

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

ДУБРОВНА ОКСАНА ВАСИЛІВНА

ЦИТОГЕНЕТИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ  
ЦУКРОВОГО БУРЯКА З РІЗНОЮ КОМБІНАЦІЙНОЮ ЗДАТНІСТЮ

03.00.15 - генетика

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00755905 (V)

АВ 31.489

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетичних основ гетерозису Інституту фізіології рослин і генетики НАН України

Науковий керівник – доктор біологічних наук,  
професор  
І. А. Шевцов

Офіційні опоненти – доктор біологічних наук,  
професор  
С. С. Малуца

кандидат біологічних наук  
Т. Н. Чеченева

Провідна організація – Інститут цукрових буряків УААН, м. Київ

Захист відбудеться 29 грудня 1994 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою 252143, Київ -143, вул. Заболотного, 148.

Автореферат розіслано "28" листопада 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
кандидат біологічних наук

Л. В. Малишева

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність досліджень.** Високогетерозисні гібриди отримують за допомогою схрещувань самозапилених ліній, які мають високу комбінаційну здатність. Польова оцінка комбінаційної здатності пов'язана з великим обсягом робіт, тим більше, що генотипи з високою комбінаційною здатністю зустрічаються рідко. Отож, пошуки найбільш інформативних методів оцінки самозапилених ліній набувають особливого значення для прискорення селекційного процесу. Ця проблема дуже вагома для цукрового буряка, який має дворічний цикл розвитку.

Слід зазначити, що переважна більшість досліджень самозапилених ліній виконана на популяційному, організменному рівні організації рослин. Показано, що інбредні лінії з різною комбінаційною здатністю розрізняються між собою за фізіологічними, біохімічними та молекулярно-генетичними ознаками (Muntz, 1986; China, Phul, 1987; Марченко и др., 1989; Кирсанова, 1992). Цитогенетичні особливості, відмінності, які існують між рослинами на клітинному рівні, досліджені недостатньо. Разом з тим, визначення цитогенетичних, цитофізіологічних та цитохімічних ознак самозапилених ліній нарівні з іншими параметрами рослин сприяє більш детальній і різнобічній оцінці досліджуваного матеріалу та поглибленню уявлень про природу комбінаційної здатності. Цитологічні методи відносно швидко дозволяють виявити характерні особливості вивчаємих форм вже на ранніх етапах онтогенезу рослин, що свідчить про можливість їх застосування в прикладних цілях для порівняльного аналізу селекційного матеріалу і відбору перспективних форм.

**Мета і задачі досліджень.** Метою досліджень було вивчення морфологічних, цитогенетичних та цитофізіологічних особливостей

самоzapилених ліній цукрового буряка з різним рівнем комбінаційної здатності та з'ясування можливості їх застосування в практичній роботі.

У зв'язку з цим передбачалось:

- охарактеризувати морфологічні та господарські ознаки досліджуваних самоzapилених ліній;
- провести цитогенетичний аналіз інбредних ліній;
- визначити вміст ДНК в клітинах самоzapилених ліній з високою та низькою комбінаційною здатністю;
- дослідити функціональний стан ядра та ядерцеутворюючих хромосом як візуальних показників активності генів рРНК;
- проаналізувати морфометричні показники та співвідношення розмірів клітини, ядра та ядра у самоzapилених ліній.

**Наукова новизна та практична цінність роботи.** Вперше проведено комплексне порівняльне вивчення морфологічних, цитогенетичних та цитофізіологічних ознак самоzapилених ліній цукрового буряка, які мають різний рівень комбінаційної здатності. Розроблена і запропонована система відбору перспективних для гетерозисної селекції інбредних ліній, яка базується на аналізі: характеру поділу клітин кореневої меристеми, диференціальної активності ядерцеутворюючих районів хромосом, вмісту ДНК в ядрі, а також морфологічних ознак листа на ранніх стадіях розвитку рослин. Показана наявність міксоплоїдії та хромосомних перебудов в клітинах кореневої меристеми самоzapилених ліній. У ліній з високою комбінаційною здатністю виявлені додаткові ядерцеутворюючі райони хромосом, більші розмір та кількість ядерць, що може свідчити про підвищену функціональну активність генів рРНК. Досліджений вплив тривалого інбридингу на цитогенетичні показники самоzapилених ліній. Отримані дані можуть бути застосовані в практичній се-

лекції як лабораторні експрес-методи з метою відбраковування безперспективних селекційних форм та виділення господарсько-цінних ліній.

**Положення, які виносяться на захист:**

- за морфологічними ознаками листа на ранніх стадіях розвитку рослин можливо проводити попередній відбір самозапилених ліній;
- за характером поділу клітин кореневої меристеми інбредних ліній можливо відбраковувати неперспективні для гетерозисної селекції генотипи;
- для ліній з високою комбінаційною здатністю характерна наявність поліплоїдних клітин в кореневій меристемі;
- лінії, які мають високий рівень комбінаційної здатності, відрізняються підвищеною функціональною активністю ядерцевих утворювачів хромосом;

**Конкретна особиста участь дисертанта** у виконанні поданої роботи полягає в розробці робочої гіпотези, участі в підготовці та проведенні експериментів, аналізі та інтерпретації одержаних результатів. Всі експериментальні дані, приведені в дисертації, одержані безпосередньо автором і являються оригінальними.

**Апробація роботи.** Робота виконувалася за планом науководослідних робіт інституту. Матеріали дисертації представлені на: Всесоюзній нараді "Застосування гетерозису в практичній селекції сільськогосподарських культур" (Київ, 1986); Республіканській конференції "Гетерозис /теорія і практика /" (Харків, 1988); Всесоюзній нараді "Часна генетика рослин" (Київ, 1989); Всесоюзній науковій конференції "Онтогенетика вищих рослин" (Кишинів, 1989); VII Всесоюзному симпозіумі "Молекулярні механізми генетичних процесів" (Москва, 1990); Республіканській ко-

конференції "Методи інтенсифікації селекційного процесу" (Одеса, 1990); Конференції молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин та генетики" (Київ, 1992); VI з'їзді Українського товариства генетиків і селекціонерів (Полтава, 1992) **Публікації**. За матеріалом досліджень, представлених в дисертації, опубліковано 8 робіт.

**Обсяг і структура роботи**. Дисертація викладена на 158 сторінках машинописного тексту. Складається з вступу, семи глав, заключення, висновків, списку літератури (274 найменування, в тому числі 143 на іноземних мовах). Містить 27 таблиць та 15 рисунків.

#### **МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

Матеріалом досліджень були 90 інбредних ліній цукрового буряка другого- дев'ятого покоління самозапилення, отриманих у відділі генетичних основ гетерозису ІФРІГ НАН України, закладених на сортах і гібридах вітчизняної та зарубіжної селекції. Лінії одержували в результаті примусового самозапилення рослин із застосуванням індивідуальних ізоляторів (Шевцов, 1983). Загальну комбінаційну здатність (ЗКЗ) визначали методом топкросів. Класифікували лінії за загальною комбінаційною здатністю згідно відхилення гібрида від середньої продуктивності всіх вивчених гібридів по шкалі оцінок ЗКЗ (Шевцов и др., 1983).

Цитогенетичний аналіз рослин проводили на тимчасових препаратах без застосування колхіцину. Зародкові корінці фіксували в суміші етанол - крижана оцтова кислота (3:1) при зниженій температурі протягом доби. Мацерацію здійснювали в 5N HCl при кімнатній температурі (30 хвилини). Забарвлювали

препарати 2% лактопропіоновим орсеїном (Паушева, 1980). Досліджували по 20-25 проростків, отриманих з насіння поточного року репродукції. Аналіз препаратів проводили на мікроскопі "Amplival". Мікрофотографування виконували на плівці "Мікрат" 300.

Для цитофотометричного визначення вмісту ДНК в ядрах клітин цукрового буряка застосовували реакцію Фьольгена з використанням холодного гідролізу в 5N HCL, при кімнатній температурі. Для всіх досліджених ліній будували криві гідролізу. Матеріал забарвлювали реактивом Шиффа (фуксин "Діамант") протягом 2 годин. Постійні препарати готували за допомогою рідкого азоту. Вміст комплексу ДНК-фуксин в ядрах вимірювали двоохвильовим методом на однопроміневому спектрофотометрі (Агроскін, Папаян, 1977).

Методика вивчення ядерця та ядерцеутворюючих районів хромосом базувалася на використанні азотнокислого срібла. Матеріал фіксували за модифікованою методикою Хізумі (Hizume et al., 1980). Забарвлювали препарати за методом Лакадена (Lakadana et al., 1984). Також застосовували модифіковану методику Ховела і Блека (Howell, Black, 1980).

Для визначення ядерно-цитоплазматичних та ядерно-ядерцевих співвідношень, виміри проводили в однорідних клітинах-трихобластах меристеми зародкових корінців, розташованих в периферії. Препарати досліджували під мікроскопом при збільшенні 100<sup>x</sup>. Виміри проводили за допомогою окуляр-мікрометра із збільшенням 15<sup>x</sup>. Отримані результати переводили в мікрометри. Обчислювали за формулами (Ташке, 1980).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за стандартною методикою (Доспехов, 1985).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**1. Морфологічні та господарські особливості самозапилених ліній.** Нами була проведена оцінка морфологічних особливостей рослин 80 інбредних ліній цукрового буряка першого року життя, третього покоління самозапилення, які на протязі декількох років показували стабільний рівень ЗКЗ. На підставі ботанічних форм простого листа (Жуковский, 1964) визначали форму листа. Вимірювали довжину та ширину листової пластинки, довжину та діаметр черешка. Морфометричну оцінку проводили під час розвитку 4-х пар справжнього листа.

Серед вивчених нами самозапилених ліній, які досліджувалися протягом трьох років, можна визначити 9 морфотипів, які розрізняються між собою за розміром і формою листової пластинки та довжиною черешка. Всі комбінаційно-цінні лінії належали до морфотипів, особливостями яких на ранніх стадіях розвитку є порівняно великий розмір листа (площа листової пластинки  $>50 \text{ см}^2$ ), широко-овальна форма листової пластинки та середньої довжини черешок (співвідношення довжини черешка до довжини листа дорівнює 0,8-1,0). Морфотипи з трикутною та овальною формою листової пластинки, середнім розміром листа ( $30 - 50 \text{ см}^2$ ) та коротким черешком (співвідношення довжини черешка до довжини листової пластинки менше 0,5) в переважній більшості випадків ( $>70\%$ ) мали середній рівень ЗКЗ. Лінії, характерними ознаками яких є довгий (співвідношення довжини черешка до довжини листової пластинки перевищує 1,5), тонкий черешок і ланцетовидна або мечевидна форма листової пластинки (лінії 1408, 1495) завжди показували низький рівень ЗКЗ.

В результаті морфологічної оцінки і визначення комбінаційної здатності для подальшої роботи були відібрані 25 са-

Таблиця 1

Продуктивність самозапилених ліній цукрового буряка  
(в середньому за 1990-1992)

Тимчас. номер лінії	Походження	Рівень ЗКЗ	Маса коренепл., г.	Цукристість, %	Збір цукру, ц/га
1089	Кирг. од. 15	В	392±25	16,8±0,4	65,8±3,7*
1200	Льгов. 014	В	387±25	17,3±0,3	66,8±3,5
1241	В072/1	В	377±24*	16,8±0,3	65,9±3,4
1100	Межотн. 110	Н	236±24	17,4±0,4	41,0±2,3
1167	Бц. од. 27	Н	290±22*	15,2±0,3	43,0±2,2*
1307	Рамон. 09	Н	210±16	16,9±0,4	35,4±1,8
1408	Верхн. 031	Н	200±16	17,5±0,5	34,8±1,8
1495	Сел. N 112	Н	198±20	16,2±0,4	32,1±1,9
St. г.	Ювілейний		495±42	16,8±1,3	83,1±7,3

\* Різниця між показниками достовірна (P<0,05)

самозапилених ліній з контрастними морфологічними ознаками та рівним рівнем ЗКЗ. У відібраних ліній протягом декількох років визначалася маса та цукристість коренеплодів. Лінії з високою ЗКЗ на протязі всього періоду випробувань стабільно показували порівняно вищу продуктивність у співставленні з іншими лініями (табл.1). Маса коренеплодів у ліній з низькою ЗКЗ варіювала в досить широких межах - 200 -300 г. За цукристістю коренеплодів досліджені лінії з рівною ЗКЗ практично не відрізнялися і мали середній вміст цукру на рівні 16-17%.

Таким чином, аналіз морфологічних та господарських ознак самозапилених ліній показав, що морфологічні ознаки лис-

та можливо використовувати для попередньої оцінки ліній. Генотипи з широко-овальною формою листової пластинки та середньою довжиною черешка виявилися найбільш продуктивними. Лінії з ланцетовидною та мечевидною формою листової пластинки та довгим черешком можливо відбракувати вже на ранніх стадіях розвитку. Такі форми показували найменшу масу коренеплодів на протязі багатьох років випробувань і не придатні для практичного застосування в гетерозисній селекції.

**2. Цитогенетичні особливості самозаплених ліній цукрового буряка.** Негативна дія примусового самозаплєння знаходить відображення і на клітинному рівні (Iwata, Tsuda, 1986, Лазаревич, 1989). Наші дослідження показали, що в процесі поділу клітин кореневої меристеми інбредних ліній виявляються певні порушення мітозу. Відмічені затримки в розходженні хромосом, викид хромосом за межі веретена, мікроядра, двоядерні та трьохядерні клітини, асиметричні та багатополосні мітози. Хромосомні аберації були представлені мостами, відсталими хромосомами та фрагментами.

Наявність клітин з аномаліями мітозу спостерігалася практично у всіх самозаплених ліній (табл. 2). У ліній з високою ЗКЗ доля клітин з відхиленнями від нормального процесу мітозу не перевищувала 1%, тоді як у ліній з низькою ЗКЗ кількість таких клітин зростала до 4-6%. Дослідження на протязі декількох років показали, що лінії, які мали відносно високу частоту клітин з порушеннями мітозу, в період вегетації відрізнялися пригніченим станом розвитку, повільним наростанням ботвиння, внаслідок чого стабільно мали порівняно меншу масу коренеплодів.

Всі інбредні лінії мали приблизно однаковий спектр

Таблиця 2

Частота порушень мітозу в клітинах кореневої меристеми інбредних ліній цукрового буряка (Із)

Тимчас. номер лінії	Рівень ЗКЗ	Кількість вивчених анафаз і телофаз	Кількість клітин з порушеннями	Відсоток клітин з порушен. (на лінію)
1089	В	1004	7	0,70±0,26
1200	В	970	9	0,93±0,31
1241	В	965	7	0,72±0,27
1100	Н	968	56	5,79±0,75*
1167	Н	996	35	3,51±0,58*
1307	Н	977	64	6,55±0,79*
1408	Н	996	62	6,22±0,77*
1495	Н	955	63	6,60±0,80*
Контроль (Вихідні сорти)		~ 1000 (для кожного)	від 2 до 5	від 0,2 ± 0,14 до 0,5± 0,27

\* Різниця між показниками лінії та сорту достовірна  $P < 0,05$  аномалій мітозу, але рівну частоту певних порушень. В одних лініях (як 1307) переважали відсталі хромосоми та мікроядра, в інших (1167) значну кількість (>40%) складали мости в анафазах. У таких ліній, як 1089, 1221, 1495 більше 20% від абсолютної кількості клітин з порушеннями становили асиметричні та трьохполюсні мітози. Слід зазначити, що спектр аномалій клітинного поділу у інбредних ліній був значно ширший, ніж у рослин вихідних сортів, де виявлялись, в основному, мости в анафазах та відсталі хромосоми.

Таблиця 3

Хромосомний склад клітинної популяції меристеми  
інбредних ліній цукрового буряка (I<sub>3</sub>)

Тимчас. номер лінії	Рівень ЗКЗ	Кількість спостере- жуваних метафаз	Кількість клітин в певним числом хромосом, %				
			1x*	2x	3x	4x	Анеуплоїдні
1089	B	980	0,2	97,0	0,41	2,04	0,31
1200	B	908	-	96,4	0,55	2,86	0,22
1241	B	906	-	96,3	0,22	3,02	0,22
1100	H	890	1,57	93,1	-	-	5,28
1112	H	780	0,91	96,0	-	-	3,06
1307	H	971	1,02	94,0	-	-	4,94
1408	H	920	1,52	92,8	-	-	5,76
1495	H	970	0,82	92,9	-	-	6,28

\* X=9 хромосом

Визначивши певну кількість клітин з аномаліями мітози ми перевірили хромосомний склад клітинної популяції меристеми за плоідністю. Дослідження показавали, що переважна більшість метафаз мала 18 хромосом, що відповідає диплоїдному набору цукрового буряка (табл.3). Однак, в деяких лініях вдалося визначити тетраплоїдні, триплоїдні та гаплоїдні метафази, а також анеуплоїдні з рівною кількістю хромосом - від гиподиплоїдного до гипотетраплоїдного. Склад клітинної популяції у лініях з низькою ЗКЗ, при домінуванні диплоїдних клітин, представлений гаплоїдними та анеуплоїдними клітинами, в той час, як у ліній з високою ЗКЗ гетерогенність клітинної

популяції меристеми проявляється в наявності, крім диплоїдних, триплоїдних та тетраплоїдних клітин.

Наявність тетраплоїдних клітин в меристемі інбредних ліній можливо пов'язана з ендомітозами; крім цього, поліплоїдизація може бути результатом незавершеності мітотичного циклу на різних його стадіях. Появу триплоїдних та частини анеуплоїдних клітин, можливо зв'язати з виявленими порушеннями клітинного поділу, такими як асиметричні та багатопольсні мітози, внаслідок чого могли утворюватися ядра з різною кількістю хромосом. Найбільш вірогідним механізмом гаплоїдизації є соматична кон'югація гомологічних хромосом в диплоїдних мітозах з наступною редукцією числа хромосом, але ймовірно, що гаплоїдні клітини можуть виникати шляхом геномної сегрегації в поліплоїдних мітозах.

Дослідження хромосомного складу клітин кореневої меристеми самозапилених ліній з метою визначення впливу тривалого інбридингу на цей показник, виявило, що клітини різного рівня плоідності спостерігаються як в перших поколіннях самозапилення, так і в наступних поколіннях інбридингу. По мірі збільшення гомозиготності рослин кількість диплоїдних клітин у ліній з високою ЗКЗ поступово збільшується. Так, наприклад, у лінії 1200 доля поліплоїдних клітин зменшується від 3,4% в  $I_3$  до 0,4% в  $I_9$ , що може бути пов'язане з адаптацією до самозапилення та стабілізацією каріотипічних характеристик. У лінії 1112, з низькою ЗКЗ, навпаки, зі збільшенням коефіцієнту інбридингу зростає кількість анеуплоїдних метафаз від 2,2% в  $I_2$  до 4,5% в  $I_7$ , що свідчить про збільшення числа аномальних мітозів.

Таким чином, лінії з рівним рівнем ЗКЗ відрізняються за кількістю клітин з аномаліями мітозу та хромосомним скла-

дом клітинної популяції кореневої меристеми. У ліній з низькою ЗКЗ виявлено достовірне збільшення числа порушень клітинного поділу та визначається більше гаплоїдних та анеуплоїдних клітин. Це дозволяє відбракувати такі форми вже на стадії проростання насіння.

**3. Цитофотометрія ДНК та можливості її застосування в селекції цукрового буряка.** Треба відмітити, що цитогенетичний аналіз дозволяє враховувати лише клітини, які діляться. Більш детальне уявлення про характер плідності клітин можливо представити за даними цитофотометричного аналізу. Нами проведене цитофотометричне дослідження складу популяції інтерфазних ядер за вмістом ДНК. Кількість ДНК, в умовних одиницях, яка відповідала диплоїдному набору хромосом, визначали вимірюючи телофазні ядра (2C) та ядра на стадії ранньої профазі (4C). Визначення вмісту ДНК в інтерфазних ядрах клітин меристеми самозапилених ліній виявило, що в тих лініях, де цитологічно показане існування гаплоїдних та тетраплоїдних клітин, відзначені ядра з вмістом ДНК 1C та 8C. Сумарна кількість ядер з вмістом ДНК 1C та 1-2C у ліній з низькою ЗКЗ варіювала від 8% до 11%; ядра з вмістом ДНК 8C не визначались зовсім, а виявлялось незначне число ядер (<2%), які попадають в клас 4C-8C. У ліній з високою ЗКЗ доля ядер з вмістом ДНК, який перевищував 4C (класи ядер 4-8 та 8C) складала не менше 8%; кількість ядер з вмістом ДНК <2C не перевищувала 2%. Високогетерозисні гібриди, батьківськими формами яких є досліджені лінії з високою ЗКЗ, уявко мали в кореневій меристемі значну кількість ядер з вмістом ДНК, який перевищував 4C (Чугункова и др., 1985, 1987, 1988). Закономірності розподілу ядер за вмістом ДНК у гібридів та їх вихідних форм можуть

Таблиця 4

Вміст ДНК-фуксину в профазних ядрах клітин меристеми  
інбредних ліній з високою та низькою ЗКЗ

Тимчас. номер лінії	Рівень ЗКЗ	Вміст ДНК на ядро (4C), ум. од.	Кількість ядер з вмістом ДНК, %					
			2C	<4C	4C	>4C	6C	8C
1089	B	42,8±0,8	0,5	-	94,4	1,0	1,5	3,0
1200	B	41,6±0,6	-	0,5	92,5	0,5	2,0	4,5
1241	B	40,9±1,0	-	0,5	91,5	1,0	1,5	5,5
1307	H	42,1±0,6	2,5	4,0	92,5	1,0	-	-
1408	H	40,0±0,9	4,5	5,0	89,0	1,5	-	-
1495	H	43,0±0,8	3,5	4,0	91,5	1,0	-	-

Досліджувалося по 200 ядер на стадії профазі на лінію  
свідчити про спадковий характер клітинної поліплоїдії.

Нами також проаналізований вміст ДНК-фуксину в ранніх  
профазних ядрах у ліній з низькою та високою ЗКЗ. Порівняння  
вмісту ДНК в профазних ядрах диплоїдних клітин у ліній з рі-  
зним рівнем ЗКЗ, показало, що досліджені лінії не відрізняю-  
ться за цим показником (табл.4). Разом з тим, у ліній з висо-  
кою ЗКЗ виявлені ядра з вмістом ДНК 6C та 8C, що відповідає  
вмісту ДНК в профазі триплоїдних та тетраплоїдних клітин. В  
популяції профазних ядер ліній з низькою ЗКЗ визначені ядра  
з вмістом ДНК 2C та <4C, що відповідає гаплоїдним та анеупло-  
їдним клітинам.

Таким чином, лінії з високою ЗКЗ та гібриди, отримані  
на їх основі, характеризуються наявністю клітин з поліплоїд-  
ним вмістом ДНК. Це дозволяє зробити висновок про доціль-

ність практичного застосування в селекційній роботі цитофотометричного методу визначення вмісту ДНК в ядрі для діагностичних цілей.

Роботи останніх років, виконані із застосуванням цитофотометричного методу, показали, що у високопродуктивних рослин в меристемі проростаючого насіння налічується більше клітин в постсинтетичній фазі  $G_2$  (Савин, Архипов, 1978, 1983, 1985), що можливо використовувати для діагностичних цілей. Оскільки досліджені лінії розрізняються за продуктивністю, то можливо припускати, що більш врожайні лінії також можуть відрізнятися від низькопродуктивних за кількістю клітин, які знаходяться на різних стадіях інтерфази. Для перевірки цього припущення нами досліджений розподіл інтерфазних ядер диплоїдних клітин меристеми за стадіями клітинного циклу у найбільш продуктивних та найменш врожайних ліній в період першого піку мітозів, який у всіх досліджених ліній спостерігається через 40 годин після намочування насіння. У проростків визначалася також мітотична активність та профазний індекс. Результати свідчать (табл.5), що при інших рівних умовах, у більш продуктивних ліній в популяції меристеми визначається достовірно більше клітин, які знаходяться на стадії  $G_2$ . У таких генотипів також вищий профазний індекс. Те, що це є результатом активної проліферації, а не наслідком затримки поділу чи профазного блоку, підтверджується результатами аналізу матеріалу різних ліній при нормальних умовах їх росту та розвитку. Збільшення кількості профаз є свідомством того, що у порівняно високопродуктивних ліній в мітоз вступає більше клітин, ніж у малопродуктивних. Мітотичний індекс також вищий у більш продуктивних ліній.

Таким чином, активність вступу клітин в перший масовий

Таблиця 5

Розподіл клітин меристеми за стадіями інтерфази та мітотична активність клітин самозапилених ліній цукрового буряка в період першого піку мітозів (через 40 годин після намочування)

Тимч. номер лінії	Рівень ЗКЗ	Кількість ядер, які том ДНК віднесені до стадії	вміс- ть ядер, які діляться	Мітотич. Профаз, % індекс, від чис- ла клі- тин, які		
		S <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	%	
1307	H	41,2±3,5	47,6±3,5	11,2±2,2*	2,9±0,29*	28,7±4,64
1408	H	43,4±3,5	46,9±3,4	9,7±2,1	2,8±0,29	33,7±4,93
1495	H	51,2±3,5	41,5±3,5	7,3±1,8	2,1±0,24	28,3±5,23
1089	B	22,7±3,0	56,1±3,5	21,2±2,9	5,3±0,39	44,2±4,00
1200	B	27,3±3,2	54,6±3,5	18,1±2,7*	5,5±0,40	46,3±3,84
1241	B	25,2±3,0	54,5±3,5	20,3±2,8	5,2±0,37*	48,1±3,95

\*Різниця між показниками достовірна P<0,05

мітоз вища у ліній з підвищеною продуктивністю, що можливо використовувати як один із критеріїв селекційної цінності досліджуваного матеріалу.

**4. Функціональна активність ядерцеутворничих районів хромосом у інбредних ліній цукрового буряка.** Існуючі методи по виявленню рибосомних генів на хромосомах і продукту їх функції - ядерцевого матеріалу в інтерфазному ядрі - дозволяють оцінити функціональний стан цих генів шляхом цитогенетичного аналізу. Розміри ядерця знаходяться в прямій залежності від ступеню активності рибосомних генів (Sans et al., 1984; Дуброва,

1989), що дозволяє оцінити відносну активність генів рРНК в інтерфазному ядрі на цитологічному рівні за числом ядерць та їх величиною (Flavell et al., 1986; Архипчук, 1989, 1991). Тому ці показники досить часто використовують для діагностичних цілей, як побічні ознаки активації метаболічних процесів в клітині (Беликова, 1984; Довженко, 1989).

При вивченні меристематичної тканини проростків інбредних ліній було виявлено, що більша частина клітин має в ядрі одне, добре виражене ядро. Крім цього типу клітин, в популяції зустрічалися багатоядерцеві клітини з 2, 3, 4 та 5 ядрами, кількість яких в залежності від генотипу варіювала від 1,5% до 13%. Саме у інбредних ліній, які є батьківськими формами високогетерозисних гібридів, нами вперше виявлені клітини, де кількість ядерць зростала до 4-5 внаслідок чого середнє число ядерць на 1 клітину у таких генотипів достовірно більше, ніж у ліній з низькою ЗКЗ (табл. 6). За розміром ядра в одноядерцевих клітинах ліній з високою ЗКЗ також переважали форми з низькою ЗКЗ. Сумарний об'єм ядерцевого матеріалу в багатоядерцевих клітинах, в переважній більшості випадків (80%), перевищував об'єм ядра в одноядерцевих клітинах. Отож, не дивлячись на те, що середній розмір ядра зменшується при зростанні їх числа в ядрі, збільшення числа ядерць відбиває підвищений рівень активності ядраутворюючих районів.

В тканині мезофілу листа у ліній спостерігається збільшення кількості багатоядерцевих клітин до 10-23%. Об'єм ядра в клітинах мезофілу, в середньому, менший у 2,3 рази ніж в кореневій меристемі проростків. Ліній, які мали відносно великий розмір ядра в клітинах меристеми зародкового коріння, мали порівняно великий розмір ядра і в мезофілі листа.

Таблиця 6

Кількість та розміри ядерця в клітинах кореневої меристеми та мезофілу листа інбредних ліній цукрового буряка

Тканина	Тимчас. номер лінії	Рівень ЗКЗ	Середнє число ядерців на 1 кл.	Розмах варіювання числа ядерців в ядрі	Середній об'єм ядерця (1яд/кл)	Середній об'єм ядерцеві співвідношення мм <sup>3</sup>
мерис-тема	1089	В	1,229±0,016	1-5	42,3±1,6*	5,94
	1200	В	1,215±0,015*	1-5	44,1±1,4	5,74
	1241	В	1,260±0,018	1-5	44,7±1,6	5,68
	1307	Н	1,026±0,004*	1-3	30,1±1,4*	8,04
	1408	Н	1,015±0,004	1-2	28,8±1,1	8,14
	1495	Н	1,021±0,004	1-3	29,9±1,3	7,79
мезо-філ	1089	В	1,470±0,022	1-8	19,3±1,02	14,3
	1200	В	1,428±0,021*	1-7	18,6±1,34	14,7
	1241	В	1,458±0,022	1-8	18,4±1,10*	13,6
	1307	Н	1,116±0,010	1-3	13,7±1,09*	17,1
	1408	Н	1,141±0,011*	1-3	13,3±0,58	17,7
	1495	Н	1,117±0,010	1-3	13,2±0,86	18,4

Число ядерців підраховувалася в 1000 ядер: 1яд/кл - клітина в одному ядерці; \*різниця між показниками достовірна P<0,05

Відмінною особливістю тканини мезофілу листа є те, що у комбінаційно-цінних ліній з'являються клітини з 6-8 ядерцями.

З одного боку, поява ядер з 2 та більшою кількістю ядерців може свідчити про поліплоїдну клітину, де функціонує

удвічі збільшена кількість ядерцевих утворювачів, а з іншого - бути свідомством диференційного помноження хромосом - носіїв ядерцеутворюючих районів (ЯУР). Наші дослідження інбредних ліній вказують на наявність в переважній більшості диплоїдних клітин меристеми однієї пари хромосом, зв'язаної з утворенням ядерця. Це, як правило, перша хромосома каріотипу, на короткому плечі якої знаходиться вторинна перетинка. Разом з тим, аналіз структури метафазних хромосом диплоїдних каріотипів ліній з високою ЗКЗ показав, що на деяких хромосомах з'являються додаткові вторинні перетинки. Кількість вторинних перетинок збільшується до 3-4.

Оскільки вторинна перетинка не завжди являється ЯУР (Sato, 1984) то для більш точного виявлення кількості хромосом, зв'язаних з утворенням ядерця та місць локалізації ЯУР, ми провели специфічне забарвлення хромосом азотнокислим сріблом. В більшості випадків "сріблення" відбувається в кінцевих районах першої хромосоми каріотипу. Наряду з цим, виявлені додаткові активно функціонуючі ЯУР. Забарвлення відбувається не тільки в ЯУР першої хромосоми, але й на кінцях другої пари хромосом, а також на дистальному кінці восьмої хромосоми. Таким чином, у ліній з високою ЗКЗ, можливо внаслідок підвищення метаболічної активності, починають функціонувати додаткові ЯУР.

Підсумовуючи, слід зазначити, що комбінаційно-цінні лінії мають більше середнє число ядерців на клітину та порівняно більший їх розмір незалежно від досліджуваної тканини. Оскільки вважають, що ці показники свідчать про рівень синтезу рибосомної РНК (Vazquez et al., 1986; Fisher et al., 1992) то, можливо, отримані дані свідчать про підвищену функціональну активність ядерців у ліній з високою ЗКЗ. Тому розмір

та кількість ядерць можуть бути показниками, які слід враховувати при відборі перспективного селекційного матеріалу.

**Б. Морфометричне вивчення клітин інбредних ліній цукрового буряка.** Як неоднаразово вказувалося (Bryans, Smith, 1985; Doney et al., 1986), цитофізіологічна характеристика може бути не тільки додатковим критерієм при оцінці рослин з рівним генотипом, але й використовуватися для діагностичних цілей. Порівняльне вивчення розмірів клітин перифлеми зародкового корінця в лініях з різною комбінаційною здатністю показало, що генотипи з високою ЗКЗ відрізняються порівняно більшими розмірами клітин (1350 - 1430 мкм<sup>3</sup>) у співставленні із лініями з низькою ЗКЗ (1090 - 1230 мкм<sup>3</sup>).

На підставі отриманих даних про розміри клітини, ядра та ядерця були обчислені ядерно-цитоплазматичні (ЯЦС) та ядерно-ядерцеві співвідношення (ЯЯС). Показники ЯЦС у ліній з різним генотипом варіюють від 0,213 до 0,283. Найбільші значення ЯЦС отримані для тих ліній, де ядро займає більший об'єм і де відповідно зменшується об'єм цитоплазми. Порівняння показників ядерно-цитоплазматичних співвідношень у ліній з різною ЗКЗ показало певну тенденцію до зменшення ЯЦС у більш продуктивних ліній. Лінії з високою ЗКЗ мали порівняно менші показники ЯЦС (0,213-0,233) у співставленні із більшістю ліній з низькою ЗКЗ (0,233-0,275). Такі генотипи також мали порівняно нижчі показники ЯЯС - від 5,5 до 6,0 в порівнянні із лініями з низькою ЗКЗ (6,8-8,2), що побічно може відбивати посилення активності рибосомальних цистронів. Та в той же час, широкий розмах мінливості показників ядерно-цитоплазматичних та ядерно-ядерцевих співвідношень у ліній з однаковим рівнем загальної комбінаційної здатності дозволяє

СИСТЕМА КОМПЛЕКСНОГО ВІДВОРУ ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ ГЕТЕРОЗИСНОЇ  
СЕЛЕКЦІЇ САМОЗАПИЛЕНИХ ЛІНІЙ ЦУКРОВОГО БУРЯКА

Форми	Х А Р А К Т Е Р И С Т И К И												
	Морфологічні				Цитогенетичні				Цитофізіологічні				
	Фаза ров- вит- ку рос- лин	Форма лис- тової плас- тинки	L — M	Площа листо- вої плас- тинки,  см <sup>2</sup>	Дослід. ткани- на	Пору- шень міто- зу, 1 ане- уплоїд. клітин, кліт.	Число гало- їдних ане- плоїд. дних кліт.	Наяв- ність полі- плої- дних кліт.	Кіль- кість бага- тояде- рцевих кліт.	Кількість клітин з вмістом ДНК	Мітотичний індекс (в період першого піку митозів),	ЯЯС	
Перспективні	4 пари справ. листя	широко- овальна	0,8- 1,0	>50	мерис- тема зарод- кового корін- ця	<1	<1	"+"	>10	<2	>8	>5	<6
непридатні		ланцето- видна, мече- видна	1,5- 2,5	<30		>5	>4	-	<3	>8	<2	<3	>8

L - довжина черешка

M - довжина листової пластинки

ЯЯС - ядро-ядерцеві співвідношення

"+" - наявність;

вastosовувати ці ознаки лише в комплексі з іншими характеристиками рослин як додатковий критерій при оцінці генотипу.

#### ВИСНОВКИ

1. Запропонована система комплексного відбору перспективних для гетерозисної селекції самозапилених ліній цукрового буряка, яка базується на виявлених морфологічних, цитогенетичних та цитофізіологічних особливостях інбредних ліній з різним рівнем комбінаційної здатності.
2. Проведене дослідження рослин самозапилених ліній цукрового буряка першого року життя за морфологічними ознаками листа дозволило розділити всі вивчені генотипи на 9 морфотипів, які відрізняються між собою за розміром та формою листової пластинки та довжиною черешка. Характерною особливістю самозапилених ліній з високою ЗКЗ є порівняно великий розмір листа, широко-овальна форма листової пластинки та середньої довжини черешок.
3. На підставі цитогенетичних досліджень самозапилених ліній визначено, що інбридинг по-різному впливає на досліджені генотипи, внаслідок чого вони відрізняються за кількістю клітин з порушеннями мітозу. Ці аномалії клітинного поділу викликають утворення анеуплоїдних клітин, що веде до гетерогенності клітинної популяції за плоїдністю. Відмічена тенденція до збільшення числа клітин з аномаліями мітозу у порівняно низькопродуктивних ліній.
4. Показана нестабільність числа хромосом в клітинах меристеми кореня інбредних ліній. Міксоплоїдія проявляється в наявності клітин з набором хромосом від  $1x$  до  $4x$ . У ліній з високою ЗКЗ, при домінуванні диплоїдних клітин, виявля-

ні триплоїдні та тетраплоїдні клітини, що діляться, в той час, як у ліній з низькою комбінаційною здатністю поліплоїдні клітини не визначаються.

5. Цитофотометрично визначено, що інбредні лінії з різною продуктивністю, в період першого піку мітозів, відрізняються за кількістю клітин, які знаходяться на різних стадіях інтерфази. Популяції меристематичних клітин високопродуктивних ліній, при інших рівних умовах, мають більше клітин, які перебувають в постсинтетичній фазі ( $G_2$ ). Цитологічний аналіз показав, що активність вступу клітин в перший масовий мітоз також вища у більш продуктивних ліній.
6. Лінії з різним рівнем загальної комбінаційної здатності в більшості випадків достовірно не відрізняються за вмістом ДНК - фуксину на диплоїдне ядро. Разом з тим, лінії з високим рівнем загальної комбінаційної здатності характеризуються наявністю ядер з поліплоїдним вмістом ДНК в кореневій меристемі на відміну від ліній з низькою комбінаційною здатністю.
7. Встановлена диференційна активність ядерцевих утворювачів хромосом в різних тканинах цукрового буряка. У ліній з високою комбінаційною здатністю виявлено збільшення числа ядерцеутворюючих районів хромосом, кількості та розмірів ядерців.
8. Показники ядерно-цитоплазматичних та ядерце-ядерних співвідношень значно варіюють у ліній з однаковим рівнем загальної комбінаційної здатності. Їх можливо застосовувати як побічний критерій лише в комплексі з іншими ознаками рослин.

Список работ, опубликованных за материалами диссертации

1. Чугункова Т. В., В. А. Заславский, И. А. Шевцов, О. В. Титок (Дубровная) Цитофотометрическое исследование содержания ДНК в тканях свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Цитология и генетика. -1984. -N 1. -С. 3-9.
2. Чугункова Т. В., Шевцов И. А., Дубровная О. В. Содержание ДНК в инбредных линиях и гибридах сахарной свеклы // С/х. биология. -1985. N 7. -С. 31-34.
3. Дубровная О. В., Облова Л. А., Хризман В. Н. Цитологические особенности инбредных линий и гибридов сахарной свеклы // // V съезд ВОГиС. - Москва, 1987. Тез. докл. -Т. 4. Ч. 1. -С. 134.
4. Шевцов И. А., Чугункова Т. В. Дубровная О. В., Долотий Л. А. Прогнозирование продуктивности гибридов сахарной свеклы по содержанию ДНК//Вестник с/х науки. -1988. -N 5. -С. 91-95.
5. Чугункова Т. В., Дубровная О. В., Шевцов И. А. Динамика митотической активности та добові параметри клітинного циклу меристеми кореня цукрового буряка // ДАН УРСР. Сер. Біол. наук. - 1988. -N 3. -С. 81-84.
6. Дубровная О. В., Чугункова Т. В. Цитофизиологические особенности инбредных линий сахарной свеклы с различной комбинационной способностью // Сб. науч. трудов. Методы интенсификации селекционного процесса. - ВСГи. - Одесса, 1990. - С. 58-59.
7. Чугункова Т. В., Дубровная О. В., Давиденко Н. С. Комбинационноценные линии сахарной свеклы различаются по активности генов р-РНК. // Молекулярные механизмы генетических процессов. - Тез. докл. VII Всесоюз. симпоз. - Москва, 1990. - С. 183-184.
8. Дубровная О. В. Характеристика окрашенных серебром районов

ядрышкового організатора інбредних ліній сахарної свеклы  
// Актуальні проблеми фізіології рослин і генетики.  
-Тез. докл. конфер. молод. учених. - Київ, 1992. -С. 92.

Дубровная О. В. "Цитогенетическое изучение самоопыленных  
линий сахарной свеклы с различной комбинационной способно-  
стью". Диссертация на соискание ученой степени кандидата би-  
ологических наук по специальности 03.00.15. - генетика. Ин-  
ститут клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украи-  
ны; Киев, 1994. Разработана и предложена система комплексного  
отбора перспективных для гетерозисной селекции самоопыленных  
линий сахарной свеклы. Анализ характера деления клеток, со-  
держания ДНК в ядре, дифференциальной активности ядрышковых  
организаторов хромосом позволяет выбраковывать формы непри-  
годные для практического использования в гетерозисной селек-  
ции и выделять хозяйственно-ценные линии.

O.V.Dubrovna " Cytogenetic study of inbred lines of  
sugar beet with different combining ability". The disserta-  
tion presents for a candidate degree in biological sciences,  
speciality - 03.00.15. - Genetics. The defence of a disserta-  
tion will take place in the Institute of Cell Biology and  
Genetic Engineering NAS of Ukraine; Kiev, 1994. The system of  
complex selection of inbred lines of sugar beet promising  
for heterosis selection was developed and proposed. Analysis  
of cell division patterns, DNA content, differential activity  
of nucleolus organizer regions permit to reject forms unsuit-  
able for practical utilization in heterosis selection and  
to isolate lines of agricultural importance.

ключові слова: цукровий буряк, самозапилені лінії, цитогене-  
тика, цитохімія, цитоморфометрія.

Dub

Підписано до друку 17.II.94р Формат 60x84/16  
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ МІ664  
Надруковано ЦУОП ДНІП "Плодвинконсерв" м. Київ, Сакегамацького, 1

15701M

AB 31.489

**AB 31.489**