось калюсу у 80 % генотипів, а бруньок у 35 %. У селекційного номера 07–178 55 % генотипів утворили калюс, а бруньок 80 %. **Висновки.** В результаті проведених досліджень визначено вплив біотехнологічних параметрів (експозиція 35 % розчином гіпохлориту натрію, вид живильного середовища) на вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового. Оптимально проводити оброблення 35 % розчином гіпохлориту натрію впродовж 50–60 хв незалежно від селекційного номера буряка цукрового. Для отримання макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового необхідно використовувати живильне середовище Гамборга і Евелега для селекційних номерів 07–188, 07–178 і 07–181.

Ключові слова: біотехнологічні параметри; гіпохлорит натрію; буряк цукровий; живильне середовище; калюс.

Вступ

Властивості, які в сукупності забезпечують здатність до стійкого апоміктичного розмноження (утворення нередукованих яйцеклітин, нездатність яйцеклітин до запліднення, здатність яйцеклітин розвиватись без запліднення), отримали назву елементів регулярного апоміксису [1]. Рослини, які здатні до апоміктичного розмноження, повинні бути гомозиготними за трьома рецесивними генами *aaavcc* (ген *a* зумовлює виключення редукційного ділення, ген *v* – нездатність яйцеклітини до запліднення, ген *c* – контролює здатність незаплідненої яйцеклітини до ділення і утворення апоміктичних зародків) [2, 3].

Встановлено, що рослини, які мають сполучення генів *AAavcc*, *aaBVCC*, *AABVcc*, *aaBVcc* і т.д., виникають за схрещування апоміктичних форм з тими, які розмножуються статевим шляхом. Вони не відтворюють собі подібних у потомстві, бо є стерильними і не здатними до стійкого розмноження статевим та апоміктичним методом [4, 5].

Серед вихідної популяції, яка розмножується статевим шляхом, рідко з'являються рецесивні мутації, що контролюють окремі елементи регулярного апоміксису. В гетерозиготі ці мутації фенотипово не проявляються, проте, переходячи у гомозиготний стан, вони викликають виникнення безплідних або нестійких форм, які не залишають подібного собі потомства і швидко відсікаються природним добором. Проте в тих випадках, коли у результаті випадкових схрещувань виникають окремі рослини, які включають усі три рецесивні гени, що контролюють окремі елементи апоміксису в гомозиготному стані (*aaavcc*), стають здатними до регулярного апоміктичного розмноження [6]. В природі такі рослини можуть витримувати конкуренцію з формами, що розмножуються статевим шляхом. Якщо ж вони мають ще й гібридну силу, яку зберігають в своєму потомстві саме завдяки апоміктичному розмноженню, то порівняно з формами, які відтворюються статевим шляхом, мають суттєві переваги, широко розмножуються і дають початок новим апоміктичним різновидностям і навіть видам [7]. Проте в природі це явище відбувається дуже рідко. Завдяки використанню гаплоїдії у культурі *in vitro* та гібридизації можливе отримання гомозиготних ліній за трьома рецесивними генами. Отримання апоміктів експериментальним шляхом відкриває перспективу закріплення гетерозису, використовуючи регулярне апоміктичне розмноження, яке стане одним із основних методів селекції рослин [8].

Історично першими були проведені дослідження з отримання гаплоїдів цукрових буряків *in vitro* із пиляків, тобто культивуванням елементів чоловічої генеративної сфери. У культурі пиляків спостерігається калусогенез, а отримані регенеранти мають набір хромосом, який відповідає вихідній формі [9]. Буряк цукровий віднесено до типу рослин, пиляки яких важко диференціюються. Тому зусилля експериментаторів зосередились на індукції гаплоїдів із елементів жіночої генеративної сфери – зав'язь, насінневій зачаток. Цей шлях виявився результативнішим [10].

На відміну від андрогенезу, де успіх гарантований тільки за використання пиляків з одноядерними мікроспорами, жіночий гаметофіт здатен до новоутворень на всіх стадіях розвитку зародкового мішка. Проте найбільш висока частота утворення гаплоїдів спостерігалась на етапі переходу від восьмиядерного до повністю сформованого (7-клітинного) зародкового мішка [11]. Тому виявлення форм буряка цукрового з апоміктичним способом розмноження та вивчення механізму агамоспермії з використанням гаплоїдії у культурі *in vitro* є надзвичайно актуальним і дозволить створити нові селекційні матеріали, сприятиме довготривалому збереженню бажаних ознак, копіюванню цінних генотипів і відкріє перспективу закріплення ефекту гетерозису.

Мета досліджень – визначити вплив біотехнологічних параметрів на вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового.

Матеріали та методика досліджень

Дослідження проводили в умовах Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. Використовували рослини буряка цукрового на початку та в середині періоду цвітіння насінників. Було введено в культуру шість селекційних номерів диплоїдних ліній по

двадцять генотипів кожного, вилучені насінневі зачатки яких були висаджені на шести варіантах модифікованих середовищ Гамборга і Евелега та Мурасіге і Скуга.

Для ізолювання незапліднених насінневих зачатків обирали пагони другого порядку, які розміщували між листками зволоженого фільтрувального паперу та поміщали у поліетиленові пакети разом з етикеткою, де вказували селекційний номер, дату й час відбору матеріалу. Пакети з рослинним матеріалом зберігали у холодильнику до 8–10 діб за температури +4 °С. Для дезинфекції пагонів використовували 35 % розчин гіпохлориту натрію за різних експозицій. Після стерилізації рослинний матеріал промивали три рази стерильною дистильованою водою з інтервалом 15 хв.

Незапліднені насінневі зачатки і недозрілі зародки вилучали із закритих бутонів у стерильних умовах у ламінарній камері під збільшувальною лупою. Пінцетом відривали бутон від пагона, а потім голкою руйнували шар паренхімних клітин нижньої частини зав'язі й відокремлювали від неї насінневий зачаток. У разі пошкодження пиляків бутони вибраковували. Після кожного вилучення інструменти промивали спиртом та прожарювали на вогні спиртівки, що забезпечує запобігання небажаного запилення яйцеклітини і стерильність виконання операції. Ізольовані незапліднені насінневі зачатки, розмір яких становить 0,3–0,6 мм, на кінчику препарувальної голки вносили у пробірки і висаджували на косяки живильного середовища. Пробірки щільно закривали кришечками із алюмінієвої фольги і надписували селекційний номер і дату посадки [12, 13].

Результати досліджень

Встановлено, що використання 35 % розчину гіпохлориту натрію за експозиції 40 хв дозволяє отримати від 73,13 до 75,83 % стерильних насінневих зачатків (табл. 1). Експозиція 50 хв дозволяє отримати стерильність вихідного матеріалу від 83,58 до 85,39 %. Стерилізація експлантів упродовж 60 хв дозволяє отримати стерильність вихідного матеріалу від 86,88 до 92,80 %. Частка інфікованих насінневих зачатків зі збільшенням експозиції знижувалась від 20,09–22,14 до 6,52–12,61 % залежно від селекційного номера буряка цукрового.

Таблиця 1

Стерильність насінневих зачатків буряка цукрового залежно від експозиції в розчині гіпохлориту натрію

Селекційний номер	Експозиції, хв	Кількість посаджених насінневих зачатків, шт.	Насінневі зачатки, %	
			інфіковані	стерильні
07–178	40	596	22,14	77,86
	50	797	16,18	83,82
	60	1046	12,61	87,39
07–179	40	549	22,95	77,04
	50	363	22,93	79,06
	60	748	4,54	95,45
07–180	40	276	21,01	78,98
	50	283	16,25	83,74
	60	281	14,94	85,05
07–181	40	940	22,87	77,12
	50	1105	10,85	89,15
	60	920	6,52	93,48
07–182	40	337	21,66	78,34
	50	584	15,25	84,25
	60	1025	11,51	88,49
07–188	40	412	20,09	79,98
	50	518	14,20	85,80
	60	944	9,02	90,98
НІР _{0,05}		45	0,77	4,41

Отже, оптимально проводити оброблення 35 % розчином гіпохлориту натрію впродовж 50–60 хв незалежно від селекційного номера буряка цукрового.

Експериментально підтверджено, що вихід макроструктур істотно залежить від селекційного номера та виду середовища (табл. 2). Найбільше утворилось калюсу за використання живильного середовища Гамборга і Евелега – 10–80 % залежно від селекційного номера. За використання середовища Мурасіге і Скуга їх частка була 10–35 %. Слід відзначити, що в селекційного номера 07–181 за використання середовища Гамборга і Евелега утворилось калюсу у 80 % генотипів, а бруньок у 35 %. У селекційного номера 07-178 55 % генотипів утворили калюс, а бруньок 80 %.

Отже, для отримання макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового необхідно використовувати живильне середовище Гамборга і Евелега для селекційних номерів 07–188, 07–178 і 07–181.

Таблиця 2

Вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового залежно від виду живильного середовища

Селекційний номер	Кількість генотипів	Кількість генотипів, що утворили калюс		Кількість генотипів, що утворили бруньки	
		шт.	%	шт.	%
Середовище Мурасіге і Скуга					
07–179	20	2	10	1	5
07–180	20	2	10	1	5
07–181	20	3	15	2	10
07–188	20	5	25	4	20
07–181	20	6	30	4	20
07–178	20	7	35	9	45
Середовище Гамборга і Евелега					
07–180	20	2	10	1	5
07–179	20	4	20	5	25
07–181	20	6	30	5	25
07–188	20	9	45	8	40
07–178	20	11	55	16	80
07–181	20	16	80	7	35
НІР _{0,05}	–	1	1	1	2

Проведені цитологічні дослідження отриманих бруньок з незапліднених насінневих зачатків диплоїдних цукрових буряків показали, що гаплоїдний рівень геному визначено у 91,8 % бруньок, а 8,2 % отриманих бруньок мали диплоїдний рівень геному. Згідно «генетичної теорії апоміксису» виникнення регулярного апоміктичного розмноження в природі відбувається поступово під впливом природного добору.

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень визначено вплив біотехнологічних параметрів (експозиція 35 % розчином гіпохлориту натію, вид живильного середовища) на вихід макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового. Оптимально проводити оброблення 35 % розчином гіпохлориту натрію впродовж 50–60 хв незалежно від селекційного номера буряка цукрового. Для отримання макроструктур із незапліднених насінневих зачатків диплоїдного буряка цукрового необхідно використовувати живильне середовище Гамборга і Евелега для селекційних номерів 07–188, 07–178 і 07–181.

Використана література

1. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Яцева О. А. Апоміксис у цукрових буряків. *Вісник аграрної науки*. 2010. № 5. С. 19–22.
2. Редько В. И., Роик Н. В., Войтовская В. И. и др. Полиплоидизация в культуре *in vitro* как метод получения тетраплоидов сахарной и кормовой свеклы. *Сахарная свекла*. 2010. № 9. С. 26–28.
3. Batygina T. B., Vasilyeva V. E. Periodization of development of reproductive structures. *Critical periods. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 2003. Vol. 45. P. 27–36.
4. Богомолов М. А. Апомиксис у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Обзор отечественных и зарубежных исследований. *Сахар*. 2018. № 11. С. 27–33.
5. Verma D. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. Vol. 52. P. 751–784.
6. Соколов В. А., Панихин П. А., Тараконова Т. К. Существует ли гаметофитный апомиксис у диплоидных цветковых растений? *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15, № 1. P. 80–101.
7. Petkeviciene B. D. The effects of climate factors on sugar beet early sowing timing. *Agron. Res.* 2009. Vol. 7. P. 436–443.
8. Ul-Haq Z., Zeb A., Mahmood F. Yield and quality of two cultivars of sugar beet as influenced by fertilizer applications. *Pak. J. Sci. Industr. Res.* 2006. Vol. 49. P. 211–214.
9. Ahmad S. M., Zubair N. Iqbal N. M. Cheema, Mahmood K. Evaluation of sugar beet hybrid varieties under Thal-Kumbi soil series of Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.* 2012. Vol. 14. P. 605–608.
10. Us-Camas R., Rivera-Solís G., Duarte-Aké F. et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2014. Vol. 118. P. 187–201.
11. Trigiano R. N., Dennis J. Gray plant tissue culture. *Development and Biotechnology*. CRS Press, 2016. 608 p.
12. Роїк М. В., Недяк Т. М., Войтовська В. І., Редько В. І., Присяжнюк О. І. Методичні рекомендації зі створення, стабілізації і розмноження тетраплоїдних форм цукрових буряків з використанням методів біотехнології. Київ : Поліграф-Консалтинг, 2012. 18 с.
13. Ермантраут Е. Р., Присяжнюк О. І., Шевченко І. Л. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних у пакеті Statistica 6.0. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2007. 55 с.

References

1. Roik, M. V., Kovalchuk, N. S., & Yatseva, O. A. (2010). Apomixis in red beetles. *Bulletin of Agrarian Science*, 5, 19–22. [in Ukrainian]
2. Redko, V. I., Roik, N. V., & Voitovska, V. I. (2010). Polyploidization in culture *in vitro* as a method for obtaining tetraploids of sugar and fodder beets. *Sugar beet*, 9, 26–28. [in Russian]
3. Batygina, T. B., & Vasilyeva, V. E. (2003). Periodization of development of reproductive structures. *Critical periods. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 45, 27–36.
4. Bogomolov, M. A. (2018). Apomixis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Review of domestic and foreign studies. *Sugar*, 11, 27–33. [in Russian] [in Russian]
5. Verma, D. (2001). Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 751–784.
6. Sokolov, V. A., Panikhin, P. A., & Taronova, T. K. (2011). Does gametophytic apomixis exist in diploid flowering plants? *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 15(1), 80–101. [in Russian]
7. Petkeviciene, B. D. (2009). The effects of climate factors on sugar beet early sowing timing. *Agron. Res.*, 7, 436–443.
8. Ul-Haq, Z., Zeb, A., & Mahmood, F. (2006). Yield and quality of two cultivars of sugar beet as influenced by fertilizer applications. *Pak. J. Sci. Industr. Res.*, 49, 211–214.
9. Ahmad, S. M., Zubair, N. Iqbal, N. M., Mahmood, K. (2012). Evaluation of sugar beet hybrid varieties under Thal-Kumbi soil series of Pakistan. *Int. J. Agric. Biol.*, 14, 605–608.

10. Us-Camas, R., Rivera-Solís, G., & Duarte-Aké, F. (2014). *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 118, 187–201.
11. Trigiano, R. N., & Dennis, J. (2016). *Gray Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. CRS Press.
12. Roik, M. V., Nediak, T. M., Voitovska, V. I., Redko, V. I., & Prysiazhniuk, O. I. (2012). *Metodychni rekomendatsii zi stvorennia, stabilizatsii i rozmnozhenia tetraploidnykh form tsukrovykh buriakiv z vykorystanniam metodiv biotekhnologii* [Methodical recommendations on creation, stabilization and reproduction of tetraploid forms of sugar beet with use of methods of biotechnology]. Kyiv: PolygraphConsulting. [in Ukrainian]
13. Ermantraut, E. R., Prysiazhniuk, O. I., & Shevchenko, I. L. (2007). *Statystychnyi analiz ahronomichnykh doslidnykh danykh v paketi Statistica 6* [Statistical analysis of agronomic research data in package Statistica 6.0]. Kyiv: PolygraphConsaltyng. [in Ukrainian]

UDC 633.635.63.52

Zinchenko, O. A.¹, Zatserkovna, N. S.¹, Ukrainets, O. A.², & Zabolotna, A. V.³ (2021). Influence of biotechnological parameters on the yield of macrostructures from unfertilized seed germs of diploid sugar beet. *Naukovi praci Institutu bioenergetichnih kul'tur ta cukrovih burakiv* [Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet], 29, 123–128. [in Ukrainian]

¹*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, NAAS of Ukraine, 25 Klinichna St., Kyiv, 03110, Ukraine*

²*Uman National University of Horticulture, 1 Instytutska St., Uman, Cherkasy region, 20305, Ukraine*

³*Pavlo Tychna Uman State Pedagogical University, 2 Sadova St., Uman, 20300, Ukraine*

Purpose. To determine the influence of biotechnological parameters on the yield of macrostructures from unfertilized seed germs of diploid sugar beet. **Methods.** Biotechnological, laboratory, analytical, statistical. **Results.** It was found that the use of 35% sodium hypochlorite solution at an exposure of 40 min allows to obtain from 73.13 to 75.83% of sterile seed germs. Exposure of 50 min allows to obtain the sterility of the source material from 83.58 to 85.39%. Sterilization of explants for 60 min allows to obtain sterility of the source material from 86.88 to 92.80%. The share of infected seed germs with increasing exposure decreased from 20.09–22.14 to 6.52–12.61%. The yield of macrostructures has been experimentally confirmed to significantly depend on breeding genotype and type of medium. The largest number of calluses (10–80%) was formed with the use of the Hamburg and Eveleg's medium. With the use of he Murasige and Skoog's medium, their share was 10–35%. Noteworthy, in breeding genotypes 07–181, 80% of genotypes formed buds and 35% formed calluses in the Hamburg and Eveleg's medium. Of breeding genotypes 07–178, 55% of genotypes formed a callus and 80% buds. **Conclusions.** As a result of the conducted researches the influence of biotechnological parameters (exposure to 35% solution of sodium hypochlorite, type of nutrient medium) on the yield of macrostructures from unfertilized seed germs of diploid sugar beet was determined. It is optimal to carry out treatment with 35% sodium hypochlorite solution for 50–60 minutes, regardless of the selection number of sugar beet. To obtain macrostructures from unfertilized seed germs of diploid sugar beet, it is necessary to use the Hamburg and Eveleg's medium for breeding genotypes 07–188, 07–178 and 07–181.

Keywords: *biotechnological parameters; sodium hypochlorite; sugar beet; nutrient medium; callus.*

Надійшла / Received 08.09.2021

Погоджено до друку / Accepted 28.09.2021