

СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКІ НАУКИ

УДК 635.615:631.52

ВИЗНАЧЕННЯ СТРУКТУРИ ПОЛІПЛОЇДНИХ ПОПУЛЯЦІЙ КАВУНА МЕТОДОМ ФЛЮОРИСЦЕНТНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ

А. О. Лимар, доктор сільськогосподарських наук, професор

О. А. Бритік, кандидат сільськогосподарських наук, с.н.с.

Миколаївський національний аграрний університет

У статті наведено дані щодо отримання тетраплоїдного вихідного матеріалу кавуна столового. Проведено аналіз рослин на плоїдність методом флюорисцентної цитометрії. У результаті виділено тетраплоїдну форму і проведено інцухт рослин.

Ключові слова: тетраплоїд, кавун, аналізатор плоїдності, поліплоїдна популяція, міксоплоїд.

Постановка проблеми. Маніпуляція з плоїдністю у рослин – важливий інструмент для отримання нових вихідних матеріалів для селекційних програм, а також для відновлення фертильності гамет при міжвидовій гібридизації. Конкуренція з закордонними фірмами і проблема створення своїх вітчизняних триплоїдних гібридів кавуна потребує як високої стабільності за ступенем плоїдності тетраплоїдних запилювачів, так і високої однорідності гібридного насіння за рівнем геному [1, с. 4].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Поліплоїдія (от греч. *polyploos* – багато, *eidōs* – вид) – спадкова мінливість, яка полягає в кратному збільшенні кількості хромосом в клітинах організму. Широко розповсюджена у рослин, серед роздільностатевих тварин зустрічається зрідка. Може бути викликана штучно. У багатьох поліплоїдних форм рослин більш крупні розміри, підвищений вміст деяких речовин, відмінні від вихідних форм терміни цвітіння та плодоношення. На основі поліплоїдії створено високоврожайні сорти [2].

Рослини, в клітинах яких виникло кратне збільшення хромосомного набору, стають більшими, значно крупнішими, збільшуються квітки, плоди, вегетативна маса. В організмі змінюються фізіологічні процеси, підвищується мінливість. У значної кількості поліплоїдів знижується фертильність та спостерігається сповільнений ріст [2].

Поліплоїди отримують в результаті дії на рослини: температури, іонізуючої радіації, хімічних речовин, які порушують веретено поділу клітини. Найчастіше використовують колхіцин – алкалоїд, що отримують з рослин пізньоцвіта осіннього – *Colchicum autumnale*.

Вперше його використав А. Блекслі, О. Ейвері та Б. Небел у 1937 р. Колхіцином обробляють точки росту рослин. Цей алкалоїд перешкоджає розходженню хромосом до полюсів, але не перешкоджає їх репродукції [2].

В Японії, починаючи з 1938 р., проводилися роботи з вивчення та отримання поліплоїдних форм для створення безнасінних кавунів.

Ефективний спосіб отримання тетраплоїдів кавуна розробив Kihara Н. Шляхом дії водного розчину колхіцину 0,2-0,4% концентрації на точку росту сіяньців кавуна [3, с.217].

За спостереженнями вчених, у тетраплоїдних форм кавуна листки, квітки та пилкові зерна відрізняються від диплоїдних. Листя та квітки тетраплоїдів крупніші, ніж у диплоїдів, плоди менші за розміром. Замикаючі клітини продихів та пилкові зерна – крупніші у тетраплоїдів [4, с.95].

З'ясовано, що при штучному запиленні тетраплоїдів кавуна можливо отримати близько 15,5% плодів, а в кожному плоді в середньому від 50 до 120 насінин. Отримані тетраплоїди зберігають свої ознаки, також від них можна отримувати триплоїди (безнасінні кавуни) шляхом запилення диплоїдами.

Традиційні цитологічні методи визначення плоїдності підрахунком хромосом на тимчасових або постійних препаратах є досить затратними, а непрямі методи визначення плоїдності за розміром пилку, числом хлоропластів – не характеризуються високою достовірністю і унеможливають добір особливо при диференціації рослин, близьких за кількістю хромосом як триплоїди, тетраплоїди, анеуплоїди [5, с.218].

Застосування цитофотометричних методів, які спочатку поєднували мікроскопічні дослідження та цитохімічні методики, дозволили вивчати

динаміку маси ДНК в інтерфазних ядрах незалежно від стадій поділу клітини [1, с.5].

Метод флуорисцентної цитометрії відкриває певні перспективи: для диференціації і стабілізації плоідності в експериментальних поліплоідних популяціях у зв'язку зі збільшенням обсягів аналізу та їх ефективністю; для вивчення геномної мінливості клітинних популяцій калюсних культур і рослин-регенерантів у процесі клонального мікророзмноження в умовах *in vitro* [1, с.5].

Постановка завдання. Завданням досліджень було отримати тетраплоідні рослини кавуна для використання їх в селекції безнасінневих форм.

Для виконання завдання необхідно встановити концентрацію хімічних речовин, кратність застосування та стадію розвитку рослин для отримання тетраплоідного вихідного матеріалу кавуна столового. Провести дослідження отриманного поліплоідного матеріалу. Закріпити тетраплоідність у вихідному матеріалі.

Виклад основного матеріалу дослідження. Обробку сухого насіння кавуна проводили колхіцином 0,1% концентрації протягом 24 годин при температурі +28°C. Потім його висівали в ґрунт [6].

Вивчення тетраплоідних форм кавуна та їх диплоідних аналогів проводили за морфологічними показниками: моноеційний тип цвітіння, розмір віночка квітки продуктивність, розмір та колір насіння, ранньостиглість, маса плоду, смакові якості. Проводили самозапилення рослин кавуна. Висівали без повторень по 10 рослин кожного зразка. Схема посіву 2,0 x 1,5 м. Площа однієї ділянки – 30,0 м².

Аналіз мінливості рівня плоідності рослин кавуна проводили з використанням технології аналізатора плоідності (АП) «Partec» [1, с. 39] в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. Для аналізу проводили

етикетування селекційного матеріалу в польових умовах та відбирали молоді листки з черешками. На черешках об'язували тонким шпагатом смужку пергаментної папи із зазначеним номером рослини.

Для приготування суспензії клітин використовували живу тканину верхньої і середньої частини листка (1-2 см²), яку подрібнювали гострим лезом в чашках Петрі з додаванням 0,5 мл буфера «Ф» (ЩБ). Потім додавали 0,5 мл розчину флуорохрому ДАРІ (Partec, Німеччина) та 1 мл буферного розчину «Ф» (ЩБ). Витримували суміш протягом 5-ти хвилин при кімнатній температурі та фільтрували через нейлоновий фільтр для очистки ядер від великих клітин фрагментів та залишків папи.

Вимір інтенсивності флуорисценції та числа ядер в 1 см³ розчину виконували на цитометрі «Partec» з мультиканальним аналізатором. Пробірки з суспензією клітин підключали до електродів.

Для визначення структури поліплоідних популяцій був використаний метод флуорисцентної цитометрії, що дозволяє ідентифікувати експериментальний матеріал за кількісним вмістом ядерної ДНК з використанням комп'ютерних програм аналізатора плоідності (АП) «Partec».

В якості еталону використовували диплоідний зразок кавуна, визначений за кількістю хромосом 2n=22. Збільшення підсилення FL1 на приладі підбирали таким чином, щоб пік G1 ядер, виділених із контрольного матеріалу, був розташований на позначці «50», а клітини в G2 періоді клітинного циклу відповідно з подвійною масою ДНК на каналі «100» (рис.1).

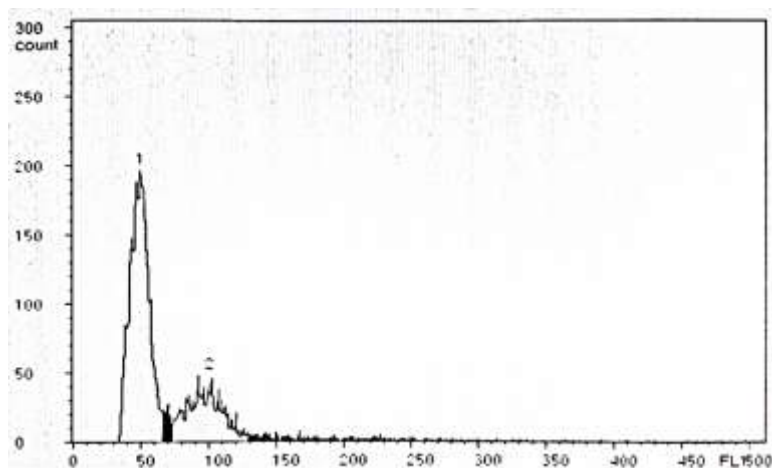


Рис. 1. Гістограма ядерної ДНК диплоідного зразка кавуна A1 2x=22 з max ДНК на каналі «50;100»

Тетраплоїдному рівню плоїдності геному кавунів відповідає пік max ДНК 100 одиниць для ядер в G1 періоді клітинного циклу і 200 од. в

синтетичному і постсинтетичному періоді клітинного циклу (рис.2).

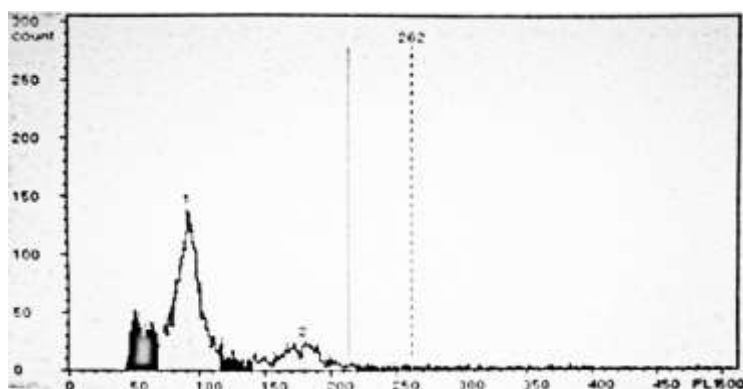


Рис. 2 . Гістограма ядерної ДНК тетраплоїдної зразка кавуна

Визначили плоїдність на проростках насіння після дії колхіцином.

Результати аналізу плоїдності проростків кавуна наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Структура досліджуваних поліплоїдних популяцій за рівнем плоїдності геному з використанням аналізатора плоїдності «Partec», 2017 р.

№ з/п	Поліплоїдні популяції кавунів	К-ть проведених аналізів	Із них за плоїдністю		
			2x 50;100	mix (2x,4x,8x) 50;100;200	4x 100;200
1.	6 i/9-16 i	21	2	8	11
2.	6 i/1-16 i	21	4	5	12
3.	1/9-16 i	29	4	12	13
4.	6 i/3-16 i	23	9	13	1
5.	4/1-16 i	21	6	11	4
6.	6 i/4-16 i	16	9	5	2
7.	1/4 i/16 i	12	11	1	-

Всього проведено 143 аналізи. Кращими за відсотковим співвідношенням тетраплоїдного насіння виявилися номери 6 i/9-16 i, 6 i/1-16 i, 1/9-16 i.

Для виявлення тетраплоїдних рослин та закріплення цієї ознаки в польових умовах 2017 року було висажено три виділені популяції кавуна (по 300 рослин кожної).

Провели аналіз плоїдності рослин кавуна на відібраних молодих листках (табл 2.). Популяція

1/9-16i показала 23,7% тетраплоїдних рослин, популяція 6i/1-16i – 5,3% тетраплоїдів та популяція 6i/9-16i – 3% тетраплоїдів. За результатом аналізу гістограм ядерної ДНК АП “Partec” найбільший відсоток тетраплоїдних рослин показала популяція 1/9-16i.

Проведено інцухт тетраплоїдних рослин та отримано насіння. При штучному запиленні тетраплоїдів кавуна було отримано близько 20,0% плодів.

Таблиця 2

Результат аналізу плоїдності поліплоїдних популяцій кавуна відібраних на полі, 2017 р.

№ з/п	Селекційний номер кавунів	К-ть рослин, шт	Із них за плоїдністю		
			2x 50;100	mix (2x,4x,8x) 50;100;200	4x 100;200
1.	1/9-16 i	300	201	28	71
2.	6 i/1-16 i	300	275	9	16
3.	6 i/9-16 i	300	286	5	9

Тетраплоїдні рослини відрізнялись: масою плоду від 2,5 до 5,1 кг, вмістом сухої розчинної речовини 8,5-10,0%, ранньостиглістю (65,0-68,0 діб), товщиною головної огудини 0,8-0,9 мм, довжиною головної огудини до 350,0 см, більшою за розміром жіночою квіткою 3,5 см, фестончастими зеленими смугами на світло-зеленому фоні та малиною м'якоттю.

Висновки з данного дослідження та перспективи подальшого розвитку в цьому напрямку. Проведено аналіз плідності проростків кавуна. Кращими за відсотковим

співвідношенням тетраплоїдного насіння виявились номери 6 і/9-16 і, 6 і/1-16 і, 1/9-16 і.

Проведено аналіз плідності рослин кавуна висажених в польових умовах. За результатом аналізу гістограм ядерної ДНК АП "Partec" найбільший відсоток тетраплоїдних рослин показала популяція 1/9-16і.

На її основі шляхом закріплення тетраплоїдності буде отримана тетраплоїдна інцухт-лінія для подальшого використання в селекції триплоїдного (безнасінного) гібриду кавуна.

Список використаних джерел:

1. Роїк М.В. Аналіз мінливості рівня плідності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технології аналізатора плідності «Partec»: методичні рекомендації / М.В.Роїк, Н.С. Ковальчук, Л.В. Алексійчук. – К.: Поліграф Консалтинг, 2006. – 39 с.
2. <http://helpiks.org/6-25779.htm>.
3. Kihara, H. Triploid watermelons / H.Kihara // Proc. Amer.Soc.Hort. Sci. –1951.– №58. – P. 217-230.
4. Варивода Е.А. Получение исходного материала для создания триплоидных (бессемянных) гибридов арбуза / Е.А. Варивода, Т.Г. Колебошина // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование. – 2015. – №3 (39). – С. 95.
5. Малецкая (Юданова С.С.) Изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у инбредных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) / С.С. Малецкая (Юданова) // Материалы 2-го съезда ВОГиС. –Санкт-Петербург, 2000. – С.218.
6. Деклараційний пат. 8877 У Україна, МПК 7 А 01Н1/04. Спосіб одержання тетраплоїдної форми кавуна / П.А. Марчук, В.В. Фролов; заявник та патентовласник Інститут південного овочівництва і баштанництва УААН.- № У 200502538; заявл. 21.03.2005; опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8, 2005.

А. О. Лымарь, О. А. Брытик. Определение структуры полиплоидных популяций арбуза методом флюорисцентной цитометрии.

В статье приведены данные получения тетраплоидного исходного материала арбуза столового. Проведен анализ на плоидность методом флюорисцентной цитометрии. В результате выделена тетраплоидная форма и проведен инцухт растений.

Ключевые слова: тетраплоид, арбуз, анализатор плоидности, полиплоидная популяция, миксоплоид.

A. Lyymar, O. Britik. The definition of the structure poliploids of populations watermelon method fluorescent cytometry.

The paper represents the data of the preparation of tetraploid starting material of watermelon. The analysis of ploidy by fluorescent cytometr was heldy. As a result, a tetraploid form was isolated and in-batch.

Key words: watermelon, melon, cluster analysis, signs.