

УДК 633.63:631.52

МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ ДЛЯ ГІБРИДНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ: РОСЛИНИ ВИДУ *BETA VULGARIS L.* З НОВОЮ СТЕРИЛЬНОЮ ЦИТОПЛАЗМОЮ *BETA PATULA L.*

РОЇК М.В.,

академік НААН, д.с.-г. наук, ІБКіЦБ;

КОВАЛЬЧУК Н.С.,

зав. лаб. цитогенетики, с.н.с., ІБКіЦБ;

БОНДАРЬ С.О.,

зав. науково-організаційним
і координаційним відділом та
аспірантурою;

ВЛАСЮК В.І.,

зав. лаб. адаптивної селекції
Веселоподільської ДСС, с.н.с.;

ФЕДОРЩАК Л.Г.,

зав. лаб. апоміксису і поліплоїдії
Ялтушківської ДСС, с.н.с.Інститут біоенергетичних культур
і цукрових буряків НААН, вул. Клінічна,
25, Київ, 03110, Україна/Тел. E-mail:
sugarbeet@ukr.net www.sugarbeet.com.ua

Постановка проблеми. Цитоплазматична однорідність в результаті використання тільки одного походження ЦЧС створює потенційну загрозу [1, 2]. Серії алоплазматичних ліній з використанням цитоплазми близьких видів створені у родів *Hordeum*, *Solanum*, *Gossypium*, *Brassica*, *Avena* і ін [3,4,5]. Дослідження генетики імунітету сільськогосподарських культур визначили перспективу використання диких видів в селекції для їх захисту від хвороб шкідників, збагачення адаптаційного потенціалу культури (Евтушенко Д. П., 2001). Нові джерела стійкості до ризоманії і церкоспорозу були виділені у цукрових буряків від дикого виду *Beta maritima L.*, які включають 60 різновидностей і поширені від Скандинавського півострова до Середземного моря (Чесноков Ю.В., 2013, Леонова І. Н., 2019). На даний час особливо результативні дослідження проводяться з генетичної інформації, яка локалізована в органелах і мітохондріях. Визначається роль цитоплазматичних генів з містом їх локалізації в хлоропластах за толерантність до гербіцидів, а за цитоплазматичну чоловічу стерильність в мітохондріях [5, 6, 7]. Перспективними виявились біотехнологічні методи культури недозрілих зародків при міжвидовій гібридизації. Результативні досліджен-

ня проведені на алоплазматичних лініях пшениці з цитоплазмами *Triticum*, *Aegilops*, *Secale*, *Agropyron* [4,8, 9,10].

Наукові дослідження, проведені в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків в УААН (ІБК і ЦБ), присвячені виділенню нових джерел стерильності від дикого виду *Beta maritima L.*, створенню заміщених ліній для збагачення адаптаційного потенціалу культури (Ковальчук Н. С., Роїк М. В., 2013). Розроблені методи індукції алоплазматичних ліній з використанням морфологічних маркерних ознак на основі піногенетичних гаплотипів (Роїк М. В., Ковальчук Н. С., 2017).

Доступ до широкого спектру гермоплазми диких видів роду *Beta L.* може мати вирішальне значення для створення нових вихідних матеріалів цукрових буряків, стійких до майбутніх епіфітотій і підтримки прогресу в селекції та конкурентоздатності цукрових буряків, як цукороросіїв.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Перше про нові джерела ЦЧС в секції *Beta vulgaris L.* було опубліковано доктором Р.К. Олдемейером із фірми «Great Western Sugar Company», який проаналізував колекцію диких видів буряків і знайшов два нових джерела стерильної цитоплазми: один походження від природних популяцій *Beta macrocarpa L.* і один від природних популяцій *Beta cicla L.* із Туреччини [11].

Найбільша цінність збагачення і розширення основи гермоплазми цукрових буряків була доведена у наукових роботах Доні (Doney, 1998). В популяціях, отриманих шляхом схрещування відібраних ліній *Beta maritima L.* із різних районів з використанням ДНК-технологій лінії нової гермоплазми від дикого виду *Beta maritima L.*, були класифіковані Е, G, H на основі нуклеотидних моделей мт-ДНК і характеристик відновлення фертильності (Touzet P., 2018, Moritani M., 2013). Аналогічно Олдемейеру, Боземарк також знайшов п'ять нових джерел чоловічої стерильності походження із Марокко, Югославії і Туреччини

(Bosemak N. O., 2006).

У цукрових буряків ЦЧС має мутантний характер і визначається взаємодією двох не щеплених генів *Hx* і *Zz* та мутацією мітохондріального геному цитоплазми. Вперше ЦЧС у цукрових буряків спостерігав Оуен у сорту Мічиганський гібрид (Owen F. V., 1945). Він визначив також структуру ядерних генів ЦЧС і відсутність у цукрових буряків проблеми відновлення фертильності при необхідності вегетативного гетерозису, що визначається ознаками коренеплоду, а не насіння. На даний час особливо результативні дослідження проводяться з генетичної інформації, яка локалізована в органелах і мітохондріях [5,6,7]. Методи соматичної гібридизації для індукції нових плазматипів сільськогосподарських культур вимагають для об'єднання протопластів гамма — опромінення для інактивації ядра у донорних рослин, хлорофіл — ДНК мутації цитоплазми і дії хімічних мутагенів, що негативно впливає на геном так і на плазмозом [5,8].

Наукові дослідження з міжвидової гібридизації, проведені в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (ІБКіЦБ), присвячені виділенню нових джерел цитоплазматичної стерильності від дикого виду *Beta maritima L.* (Ковальчук Н. С., Роїк М. В., 2014).

Дослідники ЦЧС виявили також переконливі факти, які неможливо пояснити гіпотезою двохгенного контролю ЦЧС, що інтерпретується сьогодні епігеномною мінливістю генотипів ЦЧС в процесі онтогенезу [12,13]. За новими дослідженнями з використанням ДНК технологій японські вчені Kazuyoshi Kitazaki і Tomohiko Kubo (2020) доказали, що відновлювач фертильності (Rf1) — ядерний ген має домінуючі, напівдомінуючі та рецесивні алелі, що свідчить про те, що він може бути згрупований у багатоалельний локус. Використання нових джерел ЦЧС потребує створення заміщених алоплазматичних ліній і тривалої селекційної проробки стерильних форм за ознаками однорічного і дворічного циклів розвитку, роздільноплідності, стериль-

ності, продуктивності культури.

А тому метою наукових досліджень є виділення нової стерильної цитоплазми від реліктового дикого виду *Beta patula* з використанням цитологічних характеристик дегенерації чоловічого гаметофіту при ЦЧС і застосування методів диференціації і добору алоплазматичних інтрогресивних ліній з ядерним геномом закріплювачів цукрових буряків і новою стерильною цитоплазмою для оцінювання їх за комплексом селекційно-цінних ознак на рівні триплоїдних гібридів.

Матеріали і методи дослідження

Науковий експеримент проводили на рослинному матеріалі в умовах створення штучних популяцій *Beta patula* L. в природно кліматичних умовах України:

1. Популяція однорічних рослин була створена в природно-кліматичних умовах України на основі колекційних зразків насіння Європейського банку [13]. Колекційні зразки насіння *Beta patula* L. походженням із Португалії, вирощувались в умовах вегетаційних посудин ІБКІЦБ. Посів проводили в кінці квітня, а в травні розсаду переносили в ґрунт. Для рослин популяції було притаманне сидяче овальне листя, багатоквітковість (6–8 квіток в клубочку), сильне розгалуження пагонів. Цвітіння проходило неодноразово (Рис. 1 а, б)

2. У якості аналізаторів стерильності використані закріплювачі стерильності цукрових буряків за селекційним номером № 677, визначений за стійкістю до ризоманії на провокаційних фонах в Італії.

3. Експериментальні триплоїдні гібриди на основі нових джерел стерильності отримані з використанням тетра-

плоїдних багатонасінних запилювачів Я/ДА 4х Ялтушківської ДСС і 7009 БТ 4х Веселоподільської ДСС.

Методи аналізуючого схрещування для отримання нових плазматипів з інтродукованою стерильною цитоплазмою від дикого виду *Beta patula* L.

Цитологічні методи для виділення контрольних рослин, донорів нових стерильних цитоплазм серед популяції насінних рослин *Beta patula* L.

Серед 45 зразків *Beta patula* L. виділялись рослини:

- із фертильними і стерильними пилковими зернами (до 20%);
- із стерильними пилковими зернами з добре розвиненою екзиною;
- із мозаїчністю розвитку пиляків в межах однієї квітки, як з фертильними так і з стерильними пилковими зернами.

Аналіз розвитку структури пиляків, фертильність — стерильність пилку дикого виду буряків досліджували за допомогою оцетокармінового методу з використанням 4% оцетокарміну і 0,09% метиленового синього, перегляд препаратів під мікроскопом «Carl Zeiss» за збільшенням 12x20 і 12x40.

Методи мікротклонального розмноження для збереження селекційно-цінних генотипів в процесі бекросних схрещувань.

Контрольні однорічні рослини з високою відсотковою часткою стерильного пилку і аномальним розвитком фіброзного шару пиляків вводили в культуру *in vitro*. Для модифікації використовували методики, розроблені І. І. Ільєнко в ІБКІЦБ (Ільєнко І. І.. 1983). Для клонального мікророзмноження в якості первинних експлантів використовували

ли генеративні пагони насінних рослин з модифікації складу макро- і мікросолей Гамборга з додаванням цукрози 30000 мг/л, БАП 0,2–0,5 мг/л, гібереліну 0,1–0,2 мг/л [14]. Визначені за дворічним циклом розвитку, фенотиповими ознаками ЦЧС селекційні номери BC2 № 3, № 4, № 7, № 5, № 9 розмножені клонами і тиражовані в умовах штучних живильних середовищ.

Метод аналізуючого схрещування і особливості одержання гібридного насіння F1.

Гібридне насіння F1 отримали в умовах вегетаційних посудин ІБКІЦБ за схемою гібридизації на основі вкорінених в ґрунт клонів однорічних контрольних рослин, виділених за цитологічними ознаками:

F1 ♀ *Beta patula* L. S BBRr MM / ♂ *Beta vulgaris* N xhzz bb rr mm.

Наступний цикл насичуючих схрещувань проводили з закріплювачами стерильності *Beta vulgaris* N xhzzmm № 667, рецесивними гомозиготами за генами g-g та b-b-;

BC1 ♀ F1CS *Beta patula* S RrBb Mm / ♂ *Beta vulgaris* N xhzz rrbmm № 667

За фенотипами ЦЧС і за морфологічними особливостями розвитку пиляків вони змінювались від ЧС-0 типу до ЧС-1 (Owen 1945) типу від початку і до кінця цвітіння насінників. Проводили наступний цикл бекросних схрещувань із закріплювачами стерильності із червоним забарвленням гіпокотелю R+r- за схемою:

BC2S ♀ BC1 *patula* S Xhzz rRbB Mm / ♂ *Beta vulgaris* N xhzz Rrbmm № 667.

Методика виділення рецесивних гомозиготних ліній за присутністю



а)

б)

Рис.1.. Морфологічні особливості дикого виду *Beta patula* L., інтродукованого в умовах України: а) багатонасінний плід *Beta patula* L. (6–8 насінин); б) зовнішній вигляд дикого виду *Beta patula* L.

алелей (r-r) та двоорічного циклу розвитку (b-b-) на цитоплазматичному фоні *Beta patula* L.

Наступний цикл зворотно-насичуючих схрещувань проводили з закріплювачами стерильності цукрових буряків, з домінантною алелю R+ антоціанового забарвлення, для ймовірного виділення в дочірньому поколінні насінників із стійкою до полягання формою за генетичною моделлю:

P ♀ BC2 patula S Mm rrbB Hxzz / ♂ *Beta vulgaris* N xxzzmm Rrbb № 667

Добір коренеплодів BC3S patula L. проводили за забарвленням гіпокотелю для встановлення експресії локуса маркерного забарвлення R+r- у потомства після 3-х циклів насичуючих схрещувань. Добір за генетичним маркером забарвлення гіпокотелю в популяції BC3 виявив присутність домінантного алеля червоного забарвлення у 158 шт. рослин, у 152 шт. рослин спостерігалось рецесивне забарвлення гіпокотелю.

Серед коренеплодів BC3S patula відбирали лінії за формою коренеплоду, високою цукристістю для одержання експериментальних гібридів і розмноження насіння наступних циклів насичуючих схрещувань.

Мінливість за формою коренеплоду, однорічним і дворічним циклом розвитку у реципрокних потомств, на фоні і стерильної цитоплазми дикого виду *Beta patula* L.

У випадку міжвидових гібридів на цитоплазматичному фоні *Beta patula* L. лише бекросні потомства другого циклу насичуючих схрещувань розділились за дворічним і однорічним циклом розвит-

ку; при цьому роздільноплідність і дворічний цикл розвитку вдалось відновити на основі нової стерильної цитоплазми *Beta patula* L. лише серед насінних рослин четвертого циклу насичуючих схрещувань.

Мінливість за формою коренеплоду після добору за рецесивними ознаками антоціанового забарвлення та дворічного циклу розвитку у міжвидових гібридів BC2S patula, BC3S patula, BC4S patula наведено на (рис. 2 а, б, в, г).

Дослідження продуктивності експериментальних триплоїдних гібридів буряків цукрових на основі нових джерел стерильності *Beta patula* L.

Для гібридизації з тетраплоїдними багатонасінними запилювачами, були використані в селекційному процесі Ял-

тушківської та Веселоподільської ДСС кращі алоплазматичні інтрогресивні лінії. Триплоїдні гібриди отримані на Ялтушківській ДСС за схемою гібридизації з тетраплоїдними багатонасінними запилювачами Я/ДА 4x і на Веселоподільській ДСС з запилювачем 7009 б/т 4x:

♀ BC4S patula xxzz mm / ♂ Я/ДА 4x Mm;

♀ BC2S patula xxzz mm / ♂ 7009б/т 4x Mm.

Дослідження проводили на фоні 0,5 норми мінеральних добрив у ваговій формі [15].

Веgetаційні досліді проводили в лабораторії агрохімії, використовували контрольований полив та вирощування в умовах вегетаційних посудин[16].

Використані у вегетаційному дослі-

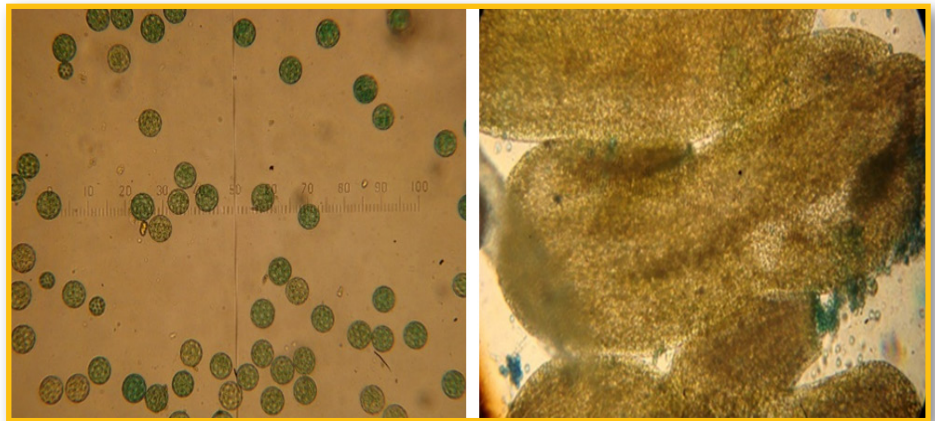


Рис.3. Розвиток чоловічого гаметофіту у химерних за стерильністю насінних рослин дикого виду *Beta patula* L. Зб. 12x40: а) зображення стерильних пилкових зерен у насінних рослин *Beta patula* L з розвинуеною екзиною; б) структура стерильних пиляків у рослини донора ЦЧС *Beta patula* L.

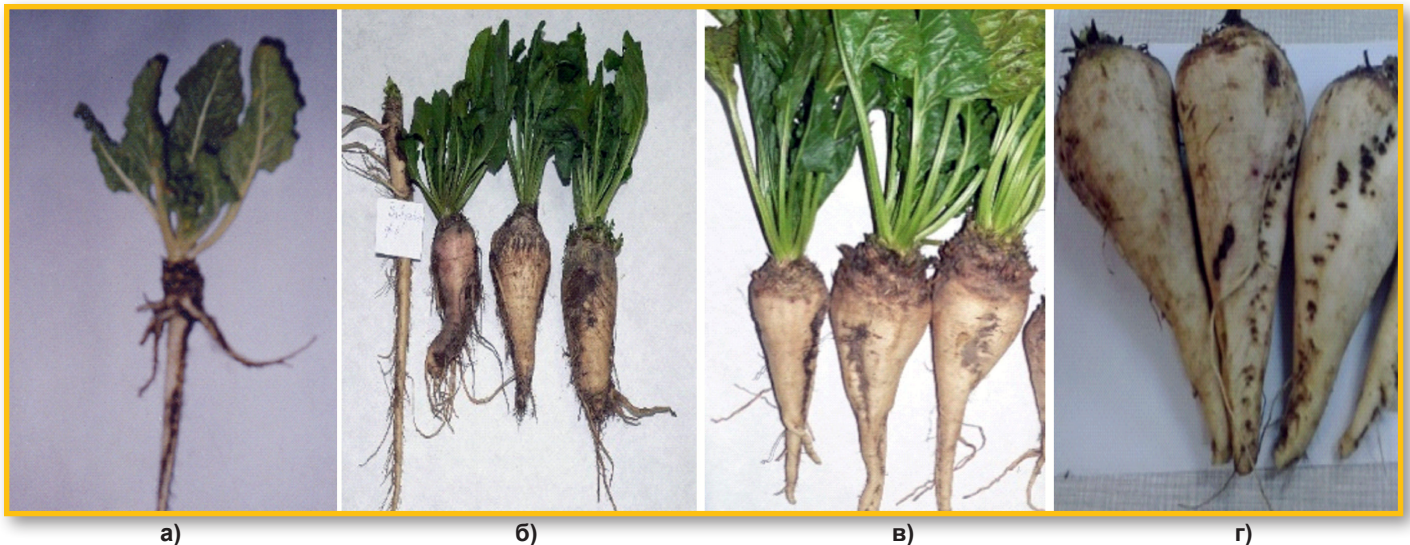
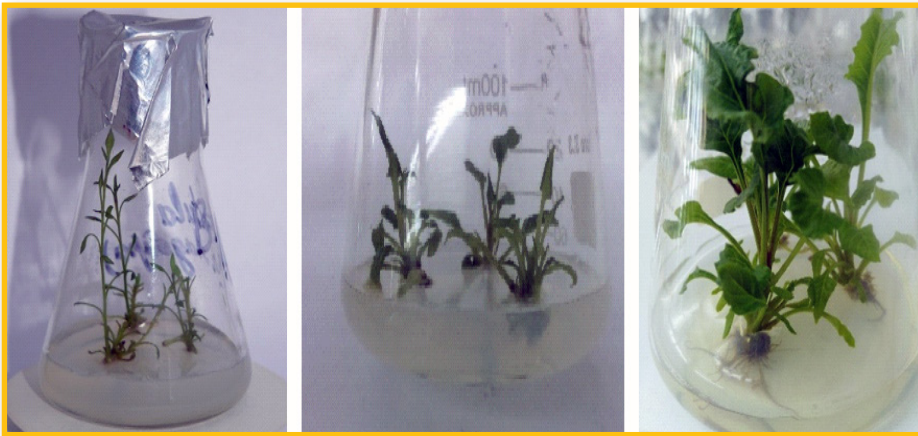


Рис.2. Форма коренеплодів у гібридів BC2S patula L, BC3 S patula L, BC4S patula L.: а) коренеплоди дворічної форми BC2S patula L. r-r b-b-; б) мінливість за формою коренеплодів BC3S patula L., порівняно з BC2S patula L. r-r b-b-; в) коренеплоди BC3S patula L. у селекційного номера з високою цукристістю до 22,5%; г) добір за формою коренеплоду у алоплазматичні інтрогресивні лінії BC4S patula r-r b-b- для використання в селекційному процесі.



а) б) в)

Рис.4. Дикий вид *Beta patula* і бекросні потомства *BC2S Beta patula*, депоновані і вкорінені в умовах штучних живильних середовищ; а) *Beta patula* L. введена в стерильну культуру за цитологічними ознаками ЦЧС; б) мікроклональне розмноження *BC2S Beta patula* L. *rrbb Mm*; в) вкорінення селекційно цінних генотипів *BC2S patula* для гібридизації і генетичного аналізу.



а) б)

Рис.5. Морфологічні особливості насінних рослин міжвидових гібридів *BC1S (Beta patula)*: а) рекомбінантний генотип з відсутністю генеративних пагонів – *BC1S patula r-r-V+b-*; б) однорічні насінники – *BC1S patula r-r- V+b- M+m- Xzzz* з трьох квітковими клубочками ЧС-1 і ЧС-0 типу за Оуеном.



а) б)

Рис.6. Рекомбінантні біотипи *BC2S patula* з однорічним і дворічним циклом розвитку: а) нові плазмотиби – *BC2S patula R+r-V+b-m-m-* з однорічним циклом розвитку, 100% роздільноплідністю і стерильністю ЧС-0 типу; б) зображення насінних рослин – *BC2S patula r-r-b-b-M+m-* з розлогими стеблами ЧС-1 типу.

ді норми внесення мінеральних добрив включали: 0,5 норми — N70P70K70. Посів проведений 28 квітня, оцінка цукристості в короткий термін — 15 вересня, тривалість вегетаційного періоду 4,5 місяців.

Результати і обговорення

Аналізували пиляки 3–5 квіток за класифікацією доктора Н. Є. Зайковської (1968). Серед досліджуваних біотипів нами виділена лише одна рослина № B5 *Beta patula* L. з мозаїчною розвитку пиляків в одній квітці, від наявності пилкових зерен, як фертильних так і стерильних, в різному відсотковому відношенні до квіток з окремими стерильними пиляками і дегенерованими пилковими зернами на одноядерній стадії гаметогенезу (Рис. 3 а, б).

Мікроклональне розмноження селекційно-цінних генотипів вихідної форми *Beta patula* № 5, визначеної за цитологічними ознаками ЦЧС та бекросні потомства міжвидових гібридів з дворічним циклом розвитку *BC2S Beta patula rrbb Mm*, зображено (рис. 4 а, б, в).

В умовах вегетаційних посудин отримали однорічні насінники міжвидових гібридів F1, що характеризувались різними аномаліями в розвитку.

Одержане насіння гібридів (BC1) висівали наступного року і отримали лише однорічні багатонасінні рослини, як серед матеріалів з червоним забарвленням так і зеленим забарвленням гіпокотелю. Серед насінних рослин *BC1R+r-* — морфологічні мутанти з присутністю лише листків форми чашолистиків і відсутністю закладки квіток (рис. 5 а). Серед матеріалів із зеленим забарвленням гіпокотелю *r-r-*, виділились рекомбінантні, однорічні насінники *V+b-* з трьохквітковими стерильними за пилком клубочками ЧС-1 і ЧС-0 типу за Оуеном (рис. 5 а, б).

Серед виділених насінників третього циклу насичуючих схрещувань, виділили рекомбінантні генотипи з червоним забарвленням гіпокотелю *R+r-*, багатостебельні з однорічним циклом розвитку *b-b-*, із 100% роздільноквітковою *mm* (рис. 6 а).

Вирощені в умовах вегетаційних посудин насінні рослини *BC2S r-r-b+b-M+m-* характеризувались: розлогими стеблами і химерністю за плідністю (одно-, двох- і триплідні клубочки), рецесивним забарвленням гіпокотелю, мозаїчністю за фенотиповими ознаками стерильності пиляків, що змінювались від ЧС-0 до ЧС-1 типу.(рис.6 б).

Генетична модель аналізуючого схрещування і відбір за рецесивними зчепленими ознаками закріплювачів сте-

Таблиця 1

Співвідношення фено- і генотипових класів ЦЧС у потомстві рецесивних гомозигот від схрещування ♀ BC2S patula Xxzz rrbMm x ♂ Beta vulgaris Nxxzz Rrbmm

Походження	Вихідні фенотипи, генерація	Потомство насінних рослин, клонів	Рік	Фенотипові класи і кількість рослин			=2	P [*]
				ЧС-0	ЧС-1	Σ		
♀ BC2S patula Xxzz rrbMm x ♂ Beta vulgaris Nxxzz Rrbmm								
BC2S patula Xxzz rrbMm	ЧС-I типу BC2	BC2 №3	2014	17(34,0)	33(66,0)	50	5.12	0.05≥P≥0,01
		BC2 №4	2015	25(46,3)	29(53,7)	54	0.32	0.64≥P≥0,5
		BC2 №7	2015	20(35,7)	36(64,3)	56	2.28	0,2≥P≥0,05
		BC2 №5	2016	15(34,1)	29(65,9)	44	7.68	P≤0,2
		BC2 №9	2016	13(38,2)	21(61,8)	34	0.96	0.8≥P≥0,5
Beta vulgaris S xzzz ЧCN№0302	ЧС-0	F1	2016	30(90,9)	3(9,1)	33		

Примітка P* - вірогідність фактично отриманих і теоретично очікуваних даних ЧС-0 типу і ЧС-1 типу за розщепленням за фенотиповими класами 1:1

рильності буряків цукрових r-b-; R+B+ вказали на рекомбіногенез події в межах локусів забарвлення гіпокотелю, однолітнього і дволитнього циклу розвитку, роздільноплідності і стерильності у випадку гібридизації з диким видом Beta patula L. (табл. 1).

Значення вірогідності переко-нує у відповідності дослідних даних і теоретично очікуваних 0.05≥P≥0,01 і 0.80≥P≥0,5. Аналіз дочірнього потомства насінних рослин BC2S patula r-r-b-b- від насінників клонів BC2 № 3, № 5, № 7 впродовж 3-х років показав результати, які не відповідають теоретично очікуваному розщепленню =2 = 5,12; 2.26, 7,68.

Дворічні коренеплоди b-b-, рецесивні гомозиготи за забарвленням гіпокотелю r-r- вперше виділяли серед матеріалів другого бекросу. Коренеплоди BC2S patula були тонкими і досягали довжиною до 30 см.

Загальна кількість проаналізованих рослин 310 шт., отриманий характер розщеплення відповідав теоретично очікуваному розщепленню за фенотипом 1:1. Генетичний маркер забарвлення гіпокотелю успадкувався у бекросних гібридів BC3S patula як домінант/рецесив і є показником позитивного ефекту заміщення геному закріплювача стерильності буряків цукрових в умовах нової інтродукційної стерильної цитоплазми Beta patula L. (табл. 2)

За результатами розщеплення наявність/відсутність домінантного алеля забарвлення гіпокотелю R+ відповідають теоретично очікуваному 1:1 та X² = 0,116 при 0,99>P>0,95 у бекросних потомств BC3S patula. Серед насінників з присутніми лише рецесивними алелями забарвлення гіпокотелю r-r-, виділились дві різні форми:

форма стебел Beta vulgaris L. з од-

Таблиця 2
Розщеплення гібридної популяції BC3S B. patula L. за присутністю алелей забарвлення гіпокотелю.

	R+	r-	сума
Дослідні	158	152	310
Очікувані g	155	155	310
Відхилення d	-3,0	+3,0	0
D2	9	9	
D 2/G	0,058	0,058	X ² = 0,116

ноплідним насінням (рис. 7а);

одностебельні з тонкими квітконосними пагонами, роздільноплідні (100%), стерильні (100%) (рис 7 б).

В умовах групових ізоляторів Веселоподільської і Ялтушківської ДСС були оцінені за роздільноплідністю і стерильністю, формою коренеплоду краді селекційні номери нових плазмотипів BC4S

patula L. Отримано насіння BC5S patula L. в схрещуванні з закріплювачами стерильності Beta vulgaris L. Nxxzz № 667.

За результатами досліджень проаналізовано високі і стабільні показники стерильності у роздільноплідних пилкостерильних ліній на цитоплазматичному фоні Beta patula L. Селекційна цінність стерильних цитоплазм від диких видів



а)

б)

Рис 7. Різна форма насінників у гібридів BC3S patula L. з червоними і зеленими забарвленням гіпокотелю: а) однорічні насінники ЧС-0 типу з одно-, двонасінними плодами R+; б) двоохрічні, одностебельні насінні рослини R+r.

Таблиця 3

Продуктивність експериментальних триплоїдних гібридів ЯДСС і ВПДСС на фоні стерильної цитоплазми походженням дикого виду *Beta patula* L.

Походження експериментальних гібридів, 3х	Тривалість вегетаційного періоду	Маса коренеплоду, г	Кондуктометрична зола, %	Суха речовина, %		Цукристість, %
				гічка	коренеплід	
BC4S <i>patula</i> к.2 х Я/ДА 4х, 1/1	28.04.-10.10.	380	0,528	19,4	26,8	19,7
1/2	28.04.-15.09	325	0,382	21,2	29,4	20,6
1/3	28.04.-10.10.	465	0,401	21,0	28,9	21,5
1/4	28.04.-10.10.	415	0,377	19,8	26,5	19,5
1/5	28.04.-10.10.	450	0,328	19,8	29,1	20,9
1/6	28.04.-10.10.	440	0,362	22,4	29,5	20,7
1/7	28.04.-10.10.	410	0,401	21,4	28,5	21,2
BC4S <i>patula</i> к.1 х 7009 б/т 4х 2/1	28.04.-10.10.	500	0,401	21,2	30,2	21,0
2/2	28.04.-15.09	425	0,377	16,6	25,3	20,1
2/3	28.04.-10.10.	380	0,391	18,0	27,7	20,2
2/4	28.04.-10.10.	355	0,401	20,6	28,7	20,0
2/5	28.04.-10.10.	440	0,381	20,8	28,9	21,5
2/6	28.04.-10.10.	430	0,386	22,0	29,0	20,5
2/7	28.04.-10.10.	480	0,377	17,4	28,9	20,5
3/7	28.04.-10.10.	430	0,416	21,4	28,1	20,5
НІР0,05		23	0,012	1,3	1,5	0,2

роду *Beta* L., як можливої альтернативи нового джерела стерильності Оуена (1945) на даний час не відомо. Результати накопичення цукру, що досліджувалися вибірково для деяких номерів в динаміці на початку вересня і в середині жовтня (табл. 3).

У досліджуваних гібридів 3х, при 0,5 норми внесення мінеральних добрив спостерігалась висока цукристість від 19,5% до 21,5%, як у вересні так і в кінці вегетаційного періоду (жовтень). Відсоткова частка сухої речовини у коренеплодів для деяких варіантів досягала 29,5%, 30,2%.

В популяції рослин буряків N і S-цитоплазми знаходяться у взаємодії і реакція чоловічого гаметофіту залежить від гетероплазмії мітохондріальної ДНК (Poyling, 1992).

У результаті аналізуючого схрещування і добору за рецесивними генами закріплювачів стерильності буряків цукрових, дворічні біотики b-b- виділили лише серед селекційних матеріалів дру-

гого бекросу BC2S *patula* L. b-b- r-r-, що вказує на присутність рекомбіногенезу в структурі локусів щеплених генів. Незважаючи на те, що серед селекційних номерів BC3S *patula* добір проводили лише за роздільноплідними фенотипами, як серед закріплювачів стерильності буряків цукрових, так і материнських компонентів, показники роздільноплідності у BC4S *patula* вимагали додаткової браковки багатоплідних насінних рослин. У контрольному варіанті *Beta vulgaris* Sxxzz № 677, із 30 насінних рослин ЧС-0 типу ідентифікованих на початку цвітіння і у фазі активного цвітіння насінників, виділені 3 рослини ЧС-1 типу, що на даний час інтерпретується не стабільністю експресії фенотипів ЦЧС і епігеномною мінливістю ознак, що детермінуються генетичною інформацією цитоплазми [10,17].

Виділений новий вихідний матеріал і досліджена продуктивність у експериментальних триплоїдних гібридів, отриманих за схемою ♀BC4S *patula* к.2 / ♂Я/

ДА 4х, 1/1, підтверджує дані французьких дослідників міжвидових гібридів буряків цукрових про можливу експресію додаткових алелей цукристості в умовах нової інтродукованої цитоплазми, що забезпечує зменшення вегетаційного періоду при накопиченні вуглеводів. Новий вихідний матеріал може бути використаний для селекції гібридів, за цією ознакою і для визначення його придатності для виробництва біоетанолу.

Висновки

Виділені заміщені лінії на основі стерильної цитоплазми від реліктового дикого виду *Beta patula* L. (о.Мадейра) Португалія. Експресія ядерних генів у бекросних потомств BC4S *patula* характеризувалась високими показниками стерильності ЧС-0 типу. Цукристість алоплазматичних ліній з новою ЦЧС на рівні експериментальних триплоїдних гібридів мала значення 19,5% і 20,5%, що дозволяє рекомендувати їх для використання в селекційному процесі цукрових буряків.

ЛІТЕРАТУРА

- Moritani M, Taguchi K, Mikami T et al. (2013) Identification of the predominant nonrestoring allele for owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype. *Mol Breed.* 32(1): 91–100. doi: 10.1007/s11032-013-9854-8.
- Arakawa T, Ue S, Sano C et al. (2019) Identification and characterization of a semi-dominant restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theoretical and Applied Genetics.* 132(1): 227–240. doi: 10.1007/s00122-018-3211-6.
- Efremova T, Arbuzova V, Trubacheeva N et al. (2013) Substitution

of *Hordeu marinum* ssp. *gussoneanum* chromosome 7HL into wheat homoeologous group-7. *Euphytica.* 192:251–257. doi: 10.1007/s10681-012-0843-5.

Голоенко І.М., Давыденко О.Г. (2002) Нарушение расщеплений маркерных ядерных генов у алло и изоплазматических линий ячменя. *Генетика.* 38(7):944–949.

McGrath JM, Hanson LE, and Panella L. (2015) Registration of SR98 sugar beet Germplasm with resistances to *Rhizoctonia* seedling and crown and root diseases. *Journal of Plant Registrations.* 9(2):227–231. doi: 10.3198/jpr2013.08.0052crg.

Grimmer MK, Kraft T, Francis SA et al. (2008) QTL mapping of BNYVV

resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breeding*. 127:650–652. doi: 10.1111/j.1439–0523.2008.01539.x.

Стогниенко О.И., Стогниенко Е.С. (2019) Полевая устойчивость гибридов F1 сахарной свёклы к наиболее вредоносным болезням в условиях ЦЧР. *Аграрная наука*. 2:75–78. doi: 10.32634/0869–8155–2019–326–2–75–78.

Гавриленко Т.А., Ермишин А.П. (2017) Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 21(1):16–29. doi: 10.18699/VJ17.220.

Teresio C, Mc Vetty Peter BE. (2004) Comparison of the effect of mur and nar cytoplasm on the performance of intercultivar summer rape hybrids. *Can. J. Plant Sci.* 84(3):731–738. doi: 10.4141/P02–163.

Кондрацкая И.П., Юхимук А.Н., Столепченко В.А. и др. (2018) Физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика межродового гибрида житняка гребенчатого (*Agropyron cristatum* L.) с райграсом пастбищным (*Lolium perenne* L.). *Физиология растений и генетика*. 50(5):371–382. doi: 10.15407/frg2018.05.371.

Oldemeyer R.K. (1957). Sugar beet male sterility. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 9:381–386.

Yamamoto M, Shinada H, Onodera Y et al. (2008) Laboratory of Genetic Engineering, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060–8589, Japan. A male sterility-associated mitochondrial protein in wild beets causes pollen disruption in transgenic plants. *The Plant Journal*. 54:1027–1036. doi: 10.1111/j.1365–313X.2008.03473.x

Зосимович В.П. (1968) Виды дикой и происхождение культурной свеклы. *Биология и селекция сахарной свеклы*. М.: Колос. С. 5–65.

Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50:151–158. doi: 10.1016/0014–4827(68)90403–5.

Ильенко И.И. (1983) Микрклональное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре in vitro. *Физиология и биохимия культурных растений*. 15(4):351–355.

Іваніна В.В., Павук І.А., Мазур Г.М. (2018) Поживний режим чорнозему вилугуваного за різних систем удобрення буряків цукрових. *Вісник аграрної науки*. 4:13–19. doi: 10.31073/agrovisnyk201804–02.

Maletskii S.I., Yudanov S.S., Maletskaya E.I. (2015) Analysis of epigenomic and epiplastome variability in the haploid and dihaploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Agric. Biol.* 50(5): 579–89. doi: 10.15389/agrobiologia.2015.5.579Rus.

АНОТАЦІЯ

МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ ДЛЯ ГІБРИДНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ: РОСЛИНИ ВИДУ BETA VULGARIS L. З НОВОЮ СТЕРИЛЬНОЮ ЦИТОПЛАЗМОЮ BETA PATULA L.

Поїк М. В., академік НААН, д.с.-г. наук, ІБКІЦБ
 Ковальчук Н. С., зав. лаб. цитогенетики, с.н.с., ІБКІЦБ
 Бондарь С. О., зав. науково-організаційним і координаційним відділом та аспірантурою

Власюк В. І., зав.лаб. адаптивної селекції Веселоподільської ДСС, с.н.с.

Федорошак Л. Г., зав.лаб. апоміксісу і поліплоїдії Ялтушківської ДСС, с.н.с.

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, вул. Клінічна, 25, Київ, 03110, Україна/ Тел. E-mail: sugarbeet@ukr.net; www.sugarbeet.com.ua.

Мета. У зв'язку зі зміною кліматичних умов, поширенням нових вірусних захворювань, важливою проблемою в буряківництві є розширення плазмифонної культури за використанням нових стерильних цитоплазм від диких видів роду *Beta* L., як альтернативи S-цитоплазми Оуена, тому створення селекційних матеріалів на основі нової цитоплазми і було метою даної роботи. **Методи.** Цитологічні, біотехнологічні, польові, лабораторні. **Результати.** Визначено присутність рекомбінаційних подій в локусі щеплених генів однорічного та дворічного циклу розвитку В+в- і забарвлення гіпокотелю R+r-, з використанням методу аналізуючого схрещування. Раніше нами доведено позитивний ефект при заміщенні геному закріплювача стерильності *Beta vulgaris* Nxxxz, за результатами добору за зеленим забарвленням гіпокотелю r-r- і дворічним циклом розвитку b-b- у міжвидових гібридів F2, отриманих за схемою гібридації закріплювачів стерильності цукрових буряків з диким видом *Beta maritima* L.: ♀B1C maritima / ♂ *Beta vulgaris* Nxxxz (Поїк М. В., 2013). У випадку міжвидових гібридів, в умовах інтродукційної стерильної цитоплазми *Beta patula* L., лише безросні потомства третього циклу насичуючих схрещувань ідентифіковані за однорічним і дворічним циклом розвитку. Насінні рослини BC3S patula, з дворічним циклом розвитку, характеризувались розлогіми стеблами, багатонасінними плодами (3,4 насінини) і стерильними пиляками. При цьому роздільноплідність і дворічний цикл розвитку вдалось відновити на фоні стерильної цитоплазми *Beta patula* L. лише серед насінних рослин четвертого циклу насичуючих схрещувань. Рекомбінантні генотипи з червоним забарвленням гіпокотелю і дворічним циклом розвитку BC4S patula R+r-b- характеризувались багатонасін-

ними плодами, химерністю за стерильністю ЧС-0 ЧС-1 типу й одно-та багатостебельними морфологічними типами насінників. Експресія ядерних генів ЦЧС у нових заміщених ліній BC5S patula відзначалась високими показниками стерильності ЧС-0 типу, проте показники роздільноплідності вимагали додаткової браковки багатоплідних насінних рослин. Це є показником складної структури локусу плідності у дикого виду *Beta patula* L. і особливої реакції ядерного геному закріплювача стерильності на новому цитоплазматичному фоні. Експериментальні триплоїдні гібриди з новою інтродукційною стерильною цитоплазмою *Beta patula* L. визначались високою цукристістю і вмістом сухих речовин до 29%. **Висновки** Створені алоплазматичні лінії на основі цитоплазми дикого виду *Beta patula* L. Проведено оцінювання їх за комплексом господарсько-цінних ознак як батьківських компонентів нових триплоїдних гібридів. Показники цукристості їх на рівні експериментальних триплоїдних гібридів мали значення 19,5% і 20,5% з вмістом сухої речовини на рівні 25% — 29%. Алоплазматичні лінії з новою ЦЧС *Beta patula* L. рекомендовано для використання в селекційному процесі цукрових буряків.

Ключові слова: цукрові буряки, ЦЧС (цитоплазматична чоловіча стерильність), природа стерильності, закріплювачі стерильності, рецесивні алелі, дикий вид *Beta patula* L. (о. Мадейра)..

Перелік скорочень

ІБКІЦБ НААНУ — Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків Національної академії аграрних наук України;

АП «Partec» — аналізатор плідності «Partec»;

ДНК — дезоксирибонуклеїнова кислота;

СТК — селекційно-тепличний комплекс;

ЯДСС — Ялтушківська дослідно-селекційна станція;

ВПДСС — Веселоподільська дослідно-селекційна станція;

БАП — 6-бензил-амінопурін;

ABSTRACT

Methods of creating substituted lines for hybrid selection of sugar beet: plants of the species beta vulgaris L. with new sterile cytoplasm of beta patula L.

M. V. Roik, N. S. Kovalchuk, S. O. Bondar, V. I. Vlasjuk, L. H. Fedoroshchak

Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet NAAS25 Klinichna St. Kyiv, 03110, Ukraine/E-mail: sugarbeet@ukr.net; www.sugarbeet.com.ua

Purpose. Due to changing climatic conditions and the spread of new viral diseases, an important issue in beet growing is the expansion of plasma culture using new sterile cytoplasm from wild species of the genus *Beta* L. as an alternative to Owen's S-cytoplasm. The goal of this work was to obtain new breeding genotypes based on new cytoplasm. **Methods.** Cytological, biotechnological, field and laboratory. **Results.** Availability of recombination in the locus of grafted genes of one-year and two-year development cycles B+b- and hypocotyl colour R+r- was determined using the method of analytical crosses. Earlier we have proved the positive effect of sterility maintainer *Beta vulgaris* Nxxxz in replacement of the sterility maintainer genome based on our results on the selection of hypocotyl of green color r-r- and two-year development cycle b-b- in the interspecific hybrids F2 obtained under the hybridization scheme *Beta maritima* L.: ♀B1C maritima / ♂ *Beta vulgaris* Nxxxz (Poik M. V., 2013). In the case of interspecific hybrids, in the conditions of sterile cytoplasm *Beta patula* L., only backcross offspring of the third cycle of saturating crosses were identified by one- and two-year developmental cycles. Seed bearing plants of BC3S patula of a two-year development cycle were characterized by spreading stems, multi-seeded fruits (3, 4 seeds) and sterile anthers. At the same time, monogermity and a two-year development cycle were restored against the background of sterile cytoplasm of *Beta patula* L. only among the seed bearing plants of the fourth cycle of saturating crosses. Recombinant genotypes with a red hypocotyl colour and a two-year development cycle BC4S patula R+r- were characterized by multigermity, chimericalness by sterility of CMS-1 and CMS-0 type and single- and multi-stem morphological types of anthers. The expression of CMS nuclear genes in the newly replaced BC5S patula lines was marked by high sterility rates of the CMS-0 type; however, the fertility rates required additional rejection of multigerm seed plants. This is an indicator of the complex structure of the fertility locus in wild *Beta patula* L. and the special response of the nuclear genome of the sterility maintainers to the new cytoplasmic background. Experimental triploid hybrids with the new introductory sterile cytoplasm *Beta patula* L. were determined by high sugar content and dry matter content up to 29%. **Conclusions.** Alloplasmic lines based on the cytoplasm of the wild species *Beta patula* L. are created. Their sugar content at the level of experimental triploid hybrids was 19.5% and 20.5% with a dry matter content of 25% — 29%. Alloplasmic lines with a new BCC *Beta patula* L. recommended for use in the selection process of sugar beets.

Keywords: sugar beet, CMS (cytoplasmic male sterility), nature of sterility, sterility maintainers, recessive alleles, wild species of *Beta patula* L. (Madeira Island).