

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені Тараса ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису



**БОДНАР**  
**Галина Миронівна**

**ВИВЧЕННЯ ФІЗІОЛОГО - БІОХІМІЧНИХ ОСНОВ СТІЙКОСТІ  
ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ДО ЛАБОРАТОРНОГО ЗАСОЛЕННЯ NaCl ТА  
ЗВ'ЯЗКІВ ЦЬОЇ ОЗНАКИ ЗІ СХИЛЬНІСТЮ ДО ЗАХВОРЮВАНЬ**

03.00.12 - фізіологія рослин

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1997

081.1  
Дисертацією є рукопис

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00761037 (O)

Роботу виконано у відділі  
Інституту цукрових буряків

Науковий керівник: кандидат біологічних наук  
Ільєнко Ілля Ілліч

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук  
Процько Рада Феодосіївна  
доктор біологічних наук  
Гуляєв Борис Іванович

Провідна установа: СІМФЕРОПОЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. М.В. Фрунзе

Захист дисертації відбудеться "26" лютого 1997 р.  
о "\_\_\_" год. на засіданні спеціалізованої вченої ради  
Д 01.01.07 при Київському університеті імені Тараса Шевченка  
за адресою: Київ - 127, проспект акад. Глушкова, 2.

**Поштова адреса:** 252033, Київ - 33, Володимирська, 64,  
спецрада Д 01.01.07, біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Київського  
університету імені Тараса Шевченка

Автореферат розіслано "23" січня 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
кандидат біологічних наук, професор

О.В. Брайон

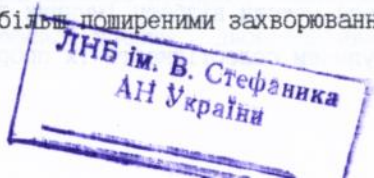
## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Екологізація виробництва сільськогосподарської продукції передбачає поруч з проведенням системи агротехнічних заходів більш повне використання адаптивного потенціалу культурних рослин за рахунок прискореної селекції сортів, стійких до несприятливих умов навколишнього середовища та захворювань. В зв'язку з цим актуальність представленої дисертаційної роботи визначається як значними площами засолених земель в Україні, в т.ч. і в зоні вирощування цукрових буряків, так і повною відсутністю даних про достовірні експрес-методи діагностики солетолерантності цієї культури, про сортову специфіку її реакції на засолення ґрунтів та про методи ранньої діагностики і відбору імунних до захворювань селекційних матеріалів.

**Мета і завдання досліджень:** Виходячи з цього метою дисертаційної роботи був пошук фізіолого-біохімічних тест-ознак для лабораторних експрес-методів оцінки і відбору солетолерантних та імунних форм цукрових буряків.

Для досягнення поставленої перед нами мети вирішували декілька задач:

- 1) провели підбір лабораторного методу оцінки солестійкості цукрових буряків з найвищою розрізняючою здатністю;
- 2) відібрали в результаті скрінінгу для подальших біохімічних досліджень контрастні за даною ознакою популяції та генотипи;
- 3) виявили фізіолого-біохімічні ознаки цукрових буряків, тісно пов'язані з їх солетолерантністю до засолення NaCl в лабораторних умовах на рівні проростків та культури меристем *in vitro*;
- 4) дослідили наявність кореляційних зв'язків між солестійкістю цукрових буряків на рівні проростків та ступенем поразення цієї культури сімома найбільш поширеними захворюваннями в польових умовах.



**Наукова новизна досліджень.** Вперше встановлено, що:

1) метод визначення солестійкості цукрових буряків за довжиною проростків при 1,0% та 1,5% лабораторному засоленні NaCl має найвищу розрізняючу здатність серед п'яти досліджуваних;

2) селекційні матеріали цукрових буряків відрізняються за ступенем чутливості їх проростків до рівня засолення NaCl в лабораторних умовах та виділено придатні для біологічного розсолення слабозасолених земель популяції-донори генів солестійкості;

3) солестійкість цукрових буряків на рівні проростків позитивно корелює зі стійкістю цієї культури на рівні меристем *in vitro*;

4) у геномі цукрових буряків є ген, споріднений генowi *hsp70* теплового шоку дрозофіли (з допомогою гібридизаційного тесту з <sup>32</sup>P-міченими ДНК-зондами) та зв'язок останнього із солетолерантністю цієї культури;

5) існують фізіолого-біохімічні ознаки солетолерантності цукрових буряків до різних доз лабораторного засолення NaCl на рівні проростків (6 ознак) та культури меристем *in vitro* (12 ознак);

6) солетолерантність проростків цукрових буряків до лабораторного засолення NaCl сильно корелює із схильністю даної культури до пероноспорозу, коренеїда та вірусної жовтяниці в польових умовах;

7) трисомний номер 491 (колекція Г.І.Ярмолюк), на противагу трисоміку 8, характеризується в культурі меристемних тканин *in vitro* надзвичайно високим рівнем стійкості до засолення NaCl.

**Практичне значення роботи та реалізація результатів досліджень.** На основі результатів досліджень виявлено популяції та окремі генотипи, які можуть служити донорами генів солестійкості, а також відібрано прямі лабораторні методи визначення солетолерантності цукрових буряків із найвищою розрізняючою здатністю. В стадії патентування знаходяться методи відбору імунних до трьох захворювань матеріалів за ступенем солестійкості їх проростків. Розроблено

селекційно важливу схему статистичної достовірності можливості суміщення в селекційних матеріалах стійкості до семи найбільш поширених захворювань. Результати досліджень можуть бути також використані для розробки непрямих методів оцінки солетолерантності цукрових буряків. Робота має і природоохоронне значення, оскільки популяції цукрових буряків із підвищеним рівнем солетолерантності можна використовувати для біологічного розсолоння слабозасолених земель.

Проведені дослідження виконані в рамках комплексних державних програм ДНТП 0.51.14, "Продовольство-95" та ДНТП N 01960012876.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися на конференції по генетиці соматичних клітин в культурі, посвячених пам'яті Н.І.Шапіро (Звенигород, 1989); на конференції молодих вчених "Актуальные проблемы физиологии растений и генетики" (Київ, 1992); на науковій конференції "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений" (Київ, 1994); на міжнародному симпозиумі "Biotechnology and genetic engineering of plants" (Київ, 1994); на міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів "Шляхи раціонального використання земельних ресурсів України" (Чабани, 1995); на міжнародній конференції "Селекція і вирощування польових культур" (Кам'янець-Подільський, 1995); на наукових семінарах лабораторії культури тканин і генетичної інженерії та Вченій раді Інституту цукрових буряків УААН (1994, 1995).

**Конкретний особистий внесок дисертанта в одержання результатів, викладених в дисертації.** При виконанні дисертаційної роботи автором особисто було проведено дослідження літературних джерел, складено програму роботи, проведено лабораторні та вегетаційні досліді, фенологічні спостереження, біохімічні аналізи. Статистично проаналізовано та узагальнено отримані експериментальні дані.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на

231 сторінці машинописного тексту і складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини, обговорення, висновків, пропозицій, списку літератури (228 джерел, з них 56 іноземних). Робота містить 14 малюнків та фотографій, 50 таблиць та 3 додатки.

**Публікація результатів досліджень.** Основні положення дисертації викладено в чотирьох наукових статтях та в семи тезах.

#### **Основні положення дисертації, що виносяться на захист:**

- 1) виявлена значна між- та внутрішньопопуляційна варіабельність ступеня солетолерантності селекційних матеріалів цукрових буряків є надійною основою для їх прискореної селекції за даною ознакою за умови використання методів з високою розрізняючою здатністю;
- 2) відносна толерантність цукрових буряків до лабораторного засолення залежить від концентрації NaCl і викликана, зокрема, їх підвищеною потребою в Na як макроелементі;
- 3) існують тісні кореляційні зв'язки між ступенем толерантності цукрових буряків до лабораторного засолення NaCl та їх деякими фізіолого-біохімічними ознаками, а також імунністю даної культури до окремих захворювань в польових умовах;
- 4) у цукрових буряків поруч з механізмами комплексної стійкості існують механізми дивергентної стійкості до стресових факторів різної природи.

#### **ЗМІСТ РОБОТИ**

У першому розділі "Огляд літератури" на основі аналізу літературних джерел, які освітлюють питання критеріїв солестійкості рослин, методології визначення ступеня проявлення даної ознаки, впливу засолення ґрунтів на рослинні об'єкти та способів адаптації останніх до сольового стресу, а також можливих напрямків селекції

цукрових буряків із підвищеною солетолерантністю, зроблено висновок про необхідність пошуку біохімічних тест-ознак солестійкості цієї культури, ідентифікації генів, що контролюють дану ознаку, та виявлення зв'язків останньої з імунитетом.

У другому розділі **"Матеріали і методи"** наведено дані про біологічні об'єкти та матеріали досліджень, методологію окремих експериментів та роботи в цілому.

Експерименти проводились на науковій базі Інституту цукрових буряків УААН (Київ) та, частково - Інституту цитології і генетики СВ АН СРСР (Новосибірськ).

Об'єктами досліджень були поростки та вирощувані *in vitro* меристемні клони 11 районованих диплоїдних однопасінних сортів цукрових буряків і 5 гібридів вітчизняної та зарубіжної селекції. Солестійкість популяцій цукрових буряків на ранніх етапах розвитку оцінювали на основі поєднання декількох методик визначення солестійкості (Филатов П.А. и др., 1985; Синельникова В.Н., 1983).

В експерименті по визначенню солестійкості меристемних тканин цукрових буряків в культурі *in vitro* було використано 63 генотипи різного походження, рівнів плідності та солестійкості, в т.ч. один міксоплоїдний та сім трисомних меристемних клонів (колекція Ярмолюк Г.І.), а також три генотипи спонтанного триплоїдного гібриду на ЧС-основі. Солестійкість мікроклонів визначали за відносним приростом сирої та сухої біомаси на засолених NaCl середовищах.

Вміст іонів натрію та калію в рослинному матеріалі визначали згідно рекомендацій "Современные методы анализа почв и растений" (1984). Активність каталази, поліфенолоксидази і пероксидази, а також вміст фотосинтетичних пігментів в меристемних тканинах цукрових буряків, вирощуваних *in vitro*, визначали по Х.М. Починку (1976).

Пролін в проростках та меристемних клонах визначали по вдосконаленій методиці (Андрющенко В.К. и др., 1981).

Вміст фітогормонів в листових пластинках контрастних по солестійкості меристемних клонів цукрових буряків *in vitro* при засоленні поживних середовищ NaCl та в польових умовах визначали з допомогою методу, розробленого Савінським С.В. та інш. (1991).

Дослідження ізоферментного складу пероксидаз 1,5 місячних, вирощуваних *in vitro* меристемних клонів цукрових буряків проводили як описано Алімгазіною В.Ш. та Савичем І.М. (1990).

Вивчення рівня експресії білків теплового шоку (БТШ) по включенню  $^{35}\text{S}$ -метіоніну (НВО "Ізотоп, Ташкент") в протеїни, синтезовані *de novo* в умовах теплового шоку, проводили в меристемних тканинах вирощуваних *in vitro*, контрастних по солестійкості клонів згідно методик, розроблених Даскалюком А.П. зі співавторами (1988).

Необхідну для дот-гібридаційних аналізів сумарну м-РНК екстрагували та сам аналіз проводили, в основному, як описано Кузнєцовим В.В. та Черепневою Т.М. (1991).

В якості гетерологічних гібридаційних зондів використовували Bam HI-фрагмент рестрикції ДНК плазмиди 132ЕЗ, що містить нуклеотидну послідовність гену білка теплового шоку (hsp70) дрозофіли (дрозофіліну) з молекулярною масою 70кД. Плазміда 132ЕЗ була люб'язно надана нам членом-кореспондентом Російської АН Салганіком Р.І.

Для виготовлення зондів використовували ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )дАТР (НВО "Ізотоп", Ташкент) з питомою радіоактивністю 3000 Ки/мм, ендонуклеази EcoR I з питомою активністю 25 од/мкл і BamH I з питомою активністю 20 од/мкл (НВО "Фермент", Вільнюс), великий фрагмент ДНК-полімерази I (фрагмент Кльонова) з питомою активністю 50 од/мкл (КТМК ІЦІГ, Новосибірськ) та стандартні методики (Маниатис Т. і др., 1984). Питома активність препаратів ДНК складала  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$  імпульсів за хвилину.

Математичну обробку результатів досліджень проводили методами дисперсійного та кореляційного аналізів, а також розрахунком помил-

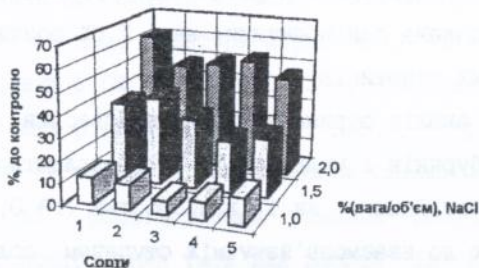


Рис.1. Вплив засолення NaCl на довжину проростків цукрових буряків

Умовні позначення сортів:

- 1- Північно-Кавказькі однонасінні 42; 2- Киргизькі однонасінні 25; 3 - Веселоподільські 29;  
4 - Ганусівські однонасінні 55; 5 - Льговські однонасінні 52.

ки вибіркової середньої по В.О. Доспехову (1985).

У третьому та четвертому розділах дисертації приведено результати фізіолого-біохімічних досліджень та їх обговорення.

В результаті проведених на першому етапі нашої роботи піонерських досліджень по скрінінгу солестійкості цукрових буряків на рівні проростків та культури меристем *in vitro* було виявлено значний розмах варіабельності даної ознаки на популяційному рівні, що може служити надійним генетичним базисом для прискореної селекції у даному напрямку при використанні сортів Північно-Кавказькі однонасінні 42, Киргизькі однонасінні 25, Вілоцерківські однонасінні 34 і 45 та генотипів СК-1, СК-2, СК-30, як донорів генів солетолерантності, а трисоміків 491 та 8 - для дослідження хромосомної локалізації цих генів.

На першому етапі було також відібрано серед 5-ти досліджуваних прямий, модифікований нами лабораторний метод визначення солестійкості цукрових буряків на рівні проростків за їх відносною довжиною в умовах 1,0 та 1,5% засолення NaCl як такий, що має найвищу розрізняючу здатність (рис.1). Поруч з тим було виявлено, що паралельне використання методів визначення солетолерантності да-

ної культури за відносними показниками кількості та сирі або сухої біомаси проростків при трьох досліджуваних рівнях засолення також може бути рекомендоване для практики; як і 2,0% розчин NaCl - для відбору солестійких генотипів.

Кореляційний аналіз отриманих даних підтвердив, що меристемні тканини цукрових буряків в культурі *in vitro* являються, в основному, такими ж солестійкими, як і їх проростки ( $r \geq 0,7$ ). Було також виявлено тенденцію до взаємозв'язку між ступенем солетолерантності генотипів в культурі меристем *in vitro* та їх плоідністю, оскільки триплоідні та міксоплоідні номери виявилися найбільш солевитривалими, а генотипи фракції "несправжніх близнюків" сорту Північно-Кавказькі однонасінні 42 із очікувано-високим відсотком гаплоїдів виявилися більш солечутливими, що підтверджується літературними даними про вищу надійність поліплоїдних рослинних систем в несприятливих умовах (Гродзинский Д.М., 1983).

В результаті нашої спроби використати коефіцієнти мінливості ростових процесів як показники вкладу мутабільної компоненти в адаптивну відповідь цукрових буряків при сольовому стресі було показано наявність сильних негативних зв'язків між солестійкістю проростків в умовах 1,0 та 1,5% лабораторного засолення NaCl та коефіцієнтами мінливості відносної довжини проростків в даних умовах ( $r = -0,718$  та  $-0,765$  відповідно), а також мінливістю показників приросту сирі біомаси меристем *in vitro* в контрольних умовах та їх відносним приростом сирі біомаси при 2,0% засоленні поживних середовищ хлористим Na ( $r = -0,709$ ). Наведені вище дані можуть свідчити на користь гіпотези про активний вклад мутабільної компоненти у клітинний захист лише в гранично екстремальних умовах, що звагалі унеможливають ростові процеси.

Результати перевірки гіпотези про вищий ступінь солестійкості генотипів та популяцій із нижчою продуктивністю (в нашому випадку

активністю ростових процесів) підтвердили її справедливості щодо відносної довжини проростків<sup>(200%)</sup> в умовах 1,5% лабораторного засолення NaCl ( $r = -0,641$ ), та щодо культури меристем *in vitro* при засоленні поживних середовищ 2,0% NaCl ( $r = -0,730$ ), при наявності аналогічних тенденцій при інших рівнях засолення. Проте, отримані нами дані показують швидше не зчеплене успадкування солестолерантності цукрових буряків зі сповільненими темпами ростових процесів, а невідповідність контрольних умов для рослин із підвищеним рівнем галофільності. Ці міркування підтверджуються нашими даними по стимулюючій дії 1,0% NaCl *in vitro* на ростові процеси та вміст пігментів в меристемних тканинах солестійких мікроклонів, а також існуванням сильних позитивних кореляцій між вмістом золи в листових пластинках і негативних між вмістом іонів  $K^+$  в коренеплодах цукрових буряків в польових умовах та ВДП в умовах 1,0% засолення ( $r = 0,820$  і  $-0,782$  відповідно), та сильних негативних зв'язків між першим параметром та довжиною проростків в контрольному варіанті ( $r = -0,912$  та  $-0,811$ ). Наведені факти можуть також свідчити про однакову потребу даної культури в зольних елементах на різних стадіях онтогенезу та про сильну генетичну детермінацію даної ознаки. Останнє твердження можна проілюструвати значними відмінностями в балансі іонів  $K^+$  та  $Na^+$  в меристемних тканинах контрастних по солестійкості трисомних клонів 491 та 8, оскільки солечутливий генотип 8 у порівнянні з солестолерантним 491 виявив низьку потребу в іонах  $Na^+$  та вдвічі вищу в іонах  $K^+$  в контрольних умовах при значно вищих темпах накопичення натрію та нездатності утримувати калій при засоленні (рис.2).

Слід відмітити також, що в результаті кореляційних аналізів було виявлено глибокий взаємозв'язок між балансом іонів  $K^+$  та  $Na^+$  в проростках цукрових буряків в умовах лабораторного засолення

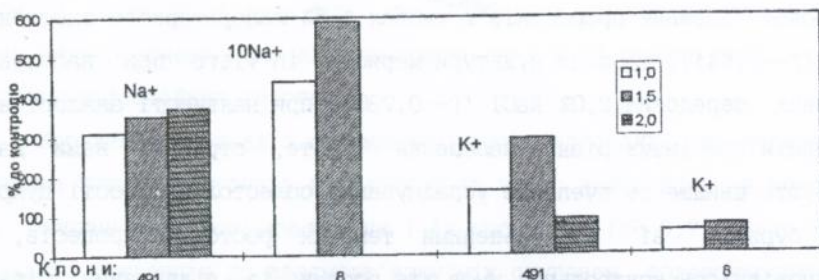


Рис.2. Відмінності в балансі іонів калію та натрію в меристемах контрастних за рівнем солестійкості трисомних мікроклонів при вирощуванні *in vitro* на засолених NaCl середовищах

NaCl, оскільки здатність цієї культури до накопичення іонів Na<sup>+</sup> в присутності 1,0% хлористого Na була тісно пов'язана з її здатністю утримувати іони K<sup>+</sup> в даних умовах ( $r=0,855$ ), а остання, в свою чергу, сильно залежала від рівня накопичення іонів Na<sup>+</sup> насінням ( $r=-0,753$ ).

Отже, солетолерантність цукрових буряків має ще один, на нашу думку дуже важливий аспект, мало враховуваний дослідниками, а саме: високу потребу даної культури в натрії як в макроелементі, що супроводжується здатністю накопичувати Na в тканинах в значних кількостях, особливо при засоленні. Так, за даними Яппарова (1973), цукрові буряки здатні виносити до 370-400 кг NaCl з га, збільшуючи при цьому вихід чистого цукру на 20-80%. Наведені вище дані дозволяють віднести цукрові буряки згідно класифікації Вернадського В.І. (1980) до культур богатих натрієм (вміст Na більший 0,1%), а отже здатних до біологічної меліорації слабозасолених земель при врахуванні виявлених нами сортових особливостей за даною ознакою. У наших дослідках цукрові буряки в умовах засолення були здатні накопичувати Na в 3-кратній кількості на рівні проростків та в 13-16-кратній - на рівні меристем *in vitro* в порівнянні з контролем, при

чому присутність в поживних середовищах навіть 1,0% та 1,5% NaCl стимулювала, а не пригнічувала ростові реакції 50% та 17% генотипів відповідно. Літературні джерела рясніють повідомленнями про позитивний вплив низьких концентрацій NaCl на цукрові буряки. Проте, не лише виробники сільськогосподарської продукції, але навіть вчені при дослідженні умов збалансованого живлення цукрових буряків не враховують їх підвищену, в порівнянні з іншими культурами, потребу в натрії (Вильямс М.В. и др., 1979), можливо із-за її маскуванню гіпотетичною здатністю рослин до біологічної трансмутації  $K^+$  в  $Na^+$  (Ткачук Е.С. и др., 1992), чи, незважаючи на тісну позитивну кореляцію між цукристістю коренеплодів та їх зольністю, через сформовану технологіями упередженість у розгляданні Na лише як елемента, що значно погіршує технологічні якості коренеплодів цукрових буряків, збільшуючи втрати цукру з меласою.

Отже слід признати, що на сьогодні не враховується не лише сортова, але й видова специфічність потреби цукрових буряків в Na як в макроелементі, незважаючи на підкреслювану багатьма вченими важливість впливу навіть сортових особливостей мінерального живлення на формування врожаю (Вавилов Н.И., 1967; Климашевский Э.Л., 1991) та екологічну стабільність культурних рослин (Удовенко Г.В., 1996).

Незважаючи на значну потребу цукрових буряків в Na, слід відмітити, що доза 2,0% NaCl була сублетальною для більшості досліджуваних генотипів цієї культури як на рівні проростків в умовах лабораторного засолення, так і на рівні меристемних клонів в культурі *in vitro*, тобто в даних умовах вичерпуються всі їх адаптивні можливості. Ці дані підтверджуються виявленою нами солечутливістю трьох досліджуваних ферментів цукрових буряків і дозволяють вслід за Шевяковою Н.І (1989) стверджувати, що в системі цілої рослини навіть ферменти галофілів повинні бути надійно захищені від інгібуючого впливу солей. В результаті порівняння темпів накопичен-

ня іонів  $\text{Na}^+$  проростками та культурою ізольованих меристем цукрових буряків *in vitro*, нами було зроблено висновок про важливість цілісності рослинного організму та присутності іонів  $\text{K}^+$  для функціонування механізмів запобігання попаданню (чи видалення) іонів  $\text{Na}^+$  в клітину, оскільки меристемні тканини були здатні накопичувати даний елемент в десятки разів більших кількостях, ніж проростки.

Для пояснення стимулюючого впливу іонів  $\text{Na}^+$  на фотосинтетичні показники рослин цукрових буряків в польових умовах поруч з твердженнями Гродзінського Д.М. про здатність рослин до компартиментизації пігментів та їх звільнення під впливом стресових факторів стимулюючих рівнів напруженості (1983) може бути важливим той факт, що спектр **Na** являється основним в сонячному світлі, а також факт універсальності принципів гомеопатії для живих організмів, внаслідок чого натрій в мінімальних кількостях здатний збільшувати кількість фотосинтетичних пігментів, а також площу листа (Куринний Ф.И., Яворская Т.К., 1983). Немаловажною для пояснення даного феномену, на нашу думку, може також виявитися здатність більшості рослин переходити в стресових умовах із  $\text{C}_4$ - на  $\text{C}_3$ -шлях фіксації вуглецю (Биль К.Я., 1993).

В ході наших експериментів було виявлено залежну від рівня засолення та індивідуальної чутливості окремих генотипів зміну фаз захисної відповіді цукрових буряків на сольовий стрес (рис.3), що узгоджувалася із загальною теорією стресів Ганса Сельє (1992).

Фазність адаптивної відповіді цукрових буряків на засолення в наших дослідях проявлялася як у зміні активності ростових процесів, що особливо було помітно на рівні культури меристем *in vitro*, так і у стимулюючій дії даного рівня засолення на вміст пігментів в меристемних тканинах солестійких клонів, а також у відмінностях в темпах накопичення проліну та іонів  $\text{Na}^+$  при підвищенні концентрації хлористого  $\text{Na}$  від 1,0 до 1,5% в проростках та від 1,5 до 2,0% в

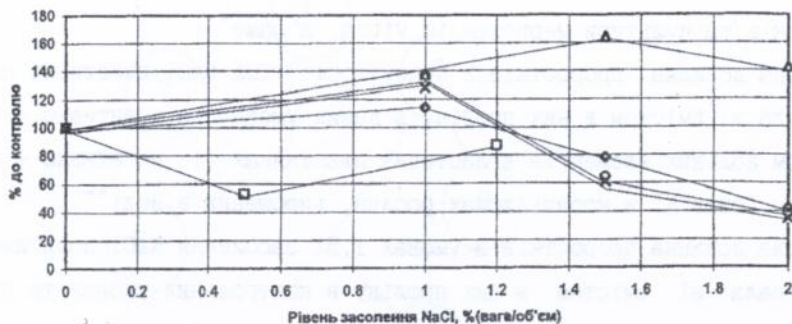


Рис.3. Фазність реакцій вирощуваних *in vitro* меристемних клонів у відповідь на засолення NaCl

Умовні позначення:

- Приріст сирової біомаси меристем    □ АБК (клуб БЦМС-6)    Δ 10Na+  
 × Хлорофіл а (клуб 491)    Ж Каротиноїди (клуб 491)

меристемних тканинах *in vitro* відповідно та зміні балансу фітогормонів останніх при переході від стимулюючих концентрацій NaCl до індіферентно-пригноблюючих і сублетальних (рис.3).

Описана вище фазність відповіді цукрових буряків на сольовий стрес, як і зміна рангів солестійкості окремих генотипів та популяцій при підвищенні рівня засолення, а також відмінності у відповіді однакових за рівнем солестійкості популяцій на осмотичну та токсичну складові дії засолення передбачають наявність різних генетичних механізмів, що зумовлюють ці процеси. Ці міркування підтверджуються літературними даними про існування у рослин двох систем, пов'язаних з локалізованими в плазмалемі та вакуолярних мембранах АТФ-азами, що беруть участь у поглинанні іонів та працюють і досягають насичення при різних концентраціях (Палладина Т.А., 1981; Гродзинский Д.М., 1983), а також гіпотезою Драгавцева В.А. (1984) про еколого-генетичне детермінування кількісних ознак.

В результаті проведення другого етапу наших досліджень було виявлено ряд фізіолого-біохімічних тест-ознак відносної толерантності цукрових буряків до лабораторного засолення NaCl на рівні

проростків та культури меристем *in vitro*, а саме\* :

-відносна довжина проростків в присутності 1,0% NaCl негативно корелювала зі вмістом в них проліну в даних умовах та позитивно - зі вмістом зольних елементів в листових пластинках і негативно - зі вмістом іонів  $K^+$  в коренеплодах рослин, вирощених в полі\*\*;

-відносна довжина проростків в умовах 1,5% засолення NaCl позитивно корелювала зі вмістом в них проліну в контрольних умовах та при 1,0% засоленні хлористим Na, а також негативно, зі середньою силою - з довжиною проростків в контрольних умовах;

-відносний приріст сирової біомаси меристем *in vitro* при засоленні поживних середовищ 1,0% NaCl негативно корелював зі співвідношенням ІОК/АБК в меристемних тканинах рослин, вирощених в польових умовах;

-відносний приріст сирової біомаси меристем цукрових буряків при 2,0% засоленні поживних середовищ корелював позитивно зі середньою силою з відносним вмістом  $K^+$  та співвідношенням  $K/Na$  в них в даних умовах, а також - негативно з приростом сирової біомаси меристем в контрольних умовах; позитивно - з відносними вмістами в них хлорофілів а і б та каротиноїдів в умовах 1,5% засолення NaCl, а також хлорофілу а та каротиноїдів в присутності 2,0% NaCl; позитивно - з вмістом АБК та негативно - з вмістом зеатину в меристемних тканинах клонів, вирощених *in vitro* в контрольному варіанті; негативно - з вмістом ІОК та співвідношенням ІОК/АБК в меристемних тканинах цукрових буряків, вирощених в польових умовах.

Крім наведених вище, можна вважати, що підвищений вміст м-РНК гена *hsp70* та білків теплового шоку в тканинах цукрових буряків також можуть служити тест-ознаками солетолерантності даної культури,

\* Усі наведені нище кореляції, крім вказаних окремо, були сильними ( $r \geq 0,7$ ) та достовірними, мінімум, при 5% рівні значимості.

\*\*Було використано дані про зольний склад рослин в польових умовах Яворської Т.К. та інш. (1984).

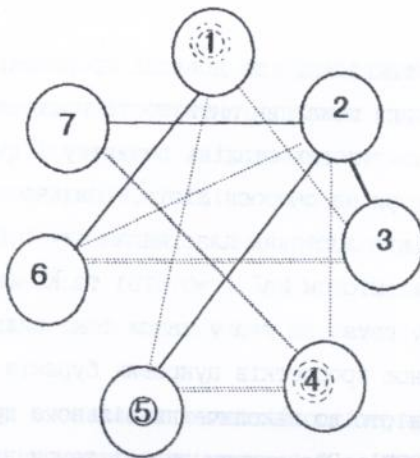


Рис. 5. Сумісність схильності/стійкості цукрових буряків до семи різних захворювань та зв'язок останніх зі солетолерантністю.

Умовні позначення:

- а) цифрами - види захворювань: 1 - корнеїд; 2 - церкоспоров; 3 - еризифоз; 4 - пероноспороз; 5 - вірусна жовтяниця; 6 - мозаїка; 7 - кагатна гнилизна;
- б) лініями - кореляційні зв'язки середньої сили між схильністю до різних захворювань:
- - позитивні;                    - негативні;  
 ..... - достовірні;                    - недостовірні при 5% рівні значимості.
- в) внутрішніми колани - аналогічно сильні кореляційні зв'язки між схильністю до захворювань та солетолерантністю.

оскільки наші дані відносно трьох окремих генотипів були підтверджені на популяційному рівні Лобовим С.В. та Борисюком В.О. (1989).

Для прискорення селекції імунних матеріалів можуть виявитися важливими знайдені в процесі роботи сильні кореляційні зв'язки між толерантністю проростків цукрових буряків до певних доз лабораторного засолення NaCl та схильністю цієї культури до трьох із семи досліджуваних захворювань\*, а також побудована нами схема теоретичної можливості суміщення в одному генотипі цукрових буряків імунності до цих захворювань (рис.4).

\* - Для кореляційних аналізів було використано п'ятирічні результати польових експериментів лабораторії фітопатології Інституту цукрових буряків УААН на штучно створених інфекційних фонах (Петриченко С.Н., 1991).

Крім того, нами було виявлено, що довжина проростків в контрольних умовах як інтегральний показник активності ростових процесів цукрових буряків на початкових стадіях розвитку і дуже важливий для селекції цієї культури на скороспілість, сильно пов'язана із вмістом зольних елементів в листових пластинках ( $r = -0,912$ ) і черешках ( $r = -0,811$ ), а також вмістом  $\text{Na}^+$  ( $r = 0,818$ ) та  $\text{K}^+$  ( $r = 0,664$ ) в коренеплодах рослин. Заслуговує на увагу також факт сильної негативної кореляції між довжиною проростків цукрових буряків в контрольних умовах та їх здатністю до накопичення вільного проліну при 1,0% засоленні  $\text{NaCl}$  ( $r = -0,877$ ). Враховуючи значні темпи накопичення проростками  $\text{Na}^+$  в присутності  $\text{NaCl}$ , він може свідчити про існування непов'язаного з накопиченням проліну механізму осморегуляції у швидкоростучих проростків.

Узагальнюючи наведені вище літературні та експериментальні дані, логічно висловити основні положення стратегії селекції цукрових буряків на комплексну стійкість:

- 1) неможливо сумістити стійкість до всіх захворювань в одному генотипі методами традиційної селекції, оскільки захисні реакції, що лежать в основі імунітету до них, часто протилежно направлені;
- 2) з допомогою традиційної селекції можна створювати лише матеріали з груповою стійкістю до декількох захворювань з врахуванням сумісності імунітету до них та виробничої необхідності в зв'язку з перекриттям ареалів поширення їх збудників;
- 3) традиційна селекція матеріалів з груповою стійкістю повинна йти у напрямку від найбільш важливого чи рідкісного виду імунітету (чи їх поєднання) до менш, тобто з врахуванням їх сумісності;
- 4) для подолання бар'єрів несумісності різних видів стійкості слід використовувати схрещування з дикими родичами та методи генної інженерії.

## ВИСНОВКИ

1. Досліджувані сорти та гібриди цукрових буряків на рівні проростків достовірно відрізняються за ступенем чутливості до різних концентрацій NaCl в лабораторних умовах. Сорти Білоцерківські однонасінні 34, Білоцерківські однонасінні 45, Північно-Кавказькі однонасінні 42 та Киргизькі однонасінні 25 можна використовувати в селекційному процесі як донори генів солетолерантності.

2. Метод визначення солестійкості цукрових буряків за відносною довжиною їх проростків в умовах 1,0 та 1,5% засолення NaCl має найвищу розрізняючу здатність серед п'яти досліджуваних.

3. Існує відповідність між солетолерантністю цукрових буряків в лабораторних умовах на рівні проростків та вирощуваних *in vitro* меристемних тканин.

4. В умовах лабораторного засолення цукрові буряки здатні до накопичення значних кількостей Na як на рівні проростків, так і в культурі меристем *in vitro*.

5. Відносна толерантність цукрових буряків до засолення NaCl викликана, зокрема, їх підвищеною потребою в Na як макроелементі.

6. Концентрація 2,0% NaCl (вага/об'єм) є сублетальною для досліджуваних рівнів організації цукрових буряків в лабораторних умовах.

7. Пролін, АБК та БТШ тісно пов'язані із захисними реакціями цукрових буряків при сольовому стресі, особливо зі стратегією латентності.

8. Реакції цукрових буряків на сольовий стрес властива фазність. Зміна фаз залежить від ступеня відповідності між рівнем засолення та адаптивним потенціалом рослин чи окремих тканин.

9. Ферменти вирощуваних *in vitro* меристемних тканин цукрових буряків пероксидаза, каталаза та поліфенолоксидаза в умовах 1,0 %

засолення NaCl значно знижують свою активність.

10. Виявлені тісні зв'язки деяких фізіолого-біохімічних ознак цукрових буряків зі ступенем їх чутливості до лабораторного засолення NaCl на рівні проростків та культури меристем *in vitro* (6 та 12 кореляцій відповідно) можуть служити теоретичною основою для непрямих методів оцінки селекційних матеріалів за даною ознакою.

11. Толерантність цукрових буряків до засолення NaCl на рівні проростків в лабораторних умовах тісно пов'язана з імунністю даної культури до пероноспорозу, коренеїда та вірусної жовтяниці в польових умовах.

12. Поруч з механізмами комплексної (конвергентної) стійкості у цукрових буряків існують механізми дивергентної стійкості до стресових факторів різної природи.

## ПРОПОЗИЦІЇ

1. Використовувати сорти Білоцерківські однопасінні 34, Білоцерківські однопасінні 45, Північно-Кавказькі однопасінні 42 та Киргизькі однопасінні 25 як донори генів солетолерантності та для біологічного розсолення слабозасолених земель.

2. Для визначення солетолерантності проростків цукрових буряків в лабораторних умовах використовувати методи, основані на вимірюванні їх відносної довжини в умовах 1,0 та 1,5% засолення NaCl або одночасному визначенні відносних показників їх кількості та приросту біомаси при трьох рівнях засолення (1,0; 1,5 та 2,0% NaCl).

3. При вирощуванні фабричних посівів цукрових буряків та при дослідженні збалансованості мінерального живлення цієї культури враховувати її потребу в Na як в макроелементі.

4. Використати виявлені нами тісні зв'язки деяких фізіолого-біохімічних ознак цукрових буряків зі ступенем їх чутливості до лабораторного засолення NaCl на рівні проростків та культури мерис-

тем *in vitro* (6 та 12 кореляцій відповідно) для створення непрямих методів оцінки селекційних матеріалів за даною ознакою.

5. На основі врахування виявлених нами сильних кореляцій створити лабораторні експрес-методи відбору імунних до трьох захворювань генотипів за ступенем солетолерантності їх проростків.

6. Під час селекції матеріалів із груповою стійкістю до декількох захворювань враховувати виявлену нами статистичну ймовірність даного феномену.

7. Дослідити доцільність проведення передпосівного обробітку насіння цукрових буряків та інших культур із врахуванням теорії Г. Сельє про еустрес, використовуючи для цього технологічно доступні стресові фактори стимулюючого (закалюючого) рівню напруженості.

**Основний зміст дисертації викладено в наступних публікаціях:**

1. Вивчення ролі гену теплового шоку в захисних реакціях цукрових буряків при засоленні //Висновки науково-дослідних робіт за 1993 рік. - К.: Інститут цукрових буряків УААН, 1994. - С.33-37 .
2. Оцінка солестійкості буряків по показниках початкового росту рослин // Там же, 1994. - С.37-43.
3. Вивчення солестійкості цукрових буряків на рівні культури меристем *in vitro* //Там же, 1996.- С.97-104.
4. Порівняльна характеристика методів визначення солестійкості цукрових буряків // Там же, 1996. - С.104-110.
5. Различия в экспрессии генов теплового шока в селекционных материалах сахарной свеклы, контрастных по солеустойчивости //Тез. докл. конф. по генетике сомат. клеток в культуре, посвящ. памяти Н.И.Шапира, Звенигород, 12-15 октября 1989 г. - М., 1989. - С.79 (у співавт.).
6. Разработка биохимических тест-признаков солеустойчивости сахарной свеклы //Актуальные проблемы физиологии растений и генетики:

Тез. докл. конф. мол.ученых, Киев, 26-28 мая 1992 г. - К., 1992, С.40 (у співавт.).

7. Рівень експресії гену теплового шоку як можливий маркер стійкості цукрових буряків до засолення //Молекулярно - генетические маркеры и селекция растений: Тез. докл. н. конф., Киев, 10-13 мая 1994 г. -К., 1994. - С.12-13.
8. Increased level of constant expression of a heat shock gene in a clone of sugar beet with complex stress resistance //Biotechnology and genetic engineering of plants: Abstracts Int. Symp. - K., 1994. - P.42.

#### АННОТАЦІЯ

Боднар Г.М. Изучение физиолого-биохимических основ устойчивости сахарной свеклы к лабораторному засолению NaCl и связей этого признака с восприимчивостью к заболеваниям.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 - физиология растений. Институт сахарной свеклы УААН, Киев, 1996 г.

С помощью модифицированных методов на уровне проростков и культуры меристем *in vitro* выделены контрастные по устойчивости к лабораторному засолению NaCl генотипы и популяции сахарной свеклы. В результате их сравнительного изучения определены некоторые тест-признаки солеустойчивости данной культуры на уровне проростков (6 признаков) и культуры меристем *in vitro* (12 признаков). Отмечается, что несмотря на потребность сахарной свеклы в Na как макроэлементе, доза 2,0% NaCl была сублетальной для исследуемых уровней организации растений. Обнаружена тесная связь между толерантностью проростков селекционных материалов к различным уровням засоления NaCl и их восприимчивостью к пероноспорозу, корнееде и вирусной желтухе в полевых условиях. Построена схема статистической достоверности возможности совмещения в одном генотипе сахарной свеклы устойчивости к

семи наиболее распространенным заболеваниям. Сформулированы также основные положения стратегии селекции этой культуры на комплексную устойчивость.

#### ANNOTATION

Bodnar G.M. Study of physiological and biochemical basis of resistance of sugar beet plant to laboratory salting with NaCl and connection this character with the disease susceptibilities.

Thesis for candidate's degree in biological science in speciality 03.00.12 - plant physiology. Institute for Sugar Beet of UAAS, Kyiv, 1996.

Contrast in resistance to laboratory NaCl salting genotypes and populations of sugar beet were selected by modified methods. As a result of their comparable investigation some test-characters of salt-tolerance of this culture on seedling (6 characters) and cultured in vitro meristem (12 characters) levels were determined. It was distinguished that despite on requirement of sugar beet plant to Na as a macronutrient dose 2.0 % NaCl was sublethal for investigated levels of plant organization. Close connection of saltresistance of the seedlings of breeding materials with their susceptibilities to rot roots, perenosporosis and yellows virus was founded. The scheme of statistic reliability of the possibility of combining of resistance to seven most spreaded diseases in one genotype of sugar beet was built. The main principles of strategy of breeding this culture for complex resistance was formulated too.

**Ключові слова:** цукрові буряки, солестійкість, імунитет, комплексна стійкість, тест-ознаки, селекція, стратегія селекції

---

Підписано до друку 24.01.97р. Формат 60x84/16.  
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.  
Тираж 100. Зам. 22.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

44/972

AB 36.921