

Поліплоїдія в історії селекції Ялтушківської дослідно-селекційної станції: нові методи диференціації і стабілізації тетраплоїдів цукрових буряків

М. В. Роїк¹, Н. С. Ковальчук^{1*}, Л. Г. Федорошак²

¹Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03110, Україна, *e-mail: natalakovalcuk461@gmail.com

²Ялтушківська дослідно-селекційна станція Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, с. Черешине, Барський р-н, Вінницька обл., 23021, Україна

Мета. Проаналізувати історію розвитку поліплоїдної селекції на Ялтушківській дослідно-селекційній станції (ЯДСС), зокрема вдосконалення генетичних моделей нових гібридів, нових способів індукції мейотичних тетраплоїдів, диференціації і добору селекційних матеріалів за рівнем плоїдності геному. **Методи.** Цитологічний аналіз метафазних хромосом апікальних меристем точок росту насінних рослин і буряків першого року для добору тетраплоїдних рослин $4x = 36$ хромосом; цитофотометричний аналіз з використанням комп'ютерних програм АП «Partec» для дослідження плоїдності за кількісним вмістом ядерної ДНК; польові методи (добір насінних рослин тетраплоїдів за типами пилкових зерен, формування синтетичних популяцій тетраплоїдних багатонасінних рослин на цитогенетичній основі за структурою бівалентної кон'югації хромосом-гомолів у мейозі. **Результати.** У процесі індукції тетраплоїдів цитологічні методи аналізу плоїдності на Ялтушківській ДСС були вдосконалені з використанням комп'ютерних програм АП «Partec» для добору буряків цукрових $4x$ за кількісним вмістом ядерної ДНК в клітині на рослинах першого року вегетації і для формування тетраплоїдних популяцій після індукції колхіцином на насінних рослинах. У процесі дослідження структури поліплоїдних популяцій за ступенем плоїдності відсоток тетраплоїдів змінювався від $82,0 \pm 2,22\%$ у запилювача Я/Ген до $58,1 \pm 2,81\%$ у запилювача Я/Ман. Встановлено, що добір за фертильністю і вирівняністю пилку залежить від генетичних особливостей селекційного матеріалу і впливає на пилкоутворювальну здатність у перших генераціях після індукції колхіцином, зменшуючи кількість біотипів $4x$ *IIa* і *IIb* типу за цитологічною класифікацією. На прикладі багатонасінного запилювача Я/Рой встановлено, що добір за цукристістю й урожайністю виявляє, певною мірою, стабілізуювальну дію за ступенем плоїдності. Використані біотехнологічні методи для депонування генотипів $4x$ із високим відсотком бівалентної кон'югації хромосом-гомолів у метафазі I мейозу (70–90%) сприяли цитогенетичній стабільності поліплоїдних гамет і високому їх виходу – 92,9% $4x$ у наступній генерації насіння. Досліджено, що продуктивність триплоїдних гібридів ЯДСС з використанням тетраплоїдного запилювача Я/ДА $4x$ на основі зародкової плазми дикого виду *Beta patula* на ранніх етапах вегетаційного розвитку змінювалась, залежно від селекційних номерів триплоїдних рослин, від 325 до 465 г, а цукристість у деяких номерів досягала 21,5%. **Висновки.** Розвиток поліплоїдної селекції на Ялтушківській дослідно-селекційній станції пройшов шлях від формування полігібридів до створення триплоїдних гібридів на ЧС основі з використанням тетраплоїдних багатонасінних запилювачів. Для формування популяцій тетраплоїдних багатонасінних запилювачів ЯДСС були застосовані методи флюорисцентної цитофотометрії з комп'ютерними програмами АП «Partec», біотехнологічні методи для створення синтетичних популяцій тетраплоїдних багатонасінних запилювачів на цитогенетичній основі, що забезпечують вихід тетраплоїдів у насінні до 92,9%.

Ключові слова: буряки цукрові; тетраплоїди; аналізатор плоїдності (АП «Partec»); багатонасінні запилювачі; полігібриди; хромосоми; метафаза I.

Вступ

Буряки цукрові, на противагу багатьом іншим культурам, не виявляють генетичного різноманіття форм. Тому, існує необхідність створення якісно нового вихідного матеріалу й пошуку ефективніших шляхів їх селекції [1]. Зміна принципів добору й формування сортів буряків цукрових стала можливою завдяки успішним дослідженням з класичної генетики [2]. Насамперед це вивчення закономірностей системи розмноження буряків цукрових (внутрішньовидової несумісності, цитоплазматичної спадковості, ознак одно- й багатоплідності та створення поліплоїдних форм [3]. З 1972 по 1978 рік робота з поліплоїдами на селекційній станції продовжувалась під керівництвом Г. А. Красовської. Селекційні зразки однонасінного сорту ялтушківської селекції було переведено на тетраплоїдний рівень. Сформовані чотири компоненти для схрещування з сортами-популяціями. Урожай коренеплодів полігібрида становив 65,9 т/га, а середні показники цукристості – 16,1 %. Добір серед тетраплоїдів першого року вегетації проводили за формою коренеплода, а серед буряків другого року – за продуктивністю насінників, стійкістю проти хвороб і формою насінника. Крім того, виявилось, що в триплоїдних гібридів не так різко проявлялася від'ємна кореляція між масою коренеплоду і вмістом цукру, що, зазвичай, спостерігається у тетраплоїдів [2].

У ці ж роки конкурентами полігібридів стали міжлінійні диплоїдні гібриди. Відкриття цитоплазматичної стерильності створило основу для реалізації у буряків цукрових чіткої селекційної програми з метою використання генетично регульованого гетерозису на диплоїдному рівні. Протягом двадцяти років поліплоїдна селекція у буряків цукрових не розвивалась. Поліплоїдія не знайшла широкого використання в селекційній роботі дослідно-селекційної станції, і в 1978 році лабораторія була закрита. Проте, двадцятирічний досвід багатьох зарубіжних компаній, які займаються селекцією й насінництвом буряків, довів, що цей напрям вітчизняної селекції незаслужено відступив на задній план.

Ринок насіння, а особливо конкуренція з «китами» селекції цукрових буряків у Європі, як-от КВС, Даніско-Сід, Бетасід, Хіллесгок, поставила завдання – створити такі запилювачі, які б значно підвищили продуктивність гібридів. Прийнятне вирішення цієї проблеми селекціонери України знайшли в новому напрямі селекції з використанням своїх екологічно пристосованих диплоїдних багатонасінних запилювачів як компонентів схрещування на тетраплоїдному рівні [1, 3].

Сьогодні на ринку як США, так і Європи представлені і диплоїдні і триплоїдні гібриди однонасінних буряків цукрових. Знання про методи роботи з поліплоїдами ще далекі до досконалого і потребують впровадження нових перспективних технологій давно визнаних у світовій селекції буряків цукрових [4, 5].

З 1990 року, за ініціативою академіка НААН, зав. відділом селекції ІБКіЦБ М. В. Роїка, для вдосконалення генетичних моделей нових триплоїдних гібридів на станції поновилися дослідження з питань експериментальної поліплоїдії з метою створення тетраплоїдних багатонасінних запилювачів на основі кращих високоцукристих диплоїдних ліній. У відділі селекції Ялтушківської ДСС створено сектор експериментальної поліплоїдії під керівництвом старшого наукового співробітника Л. Г. Федорова (рис. 1).

Об'єктивний аналіз ситуації в селекції експериментально створених поліплоїдів буряків цукрових, яка склалася на той час, свідчить про значні проблеми, пов'язані з низькою якістю насіння, складним насінництвом, анеуплоїдією. А тому метою наукових завдань з поліплоїдії було насамперед:

1. Дослідження нових способів індукції мейотичних тетраплоїдів, які забезпечують як високу фертильність, так і стабільність за плоїдністю в наступних генераціях насіння [5–7];
2. Удосконалення цитологічних методів ідентифікації плоїдності і впровадження новітніх технологій стабілізації рівня геному за кількістю ядерної ДНК;
3. Використання біотехнологічних методів для індукції тетраплоїдних багатонасінних запилювачів та клональне мікророзмноження селекційно-цінних генотипів 4х.



Рис. 1. Керівник лабораторії експериментальної поліплоїдії і апоміксису, старший науковий співробітник Л. Г. Федорошак, старший науковий співробітник М. Н. Хіміч, лаборанти Г. І. Ковтонюк і К. Б. Гребенюк визначають плоідність багатонасінних запилювачів буряків цукрових з використанням мікроскопів «Carl Zeiss» (Німеччина) і «Polam» (Польща)

Матеріали та методика досліджень

Як вихідний матеріал використовували багатонасінні буряки цукрові Ялтушківської селекції, в тому числі і високоцукристий сорт 'Ялтушківський 116'.

Мінливість за ступенем плоідності вивчалась у експериментальних поліплоїдних популяціях походження Ялтушківської ДСС після індукції колхіцином: Я/Віт, Я/Вол, Я/Ман, Я/Рой, Я/Ген.

На прикладі поліплоїдної популяції багатонасінного запилювача Я/Рой досліджували вплив способів добору за цукристістю і врожайністю на структуру експериментального матеріалу за рівнем плоідності геному. Для впровадження нового способу стабілізації тетраплоїдних багатонасінних запилювачів на цитогенетичній основі з використанням біотехнологічних методик були відібрані насінні рослини $4x$ запилювача Я/Рой за *Ia* типом пилкових зерен.

Продуктивність експериментальних триплоїдних гібридів ЯДСС на фоні стерильної цитоплазми походженням від дикого виду *Beta patula* L. вивчали з використанням тетраплоїдного запилювача ЯДСС Я/ДА $4x$.

Для хромосомного аналізу і добору тетраплоїдів після індукції колхіцином була використана методика оцетоорсеїнового забарвлення мітотичних хромосом на стадії метафази як буряків першого року вегетації, так і апікальних меристем насінних рослин [8, 9]. Підрахунок хромосом у польових вегетуючих рослин і клональних ліній із культури *in vitro* проводили з використанням мікроскопів «Carl Zeiss» (Німеччина) і «Polam» (Польща) за збільшення 15×100 .

Методика дослідження пилкоутворюючої здатності тетраплоїдних рослин під час цвітіння і добір високофертильних біотипів $4x$ проводили згідно з цитологічною класифікацією за чотирма біотипами насінних рослин $4x$, викладеної в ДСТУ 7002:2009 [9]. Виділяли рослини *Ia*, *Ib*, *II2a*, *II2b* типу за розміром, фертильністю і стерильністю пилкових зерен. Хромосоми на стадії метафази і мейозу в тетраплоїдного запилювача Я/ДА після індукції колхіцином і пилкові зерна $4x$ насінних рослин *Ia*-типу зображено на рисунку 2.

Класичні методи стабілізації поліплоїдів за кількістю хромосом у клітинах апікальних меристем, а також за розмірами й фертильністю пилкових зерен були вдосконалені впровадженням у селекційний процес новітніх технологій флуоресцентної цитометрії [10]. На рисунку 3 зображено аналізатор плоідності АП «Partec», який дозволяє значно збільшити

обсяги досліджень, і гістограми тетраплоїдного і триплоїдного рівня геному, визначених за масою ядерної ДНК в клітинах листків експериментальних поліплоїдних рослин.

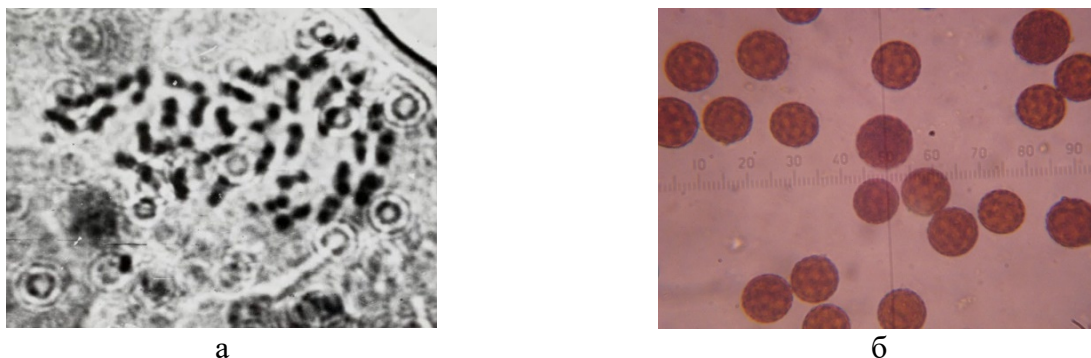
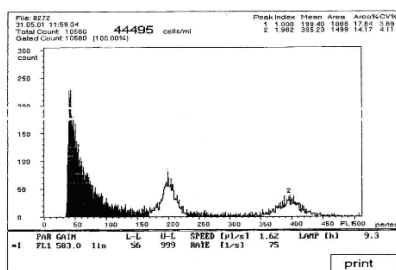


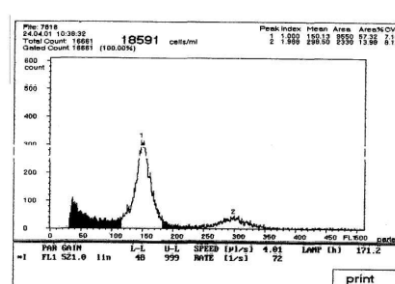
Рис. 2. Метафазні хромосом після скорочення 8-орто-оксихіноліном і тетраплоїдних пилкових зерен Іа-типу в запилювача Я/ДА 4х: а) 36 хромосом тетраплоїдних насінних рослин за 36.12, 5 × 90; б) дослідження розміру пилкових зерен індукованих колхіцином нових тетраплоїдів 36, 12,5 × 20



а



б



в

Рис. 3. Аналізатор плоїдності АП «Partec» і гістограми триплоїдних і тетраплоїдних рослин, визначених за кількістю ядерної ДНК в клітині: а) аналізатор плоїдності АП «Partec»; б) тетраплоїдний рівень геному в буряків цукрових на гістограмі ядерної ДНК; в) триплоїдний рівень геному, визначений за масою ядерної ДНК в клітині

Сьогодні питання про переведення на тетраплоїдний рівень кращих селекційних номерів буряків цукрових $2x$ на дослідно-селекційній станції, в принципі, вирішено. Опубліковано ряд методів, де найефективнішим поліплоїдизувальним фактором є колхіцин, користуючись яким в умовах *in vitro* та *in vivo* отримано досить задовільні результати [11]. Наступний етап, що включає добір і стабілізацію за рівнем геному експериментально створених тетраплоїдів, а також селекцію відтворення тетраплоїдних компонентів і районованих триплоїдних гібридів, є досить тривалим і затратним. Результативність цих досліджень визначає високий відсоток тетраплоїдів у насіннєвому потомстві наступної генерації.

У процесі селекції нових тетраплоїдних запилювачів розроблені радикальні підходи і нові способи, які забезпечують високу однорідність і стабільність за ступенем плоїдності триплоїдних гібридів на ЧС основі. Саме високий рівень гетерозиготності за структурою хромосом є запорукою їх бівалентної кон'югації, і зрештою – чистоти за рівнем геному гібридного насіння.

Розроблений новий спосіб формування синтетичних популяцій тетраплоїдних багатонасінних запилювачів на цитогенетичної основі за структурою бівалентної кон'югації хромосом гомологів в мейозі [7].

Спосіб включає:

- добір високофертильних, вирівняних за розміром поліплоїдних пилкових зерен насінних рослин і тиражування їх методом клонального мікророзмноження;

- фіксація пагонів на стадії ранньої бутонізації для дослідження метафази I мейозу у відібраних за фертильністю і розмірами біотипів 4x;
- цитогенетичний аналіз мейозу за структурою бівалентів, тетравалентів, тривалентів за збільшення мікроскопічних об'єктів кратні 12 × 90;
- клональне мікророзмноження селекційно-цінних генотипів 4x;
- укорінення в ґрунті і формування популяцій 4x на основі клональних ліній.

Для визначення достовірності проведених досліджень проводили підрахунок похибки, використовуючи методики статистичного аналізу [12]. Похибку репрезентативності m у відсотках визначали за формулою:

$$m = \pm \sqrt{\frac{P(100 - P)}{n}}$$

де P – відсоток експериментальних номерів, визначених за диплоїдним, триплоїдним і тетраплоїдним рівнями плоїдності геному, і насінних рослин, визначених за *Ia*, *Iб*, *IIa*, *IIб* типами пилку; n – обсяги дослідження експериментальних номерів в поліплоїдній популяції. Статистичний аналіз дослідних даних продуктивності експериментальних триплоїдних гібридів з використанням тетраплоїдного запилювача Я/ДА був проведений за допомогою програми Statistica 10 [12].

Результати досліджень

Застосування методів флюорисцентної цитофотометрії і комп'ютерних програм АП «Partec» дало можливість проводити диференціацію за ступенем плоїдності експериментальних популяцій після індукції колхіцином, не порушуючи тканину апікальних меристем, використовуючи легкодоступний об'єкт для аналізу – листки вегетуючих рослин буряків цукрових, і цим самим значно збільшити обсяги досліджень (табл. 1).

Таблиця 1

Структура поліплоїдних популяцій* Ялтушківської ДСС за ступенем плоїдності (2001–2003 рр.)

Племінне визначення	Рослин, шт.	Структура популяцій за рівнем геному, %				Проаналізовано	Із них за типом пилку, ** %			
		2n, P±m	3n, P±m	4n, P±m	Анеуплоїди, P±m		Ia 26–32 мкм, P±m	Iб 14–38 мкм, P±m	IIa 8–28 мкм, P±m	IIб 68–38 мкм, P±m
Я/Віт, 2003р.	376	0,3±0,28	26,3±2,27	72,0±2,32	0,5±0,36	165	18,8±3,04	68,4±3,62	11,0±2,44	1,8 ±1,04
Я/Вол, 2003р.	230	–	16,1±2,42	82,6±2,50	1,3±0,75	185	25,4±3,20	62,7±3,56	10,8±2,28	1,1±0,77
Я/Ман, 2003р.	308	–	14,39±2,0	58,1±2,81	27,5±2,54	185	54,2±3,66	39,0±3,59	1,5±0,89	5,3±1,65
Я/Рой, 2001р.	300	2,0±0,81	20,0±2,31	78,0±2,39	–	234	12,0±2,12	78,0±2,71	10,0±1,96	–
Я/Рой, 2003р.	195	4,6±1,50	21,6±2,95	73,8±3,15	–	54	5,6±3,13	66,77±6,41	16,7±5,05	11,0±4,26
Я/Ген, 2001р.	300	4,0±1,13	8,0±1,57	82,0±2,22	–	246	7,0±1,63	68,0±2,97	23,0±2,68	2,0±0,89
Я/Ген, 2003р.	312	–	29,8±2,59	70,2±2,59	–	147	28,6±3,73	53,0±4,12	18,4±3,20	–

*Структура поліплоїдних популяцій – співвідношення рослин з різним ступенем плоїдності.

**Тип пилку – диференціація рослин за розмірами пилкових зерен.

Серед досліджених за рівнем плоїдності геному і за гістограмами ядерної ДНК АП «Partec» насінних рослин експериментальної поліплоїдної популяції, тетраплоїди становили від 58,1±2,81 % до 82,6±2,50 %. У структурі популяції кількість анеуплоїдів була від 0,5±0,36 % до 27,5±2,54 %. Добір за фертильністю і вирівняністю пилку залежав від генетичних особливостей селекційного матеріалу. Встановлено, що добір за пилкоутворюючою здатністю, особливо в перших генераціях після індукції колхіцином, зменшує кількість низькофертильних біотипів 4x *IIa* і *IIб* типу за цитологічної класифікацією [4, 9]. Крім того, як показано в табл. 2, селекційний добір за цукристістю й урожайністю виявив, певною мірою, стабілізуючу дію за ступенем плоїдності. На прикладі поліплоїдної

популяції багатонасінного запилювача Я/Рой підтверджено, що найпоширенішим способом регулювання експресії генів у тетраплоїдних рослин $4x$ є валентність ядра, яка є внутрішнім механізмом багатьох біохімічних і фізіологічних процесів [4].

Таблиця 2

Мінливість структури геному експериментальної поліплоїдної популяції Я/Рой залежно від методів селекційного добору (1999 р.)

№ п/п	Походження селекційних номерів багатонасінного запилювача Я/Рой	Кількість рослин, шт.	Із них за плоідністю, %				
			2n P±mp	3n P±mp	4n P±mp	Анеуплоїдів, P±mp	Міксо- плоїдів, P±mp
1	Вихідна поліплоїдна популяція, 1.Я/Рой: 1999	706	0,1±0,14	28,78±1,70	60,94±1,84	9,24±0,97	0,94±0,79
2	Педігрі Z* 98-357	30	–	–	95,2±4,56	4,8±3,9	–
3	Педігрі Z 97-509	46	–	–	83,6±5,59	16,4± 5,41	–
4	Педігрі Z 98-343	104	–	–	85,61±3,56	14,39±3,42	–
5	Педігрі Z 98-349	34	–	–	100	–	–
6	Педігрі Z 98-348	60	–	–	86,7±3,67	13,3± 4,21	–
7	Педігрі Z 98-347	138	–	–	87,5±3,01	12,5± 2,8	–
8	Педігрі Z 98-203	192	–	–	86,45±2,48	13,55±2,48	–
9	Педігрі E** 98-203	180	–	–	90±2,24	10± 2,24	–
10	Педігрі E 98-357	38	–	–	89,47±4,98	8±4,4	–
11	Супереліта E 98-203	122	1,6±1,14	–	64,5±4,30	33,9±4,35	–

*Z – група рослин після літнього добору за вмістом цукру;

** – група рослин після літнього добору за масою коренеплоду.

За допомогою методу індивідуального добору було показано, що серед педігрі урожайного й цукристого напрямків виділялись 13,5–16,0 % анеуплоїдів, а їх кількість перевищувала для деяких індивідуальних селекційних номерів їх частку у вихідній поліплоїдній популяції. Встановлено, що аналіз за фізіологічними показниками впливає на стабілізацію рівня геному, часто виділяючи при цьому із поліплоїдної популяції до 100 % тетраплоїдів.

За результатом спільних досліджень лабораторії цитогенетики й відділу селекції, у процесі створення популяцій багатонасінних запилювачів Ялтушківської ДСС було розроблено спосіб формування синтетичних тетраплоїдних популяцій на цитогенетичній основі [7, 8]. На ЯДСС цим способом були сформовані в умовах групових ізоляторів синтетичні популяції тетраплоїдних багатонасінних запилювачів Я/Рой і Я/ДА. Синтетична популяція Я/Рой була сформована з 50 коренеплодів тетраплоїдної форми, п'яти клональних ліній (№ 4, 7, 16, 31, 32). Результативність добору вивчали на буряках першого року вегетації як за кількістю хромосом, так і з використанням аналізатора плоідності АП «Partec» (табл. 3).

Відбирали тетраплоїдні рослини, вирівнянні за фертильністю і розміром пилоквих зерен. Вводили в культуру *in vitro* квітоносні пагони за методикою, розробленою в лабораторії біотехнології ІБКіЦБ [13]. Тиражували і вкорінювали лише експланти з високим відсотком бівалентної конюгації хромосом гомологів в метафазі I мейозу (70–90 %). Як показують дані таблиці 3, такий добір сприяє цитогенетичній стабільності поліплоїдних гамет – (диплоїдизації тетраплоїдів за структурою бівалентів) і високому їх виходу в наступній генерації насіння – 92,9 % $4x$, при цьому кількість анеуплоїдів не перевищувала 2,1 %.

Таблиця 3

Вплив способів добору на структуру за рівнем геному поліплоїдної популяції багатонасінного запилювача буряків цукрових Я/Рой (2006 р.)

№ п/п	Походження насінневого матеріалу	Спосіб добору насінників 4x	Кількість рослин, шт.	Аналіз плоідності, * %				
				2n P±mp	3n P±mp	4n P±mp	анеуплоїди P±mp	міксоплоїди P±mp
1	Я/Рой ЯДСС	1a, 1б **	706	0,1±0,1	28,7±1,7	60,9±3,37	9,2±1,09	0,9±0,36
2	Я/Рой ЯДСС	Клональні лінії*** № 7; 31; 32; 16; 4	282	–	0,3±0,20	92,9±1,53	2,1±0,85	4,6±1,25

* Аналіз плоідності проведений на АП «Partec» за кількісним вмістом ядерної ДНК в клітині;

** 1a, 1б – добір насінників 4x за класифікацією Н. Е. Зайковської;

*** 7, 31, 32, 16, 4 – добір насінників 4x за результатами цитогенетичного аналізу мейозу.

На рисунку 4 зображено структуру хромосом гомологів в метафазі I мейозу в тетраплоїдній лінії багатонасінного запилювача Я/Рой і мікроклональне розмноження відібраних тетраплоїдів.

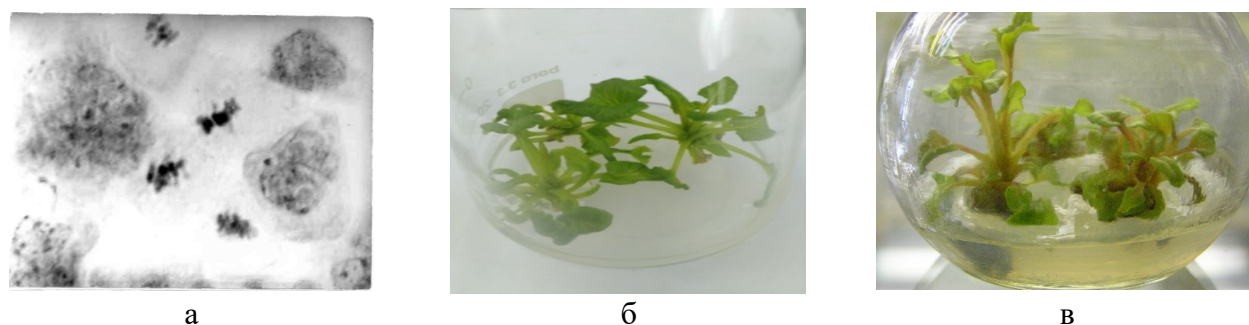


Рис. 4. Добір селекційних матеріалів тетраплоїдної форми за структурою бівалентної коньюгації хромосом в мейозі: а) метафаза I мейозу в тетраплоїдної форми буряків цукрових; б) диплоїдні біотехнологічні лінії *in vitro*; в) тетраплоїдна біотехнологічна лінія запилювача Я/Рой *in vitro*

За результатами впровадження методів створення стабілізації і відтворення тетраплоїдних багатонасінних запилювачів в селекційному процесі ЯДСС розроблено ДСТУ 7002:2009 та ДСТУ 8200:2015 [6, 9].

Серед нових гібридів буряків цукрових, занесених до реєстру сортів України, є триплоїдні, у яких батьківськими компонентами схрещування є багатонасінні запилювачі, і які перевищують стандарт за урожайністю коренеплодів на 112,6 % і збором цукру на 113,9 %. Досліджена продуктивність на ранніх стадіях вегетативного розвитку експериментальних триплоїдних гібридів ЯДСС на основі нової зародкової плазми дикого виду *Beta patula* L. з тривалістю вегетації 4–5 місяців [14]. Маса коренеплодів змінювалась залежно від селекційних номерів триплоїдних рослин від 325 до 465 г. Уміст сухої речовини для деяких номерів мав значення 29,5 %, а цукристість – 21,5 %. Показники кондуктометричної золи у триплоїдних гібридів змінювались від 0,328 до 0,528 %.

За результатами досліджень, висока продуктивність триплоїдних гібридів на ранніх етапах вегетативного розвитку забезпечується не тільки гетерозисним ефектом триплоїдного геному, але й за рахунок комбінаційної здатності батьківських форм [3, 15]. У зв'язку з цим робота з селекції триплоїдних гібридів може бути розділена на два етапи, які відрізняються своїм завданням і методами: перший – створення та оцінка тетраплоїдних форм буряків, як вихідного матеріалу для селекції; другий – оцінка компонентів схрещування за комбінаційною здатністю з метою одержання високогетерозисних гібридів.

Нові триплоїдні гібриди з використанням кращих тетраплоїдних ліній занесені до Реєстру сортів України. Сьогодні в лабораторії апоміксису і поліплоїдії Ялтушківської ДСС

проводиться стабілізація за рівнем плоідності базових популяцій тетраплоїдних багатонасінних запилювачів, компонентів гібридів на ЧС основі, використовуються методи валентних схрещувань $4x \times 2x$, $3x \times 3x$ для індукції мейотичних тетраплоїдів з метою передачі кращих ознак маси коренеплодів і цукристості у міжвидових і міжродових схрещуваннях.

Використана література

1. Роїк М. В., Перетятко В. Г. Генетика і її вплив на селекцію цукрових буряків. *Цукрові буряки*. 2000. № 2. С. 6–7.
2. Vormotov V. E. Autopolyploidy and fertility. *Tag.Ber., Akad. Zandwirtsch.* Berlin (DDR). 1976. P. 51–62.
3. Deuter M., Fischer H., Melzer R. Zur Probnatik der Verbesserung der Keimfahigkeit poluploider Zuckerruben auf genetischen and zutologischen Grundlage. *Der Internationalen arbeitstagund vom 20 bis 24. October.* Berlin. 1976. P. 170–176.
4. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Федорошак Л. Г. та ін. Нові методи диференціації і добору тетраплоїдних багатонасінних запилювачів. *Вісник аграрної науки*. 2007. № 3. С. 55–59.
5. Dittrich W. 1971: Impulsfluorometric – ein neuartiges Durchflubverfakreu zur ultraschnellen Mengen bestimmung von Zellinhaltsstoffen. a) Vortrag XIII. Symp.d.Ges.f. Histochemil, 1969. Gras. b) Acta histochem. 1971 (jena) Suppl. X. 429.
6. ДСТУ 8200:2015. Буряки цукрові. Методи створення тетраплоїдних багатонасінних запилювачів. Київ : Держстандарт України, 2017. 15 с.
7. Держпатент. Спосіб формування синтетичних популяцій у цукрових буряків на цитогенетичній основі. Україна (19) № 3835. (51) 7 A01p4/00,15.12.2004. Бюл. №12).
8. Bosermark N. O. On the origin and consequences of aneuploidy in triploid and tetraploid sugar beets. *Journal of the IIRB. Rosenhof.* 1966. Vol. 2. P. 9–34.
9. ДСТУ 7002:2009. Буряки цукрові. Поліплоїдні. Насіння. Методи визначення однорідності і стабільності за ступенем плоідності. Київ : Держстандарт України, 2009. 14 с.
10. Роїк М. В., Ковальчук Н. С. Аналіз мінливості рівня плоідності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технології аналізатора плоідності «Partec». Методичні рекомендації. Київ, 2006. 40 с.
11. Дубровна О. В., Лялько І. І. Цитогенетична мінливість рослин-регенерантів цукрових буряків, отриманих шляхом прямої регенерації з експлантів різної плоідності. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2004. С. 54–59.
12. Присяжнюк О. І., Каражбей Г. М., Лещук Н. В. та ін. Статистичний аналіз агрономічних дослідних даних в пакеті Statistica 10 : методичні вказівки. Київ : Нілан-ЛТД, 2016. 60 с.
13. ДСТУ 6055:2008. Буряки цукрові. Методи отримання розсади клональним мікророзмноженням. Київ : Держстандарт України, 2010. 11 с.
14. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Балагура О. В. та ін. Дослідження адаптаційного потенціалу нових стерильних цитоплазм *Beta patula* і *B. maritima* L. від диких видів роду *Beta* L.: зимостійкість і показники раннього закладання цукрів в інтродукційних алоплазматичних ліній. *Новітні агротехнології*. 2023. Т. 11, № 1. doi: 10.47414/na.11.1.2023.279933
15. Роїк М. В., Ковальчук Н. С. Проблема ідентифікації рівня геному трансгенних триплоїдних гібридів цукрових буряків. *Генетично модифіковані рослини: перспективи та проблеми*. Київ, 2003. С. 120–126.

References

1. Roik, M. V., & Peretiatko, V. H. (2000). Genetics and its influence on the sugar beet breeding. *Sugar Beet*, 2, 6–7. [In Ukrainian]
2. Vormotov, V. E. (1976). Autopolyploidy and fertility. *Tag. Ber., Akad. Zandwirtsch. Berlin (DDR)*, 51–62.
3. Deuter, M., Fischer, H., & Melzer, R. (1976). Zur Probnatik der Verbesserung der

Keimfähigkeit poluploider Zuckerruben auf genetischen and zutologischen Grundlage. *Der Internationalen arbeitstagund vom 20 bis 24. October. Berlin*, 170–176.

4. Roik, M. V., Kovalchuk, N. S., Fedoroshchak, L. H., Khimich, N. V., & Harmatiuk, N. V. (2007). New methods for differentiation and selection of tetraploid multigerm pollinators. *Bulletin of Agricultural Science*, 3, 55–59. [In Ukrainian]

5. Dittrich, W. (1971). Impulsfluorometric – ein neuartiges Durchflubverfakreu zur ultraschnellen Mengen bestimmung von Zellinhaltsstoffen. *Acta histochem (jena) Suppl.* X. 429.

6. *State Standard of Ukraine 8200:2015. Sugar beet. Methods of obtaining tetraploid multigerm pollinators.* (2017). Kyiv: Derzhstandart. [In Ukrainian]

7. Method of obtaining synthetic populations of sugar beet on the cytogenetic basis (2010). *State Standard of Ukraine (19) No: 3835 (51) 7 A01p4/00,15.12.2004.* Bulletin 12.

8. Bosemark, N. O. (1966). On the origin and consequences of aneuploidy in triploid and tetraploid sugar beets. *Journal of the IIRB*, 2, 9–34.

9. *State Standard of Ukraine 7002:2009. Sugar beet, polyploid, seeds: Methods of determination of uniformity and stability be the level of ploidy.* (2009). Kyiv: Derzhstandart. [In Ukrainian]

10. Roik, M. V., & Kovalchuk, N. S. (2006). Analysis of variability of the ploidy level of sugar beet breeding genotypes using Partec ploidy analyzer: guidelines. Kyiv: N. p. [In Ukrainian]

11. Dubrovna, O. V., Lialko, I. I., & Roik M. V. (Ed.). (2004). Cytogenetic variability of regenerated sugar beet plants obtained through direct regeneration from explants of different ploidy. *Factors of experimental evolution of organisms.* Kyiv: N. p. [In Ukrainian]

12. Prysiashnyuk, O. I., Karazhbei, H. M., Leshchuk, N. V., Tsyba, S. V., Mazhuha, K. M., Brovkin, V. V., ... Maslechkin, V. V. (2016). *Statistical analysis of agronomic experimental data using Statistica 10. Guidelines.* Kyiv: Nilan-LTD. [In Ukrainian]

13. *State Standard of Ukraine 6055:2008. Sugar beet. Method of obtaining seedlings by clonal micropropagation.* (2010). Kyiv: Derzhstandart. [In Ukrainian]

14. Roik, M. V., Kovalchuk, N. S., Balahura, O. V., Prysiashniuk, O. I., Boiko, I. I., Zinchenko, O. A., Bekh, N. S., Vlasiuk, L. H., Fedoroshchak S. D., & Orlov, S. D. (2023). Study of adaptive potential of new sterile cytoplasm *Beta patula* and *Beta maritima* belonging to wild species of *Beta* L. *Advanced Agritechnologies*, 11(1). doi: 10.47414/na.11.1.2023.279933

15. Roik, M. V., & Kovalchuk, N. S. (2003). The problem of genome-level identification of transgenic triploid sugar beet hybrids. *Genetically modified plants: prospects and problems* (pp. 120–126). Kyiv: N. p. [In Ukrainian]

UDC 633.63:631.52

Roik, M. V.¹, Kovalchuk, N. S.^{1*}, & Fedoroshchak, L. H.² (2023). Polyploidy in the history of breeding at the Yaltushkiv Experimental Breeding Station: new methods of differentiation and stabilisation of sugar beet tetraploids. *Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet*, 31, 18–27. [In Ukrainian]

¹*Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet, NAAS of Ukraine, 25 Klinichna St., Kyiv, 03110, Ukraine, *e-mail: natalakovalcuk461@gmail.com*

²*Yaltushkiv Experimental Breeding Station of the IBCSB, Cheresheve, Bar district, Vinnytsia region, 23021, Ukraine*

Purpose. To analyse the history of the polyploid breeding at the Yaltushkiv Experimental Breeding Station, in particular the improvement of genetic models of new hybrids, new methods of induction of meiotic tetraploids, differentiation and selection of breeding genotypes by genome ploidy. **Methods.** Cytological analysis of metaphase chromosomes of the apical meristems of the growth points of seed plants and beets of the first year for the selection of tetraploid plants $4x = 36$ chromosomes; cytophotometric analysis using computer programs AP Partec to study ploidy based on the quantitative content of nuclear DNA; field methods (selection of tetraploid seed plants according to the types of pollen grains, formation of synthetic populations of tetraploid multigerm plants on a cytogenetic basis according to the structure of bivalent conjugation of homologous

chromosomes in meiosis. **Results.** In the process of tetraploid induction, cytological methods of ploidy analysis at the station were improved using computer programs of AP Partec for the selection of sugar beets $4x$ by the quantitative content of nuclear DNA in the cell on plants of the first year of vegetation and for the formation of tetraploid populations after colchicine induction in seed plants. In the process of studying the structure of polyploid populations by ploidy, the percentage of tetraploids varied from $82.0 \pm 2.22\%$ in Ya/Hen pollinator to $58.1 \pm 2.81\%$ in Ya/Man pollinator. It was established that the selection for fertility and pollen uniformity depends on the genetic characteristics of the breeding genotypes and affects the pollen-forming ability in the first generations after induction with colchicine, reducing the number of $4x$ *Ila* and *Iib* biotypes according to cytological classification. Using the example of the multigerm pollinator Ya/Roi, it was established that selection for sugar content and productivity had, to a certain extent, a stabilising effect on the degree of ploidy. The biotechnological methods used to deposit $4x$ genotypes with a high percentage of bivalent conjugation of homologous chromosomes in metaphase I of meiosis (70–90%) contributed to the cytogenetic stability of polyploid gametes and their high yield – 92.9% of $4x$ in the next generation of seeds. It was investigated that the productivity of triploid hybrids obtained with the use of the tetraploid pollinator Ya/DA $4x$ based on the germplasm of the wild species *Beta patula* at the early stages of vegetative development varied in triploid plants from 325 to 465 g, and the sugar content in some numbers reached 21.5%. **Conclusions.** The development of polyploid selection at the Yaltushkiv Experimental Breeding Station evolved from the development polyhybrids to the development of triploid hybrids based on CMS using tetraploid multigerm pollinators. For the formation of populations of tetraploid multigerm pollinators, the methods of fluorescent cytophotometry and computer programs AP Partec were used, as well as biotechnological methods for creating synthetic populations of tetraploid multigerm pollinators on a cytogenetic basis, which ensure the yield of tetraploids in seeds up to 92.9%.

Keywords: *sugar beets; tetraploids; ploidy analyser AP Partec; multigerm pollinators; polyhybrids; chromosomes; metaphase I.*

Надійшла / Received 18.08.2023

Погоджено до друку / Accepted 12.09.2023