

Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 581.1.633.63
© 2010

Н.С. Ковальчук

Л.П. Рожко

М.В. Роїк,
академік УААН

Інститут цукрових
буряків УААН

ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ РЕГЕНЕРАНТІВ МІЖВИДОВИХ ГІБРИДІВ БУРЯКІВ

*Досліджено особливості спонтанної зміни рівня
плоідності отриманих клональних ліній у процесі
культивування в умовах *in vitro*. Виділено
клональні лінії як вихідний матеріал для селекції
цукрових буряків на основі нового джерела ЦЧС
від дикого виду буряків *Beta maritima L.**

Використано новий вихідний матеріал з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (ЦЧС) від дикого виду буряків *Beta maritima L.* (походження із Греції). Нові джерела стерильності є унікальним вихідним матеріалом для пошуку генотипів і плазмотипів з високим ембріогенним потенціалом та дослідження залежності процесів гіногенезу і калюсогенезу в умовах *in vitro* від плазмогенів диких видів роду *Beta L.* Новий вихідний матеріал, що містить плазмогени дикої форми, може бути використаний для виділення стійких до вірусних хвороб селекційних матеріалів з високим адаптаційним потенціалом. Метод ембріокультури і формування генетичних моделей з використанням маркування за генетичними селективними маркерами можуть значно прискорити створення стерильних аналогів вітчизняних ліній О-типу і нових гомозиготних рекомбінантних ліній — компонентів майбутніх гібридів. Калюсні культури мають високий коефіцієнт розмноження, використовуються у процесі генетичної трансформації рослин і є джерелом нової мінливості за господарсько цінними ознаками для селекції багатьох сільськогосподарських культур [2, 4, 7]. Оскільки в світовому буряківництві існує проблема генетичної уніфікації за єдиною S-цитоплазмою, усі сучасні гібриди цукрових буряків створено лише на основі єдиної стерильної плазми «S» *Beta vulgaris L.* [13]. Нині нові джерела ЦЧС, раніше виділені авторами [12, 14], всебічно досліджують методом молекулярної генетики. У зв'язку з непрямим поділом хромосом у процесі калюсогенезу виникають клітини з незбалансованою їх кількістю. Слід визнати, що для селекційних досліджень може бути використано лише вихідний матері-

ал, стабілізований за кількістю хромосом, бо за таких умов досягають ефекту гібридизації і високої якості насіння у процесі селекції. Динаміку геномної мінливості калюсних культур вивчали у вітчизняній біотехнології переважно з використанням методів цитологічного аналізу [1, 2, 5, 6, 10, 11]. Ці дослідження проведено з упровадженням методу флуоресцентної цитометрії для прискорення процесу добору нового вихідного матеріалу і досягнення більшої ефективності методу ембріокультури для практичної селекції.

Мета досліджень — виділити клональні лінії, стабілізовані за рівнем генома, і дослідити особливості спонтанної зміни рівня плоідності в процесі їх депонування в умовах *in vitro*.

Матеріал та методики досліджень. Предметом досліджень були нові вихідні матеріали, зокрема гібриди F₁, отримані в генетичній моделі аналізуючого схрещування з використанням нових джерел ЦЧС (походження із Греції). Нові джерела ЦЧС виділені в секторі цитогенетики Інституту цукрових буряків УААН.

Схема експериментальних досліджень для одержання гібридів F₁ включала генетичне маркування за ознаками забарвлення гіпокотелю Rr, одностійний цикл розвитку Bb і ядерні гени ЦЧС Xx; Zz. Згідно з генетичною моделлю експерименту гібридам I покоління відповідав генотип F₁xxzzMmRrBb.

Для індукції гаплоїдів, дигаплоїдів і калюсних культур в умовах *in vitro* з недозрілих насінневих зачатків використовували модифіковану нами методику [1].

Насінневі зачатки в культуру *in vitro* вводили на початку і в середині фази цвітіння висадків. Квітконості пагони, стерильні за пилком

Динаміка геномної мінливості калюсних культур, отриманих від гібридів F_1S в умовах *in vitro* з використанням АП «Partec»

Експериментальний номер	Показники торфоутворення, шт.**	Динаміка геномної мінливості калюсних культур залежно від терміну пасажу*							
		I		II		III		IV	
		1	2	1	2	1	2	1	2
1	54	50,100,200	n,2n,4n	100	2n	100	2n	100	2n
2	44	70,150	1,5n,3n	100	2n	70	1,5n	100	2n
3	8	70,150	1,5n,3n	100	2n	—	—	—	—
4	13	70,150,300	1,5n,3n,6n	100	2n	70,150	1,5n,3n	100	2n
5	74	50	n	50	n	100	2n	100	2n
6	61	50	n	100	2n	100	2n	100	2n
7	46	50	n	70	1,5n	100	2n	100	2n
8	9	50	n	50,100,200	n,2n,4n	100	2n	100	2n
9	52	50	n	70	1,5n	70,150	1,5n,3n	100	2n
10	23	50	n	70	1,5n	70	1,5n	100	2n
11	63	50	n	100	2n	100	2n	100	2n
12	140	50	n	70	1,5n	100	2n	100	2n

* Пасаж — термін клоонування при депонуванні нового покоління клональних ліній в умовах *in vitro*;
** показники морфоутворення — інтенсивність формування регенерантів у вторинних калюсних культурах;
1 — пік ДНК; 2 — плоідність.

насіників F_1 , на стадії бутонізації переносили в поліетиленовий пакет зі зволеним фільтрувальним папером і зберігали в холодильнику до 4 діб за температури 4°C. Стерилізували бутони розчином хлораміну з масовою часткою 5—10% упродовж 30 хв, потім 3—4 рази промивали стерильною дистильованою водою. Насіннєві зачатки брали із закритих бутонів, пінцетом відривали бутон від пагона і голкою відокремлювали від зав'язі насіннєвий зачаток.

Для культивування насіннєвих зачатків досліджували селективні середовища з різною концентрацією цитокінінів і гетероауксинів

Перед охолодженням живильне середовище для збільшення площі садіння пробірки нахилили на 30—40°. Висаджені зачатки 2—3 тижні культивували в темряві, потім — при денно-ночному світлі.

Метод генетичного маркування і добору регенерантів за маркерними генами розроблено в секторі цитогенетики. Генетичне маркування дає змогу в процесі гіногенезу провести добір вихідних матеріалів за доміантними і рецесивними ознаками вихідних батьківських форм: 1-

і 2-річний цикли розвитку, диференціювання забарвлення і форми листових пластинок.

Виділяли первинні і вторинні калюсні культури. Із регенераційноспроможних калюсних культур формували клональні лінії і проводили аналіз їхньої плоідності за цитофотометричними методами. Залежно від термінів пасажу

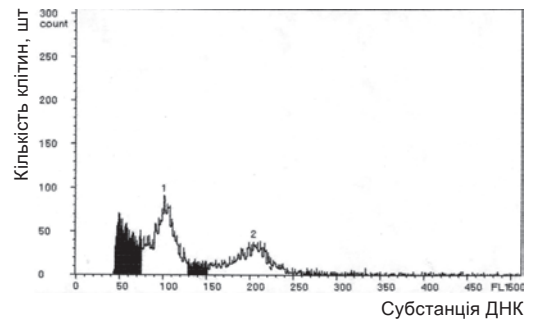


Рис. 1. Розподіл клітинної суспензії за ступенем плоідності на АП «Partec» у диплоїдній лінії № 0302 Beta vulgaris L.

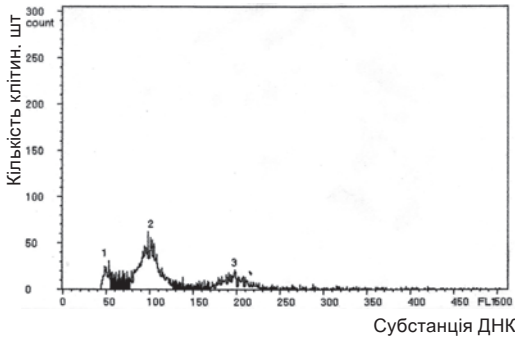


Рис. 2. Міксплоїдний стан генома клональної лінії F₁S із середнім значенням інтенсивності флуоресценції на осі ОХ 49,82 од., 99,76 од., 197,24 од.

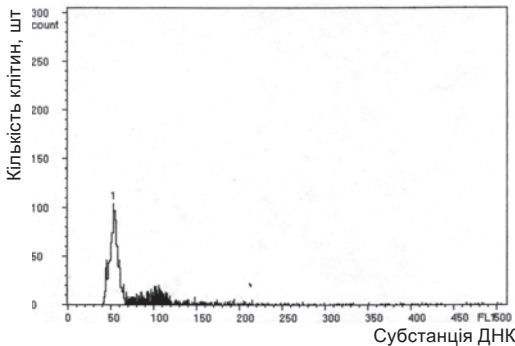


Рис. 3. Гаплоїдний стан генома клональної лінії F₁S № 5

повторно проводили дослідження плоідності нових регенерантів. Уміст у клітинах рослин ДНК визначали за методикою ідентифікації рівня генома залежно від кількісного вмісту ядерної ДНК у клітині з використанням комп'ютерних технологій АП «Partec» [9]. Дослідження проведено у 2008—2009 рр.

Схема досліджень передбачала визначення мінливості плоідності на регенерантах вторинних калюсних культур; лініях-клонах визначеної плоідності при їх депонуванні впродовж 4-х пасажів.

Для приготування суспензії ядер використовували листки площею 1—2 см², які подрібнювали гострим лезом, уникаючи роздавлювання, у чашках Петрі з додаванням 0,5 мл буфера «Ф» [9].

Після подрібнення листків у чашку Петрі додавали 0,5 мл розчину флуорохрому ДАРІ («Partec», Німеччина). Витримували суміш упродовж 5 хв за кімнатної температури в чашках Петрі і фільтрували через нейлоновий фільтр для очищення ядер від великих клітинних фрагментів та залишків листя.

Вимір інтенсивності флуоресценції та кіль-

кості ядер у 1 см³ розчину виконували на цитометрі «Partec» з мультіканальним аналізатором. Пробірки із суспензією клітин підключали до електродів. [9]. Гістограми описували розподіл досліджуваних клітинних субстанцій: кількість клітин з певним умістом ядерної ДНК.

Отримані рослини-регенеранти після диференціації за ступенем плоідності розмножували методом клонального мікророзмноження в умовах *in vitro* [3, 8].

Результати досліджень. У 2008 р. із висаджених 285 насінневих зачатків від насінників гібридів F₁S (Греція) було отримано 58 калюсних культур. Із них морфогенний калюс спостерігали в 54 експлантах. Отримані рослини-регенеранти з вторинних калюсних культур розділили на лінії, які досліджували за динамікою геномної мінливості з використанням цитометричних методів на АП «Partec». При депонуванні рослини-регенеранти змінювали плоідність, і до 4-го пасажу всі клони стабілізувались до диплоїдної форми. Результати досліджень геномної мінливості наведено в таблиці.

Як стандарт використовували диплоїдні ЧС-лінії цукрових буряків за селекційним номером № 0322, попередньо визначені за кількістю хромосом.

Диплоїдному рівню генома цукрових буряків відповідає на гістограмі пік ДНК 106 од. при CV 9,1 та клас клітин з подвійним умістом ДНК на каналі 200 (рис. 1).

При дослідженні регенерантів вторинного калюсу отримали клони різної плоідності. На рис. 2, 3 зображено аналіз гістограми ДНК регенерантів з міксплоїдним і гаплоїдним станом генома.

У процесі культивування калюсних культур і розмноження клонів спостерігали ознаки закріплювача стерильності цукрових буряків (безантоціанове забарвлення черешків і листя, 2-річний цикл розвитку) і дикого виду *Beta maritima* L. (1-річний цикл розвитку і стрілкування в умовах *in vitro*, антоціанове забарвлення листків і черешків). Виділили регенеранти, що за морфологічними ознаками відповідали фенотиповим ознакам цукрових буряків, закріплювачів стерильності: присутність лише рецесивних алелів $\gamma\gamma$ гена забарвлення гіпокотеля і рецесивних алелів $b^{\text{b}}b^{\text{b}}$ гена 2-річного циклу розвитку. Серед нових ознак можна виділити рослини з високою регенераційною здатністю, вузьколисті і хлорофільні мутанти. Слід зазначити, що серед рослин, які мають фенотипові ознаки диких видів і рослин з фенотиповими ознаками закріплювача стерильності цукрових буряків, виділено за відсутності антоціанового забарвлення клональні лінії з 1- і 2-річними циклами розвитку, що свідчить про

широкий спектр геномних перетворень, які проявляються не лише в зміні кількості хромосом,

а й структурних перебудовах ДНК у ділянці локалізації генів.

Висновки

З використанням аналізатора плідності «Partec» в умовах *in vitro* досліджено динаміку геномної мінливості клональних ліній, отриманих із калюсних культур міжвидових гібридів F_1 (*B. vulgaris* L. \times *B. maritima* L.). Залежно від термінів пасажу виявлено повну стабілізацію їх за рівнем плідності до диплоїдного рівня генома впродовж 4-х пасажів.

Виділено клональні лінії за фенотиповими ознаками дикого виду буряків і цукрових буряків, що свідчить про високу мінливість структури генома калюсних культур.

Отримано гомозиготні лінії від гаплоїдних регенерантів із вторинних калюсних культур шляхом спонтанної зміни рівня плідності в умовах *in vitro*.

Бібліографія

1. Білоус В.О., Ільєнко І.І., Олійник Н.А., Павловська Л.Л., Бердишев О.Г. До методики одержання гаплоїдних рослин цукрових буряків з ізольованих незапліднених насінневих зачатків//Цукр. буряки. — 2006. — № 6. — С. 12—13.
2. Дубровна О.В., Лялько І.І., Губанова Н.Я. Микрклональное размножение и перевод стерильной культуры сахарной свеклы по признаку стерильной пыльцы//Цитология и генетика. — 2004. — № 5. — С. 24—29
3. Ильенко И.И., Редько В.И., Павловская Л.Л. Микрклональное размножение и перевод стерильной культуры сахарной свеклы в грунт//Селекция и семеноводство. — 1985. — Вып. 59. — С. 27—29.
4. Кіщенко О.М., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання трансгенних рослин цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) ліній О-типу за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*//Цитология и генетика. — 2004. — № 5. — С. 3—8.
5. Кунах В.А. Изменчивость числа хромосом в онтогенезе высших растений//Цитология и генетика. — 1978. — 12, № 2. — С. 160—173.
6. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе//Биополимеры и клетка. — 1994. — 10, № 6. — С. 5—35.
7. Пахомов А.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ эмбриогенного потенциала сортов сои, районированных в различных эколого-географических зонах мира//Цитология и генетика. — 2005. — № 5. — С. 20—27.
8. Редько В.І., Ільєнко І.І., Павловська Л.Л., Білоус В.О. Методичні рекомендації по мікрклональному розмноженню цукрових буряків. — К., 1997. — 10 с.
9. Роїк М.В., Ковальчук Н.С., Алексійчук Л.В. Методичні рекомендації. Аналіз мінливості рівня плідності геному вихідних селекційних матеріалів цукрових буряків з використанням технології аналізатора плідності «Partec». — К., 2006. — 40 с.
10. Славова И.В., Рафаилова Е.Г. Получения гаплоидных растений из неоплодотворенных семян сахарной свеклы *B. Vulgaris* в условиях *in vitro*//Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. — М.: Наука, 1991. — С. 157—162.
11. Сьтнік Е.С., Парій А.Ф., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuate*, полученных путем переноса трансформированных пластид от цибрида *N. Tabacum* (+S. Sinuata)//Цитология и генетика. — 2003. — № 5. — С. 3—8.
12. Bosemark N.O., Zeven A.C., Harten van A.M. Genetic poverty of sugar beet in Europe//Roc. Conf. Broadening Genet, Base Crops, Eds., Pudoc, Wageningen, 1979. — P. 29—35.
13. Mikami T., Kishima Y., Sugijura M. and Kinoshita T. Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm//Theor. Appl. Genet, 1985. — V. 71. — P. 166—171.
14. Oldemeyer R.K. Sugar beet male sterility//J. Am. Soc. Sugar Beet Technol, 1957. — V. 9. — P. 381—386.