



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.63.631.52
© 2012

*М.В. Роїк,
академік НААН
Н.С. Ковальчук*

*О.А. Яцева
Інститут біоенергетичних
культур і цукрових буряків
НААН*

*С.І. Малецький,
доктор біологічних наук
Інститут цитології
і генетики СВ РАН*

ЩОДО ГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ЗАБАРВЛЕННЯ КОРЕНЕПЛОДІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ (*BETA VULGARIS L.*)

*Наведено оцінку розвитку апозиготії, досліджено
теоретичні основи епігеномної мінливості і
нового способу репродукції насіння цукрових
буряків.*

Усі селекційні програми спираються на внутрішньопопуляційну мінливість, що забезпечує створення нових сортів зі зміненими ознаками та характеристиками. Селекція рослин разом із генетичною мінливістю досить широко використовує й епігенетичну мінливість. Епігенетичні дослідження активно проводяться на рослинах і значно розширили можливості їх селекційного вдосконалення [5, 11]. Дослідники апоміксису аналізували епігенетичну мінливість ознак з огляду на зміну способу насінневої репродукції рослин [7, 10].

Насіння у цукрових буряків можна отримувати двома способами — зиготичним (само- або перехресне запилення) чи апозиготичним (партеногенез). Із зигот, які виникли в результаті само- або перехресного запилення, розвивається насіння, що поєднує генотипи двох батьків. За партеногенезу (однобатьківське розмноження) насіння розвивається з клітин зародкового мішка (гаметофітна апозиготія) або із соматичних клітин нуцелусу й інтегументів (спорофітна апозиготія). Спорофітну апозиготію вперше описав М.В. Фаворський [16], що надалі було підтверджено вітчизняними дослідниками [3, 6, 15, 17]. З генетичного погляду, спорофітний і гаметофітний типи апозиготії відрізняються радикально. Спорофітну апозиготію у рослин розглядають як клонування і його насіннєве потомство має бути генетично ідентичним материнській рослині [3, 15]. За гаметофітної апозиготії у формуванні нового насіннєвого покоління беруть участь мегаспори, що вини-

кають з мейоцитів, тобто насіння, отримане методом гаметофітної агамоспермії, дає потомства, які сегрегують за будь-якими маркерними ознаками [7, 8, 10]. Це явище позначено нами як автосегрегація.

Насіння в системі репродукції цукрових буряків є основним способом утворення нового організму, що забезпечує відтворення і розмноження цієї культури. Значний генетичний поліморфізм селекційних матеріалів цукрових буряків викликаний перехресним запиленням і супроводжується, на думку дослідників, генетичною різноякісністю або гетерогенністю насіння, що зумовлено переважно різним походженням зародка (Батигіна, 2000; Жужжалова, 2011). Для отримання апозиготичних насіннєвих потомств насамперед використовують пилкостерильні рослини з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (ЦЧС). Рівень насіннєвої продуктивності за безпилкового методу репродукції у цукрових буряків варіює, але завжди є достатньо високим для використання у селекційних і генетичних дослідженнях [8, 18].

Рослинам родини *Chenopodiaceae*, до яких належать і всі види буряків, притаманна ендопліплоїдія — в ядрах клітин спонтанно змінюється (збільшується чи зменшується) кількість хроматид у хромосомах або кількість хромосом на ядро [19, 21]. Нестабільність кількості геномів у клітинах призводить до мінливості кількості хромосом у клітинних популяціях. Міксоплоїдія виявляється в тому, що у клітинних популяціях меристем та органів, що вегетують поряд

із домінуючою фракцією клітин з основною кількістю хромосом, трапляються фракції клітин, у яких кількість хромосом в ядрах менша чи більша від їх основної кількості [14]. Ендоплоїдні клітини можна знайти в різних тканинах рослини цукрових буряків [19]. Якщо ендоплоїдні клітина міститиметься у «потрібному» місці, то вона може потрапити у проліферативний центр й отримати властивості стовбурової клітини, з якої виникає мегаспороцит. Отже, ендоплоїдні клітини потрапляють на «зародковий шлях», утворюючи мегаспори з диплоїдними ядрами. Проте це не єдиний спосіб утворення зародків методом апозиготії. Ембріологічні дослідження дали змогу виявити поліембріонію у цукрових буряків з ЦЧС, що розмножуються без пилку. Розроблено новий спосіб виділення гаплоїдних паростків під час пророщування апозиготичного насіння, їх частка становить 8–11% [13].

За зиготичного й апозиготичного способів репродукції від диплоїдних рослин отримують переважно диплоїдне (точніше дигаплоїдне) і гаплоїдне насіння [12]. Дигаплоїдне насіння за апозиготії утворюється через те, що в мейоз вступають ендотетраплоїдні клітини. Це означає, що за апозиготії спостерігається полісомічний (тетрасомічний) тип сегрегації хроматид. Наслідком цього є те, що в апозиготичних потомствах сегрегація за маркерними ознаками відрізняється від менделівських пропорцій [9, 10]. Вивчення динаміки геномної мінливості у рослин, що вегетують, отриманих від апозиготичного насіння методом проточної цитофотометрії, свідчить про можливу політенію як результат зміни мітотичного поділу клітин (Роїк, Ковальчук, 2010).

Як один із найпопулярніших генетичних маркерів у селекційно-генетичних дослідженнях у цукрових буряків широко використовують ознаки забарвлення (Буренин, 1984; Мглинець, 2010). Тривалий час існувала думка, що пігментне забарвлення гіпокотилу і коренеплодів у цукрових буряків детермінують 2 локуси — Y (yellow) і R (red), кожний з яких представлений серіями багатьох алелів [23, 25]. Пігментне забарвлення цукрових буряків визначається синтезом β -аланінів, і цей синтез контролюють домінантні алелі двох тісно зчеплених локусів, один з яких (Rr) контролює синтез β -ціанів, а інший (Yu) — β -ксантинів. Величина рекомбінації між локусами Y і R становить 7–8% [23, 25, 26], і обидва локуси локалізовані в II хромосомі [20]. Домінантні алелі Y-локусу (генотип rYY) визначають жовте забарвлення коренеплоду, тоді як рецесивні алелі (yy) цього самого локусу — біле забарвлення коренеплоду. Рослини генотипу RRYu мають червоний гіпокотель, але біле забарвлення коренеплоду.

Пізніше було знайдено 3-й локус (Pr), що

бере участь у контролюванні забарвлення коренеплоду цукрових буряків. Шведський генетик A. Pedersen схрещував рослини з білим або блідо-жовтим забарвленням коренеплоду кормових буряків (сорт Gartons White Knight) з формами цукрових буряків з білим забарвленням коренеплоду. Незважаючи на те, що у схрещуванні брали участь не пігментовані матеріали, у потомства виявляли рослини із червоним забарвленням коренеплоду. На основі таких спостережень він припустив, що для розвитку червоного або жовтого забарвлення коренеплоду потрібний фактор «P» (production). Його знайдено у гомозиготному стані у більшості форм буряків, але не було у сорту Gartons White Knight, його генотип — RRYypp [24]. Запис генотипу сорту White Knight свідчить, що рецесивні алелі «р» пригнічують розвиток забарвлення коренеплодів цього сорту. Виявлено існування 3-го локусу, що контролює пігментацію різних частин рослини цукрових буряків [7, 24]. Якщо в одних дослідженнях 3-й локус, що інгібує розвиток забарвлення коренеплодів, виявлено за гібридологічного аналізу потомств, отриманих від схрещування форм кормових і цукрових буряків без забарвлення [24], то в інших наявність 3-го локусу виходить з аналізу розщеплення у гібридів в апозиготичних потомствах цукрових буряків [7].

Матеріали і методи дослідження. Як вихідний матеріал у цих дослідженнях використано насіннєві потомства 7-ми пилкостерильних ліній з ЦЧС, репродукованих апозиготичним методом на Ялтушківській дослідно-селекційній станції (Вінницька обл.). Насіння отримано в теплиці у 2010 р. Наступного року його висіяли у вегетаційний посуд і впродовж вегетації спостерігали за його ростом і розвитком.

Як модель для характеристики автосегрегації за маркерними генами в апозиготичних потомствах використано гіпергеометричну схему розподілу імовірності [9, 10].

Результати дослідження та їх обговорення. Під час збирання врожаю коренеплодів, отриманих з апозиготичного насіння, восени 2011 р. виявлено: якщо батьківські лінії, взяті до експерименту, мали коренеплоди з білим забарвленням упродовж усього строку їх репродукції, то апозиготичні потомства розщеплювалися (автосегрегація) за ознаками забарвлення коренеплодів — поряд з незабарвленими (білими) частина коренеплодів мала жовте або червоне забарвлення (рисунк).

Практично в усіх потомствах рослин, які продукують насіння апозиготично (виняток — селекційний № 10–311 ЧС, у якого не знайдено коренеплодів із жовтим забарвленням), виявлено коренеплоди із жовтим і червоним забарвленням (таблиця). Оскільки пилкостерильні лі-



Цукрові буряки, вирощені з апозиготичного насіння

Забарвлення коренеплодів у 7-ми апозиготичних потомств цукрових буряків

Селекційний №	Забарвлення коренеплодів			Кількість рослин
	біле	червоне	жовте	
10-73 ЧС	13	5	2	20
10-198 ЧС	6	4	9	19
10-200 ЧС	8	7	5	20
10-301 ЧС	17	3	1	21
10-311 ЧС	20	1	—	21
10-316 ЧС	7	10	4	21
10-1573-10-5 ЧС	13	9	3	25
Усього	84	39	24	147

ні тривалий час до експерименту розмножувались у контрольованих схрещуваннях за допомогою закріплювачів (ліній О-типу), то жодних змін у забарвленні коренеплодів під час зиготичної репродукції насіння в контрольному варіанті не спостерігали.

Якби коренеплоди з червоним і жовтим забарвленням були отримані від схрещування рослин, що відрізняються за забарвленням, то відсоток співвідношення забарвлених коренеплодів був би вищим, ніж без забарвлення. У будь-яких гібридологічних дослідженнях відсоток потомств з домінантним типом експресії генів завжди більший, ніж рецесивних. У нашому прикладі з коренеплодами, вирощеними з апозиготичного насіння, відсоток з домінантними типами забарвлення був менший, ніж коренеплодів без забарвлення. Це означає, що в цьому експерименті відбувається розчеплення не за генами забарвлення, які в батьківських ліній не виявлялись, а за супресорним локусом Рr, який регулює експресію домінантних алелів локусів Rr і Yy.

Якщо розглядати хромосоми у диплоїдній формі цукрових буряків як дихроматидні (або клітинні ядра як ендотетраплоїдні), то генотип вихідних рослин, використаних для апозиготичної репродукції, можна записати як Р*ррr. Знак * у алеля Р свідчить про те, що домінантний алель Р є у генотипі рослин, але він неактивний і зберігає свій стан за зиготичного способу репродукції (неактивний). Перехід до нового способу репродукції насіння активує алель Р, і рослини починають виробляти пігменти, тобто спостерігається епігенетична мінливість (активація) у супресорному локусі — Р*ррr→Рррr. Один з найпопулярніших механізмів епігенетичної мінливості у рослин — метилування і деметилування геному [5].

З огляду на це за нульову гіпотезу приймаємо припущення, що забарвлення коренеплодів у досліді описується автосегрегацією за локусом Рr. Тоді частоти генотипів мегаспор, з яких формуються апозиготичні ембріони за локусом Рr за хроматидного типу розчеплення, можна обчислити за формулою:

$$(2/2)(6/0)PP+(2/1)(6/1) Pp+(2/0)(6/2)pp=28.$$

Отже, пігментованих коренеплодів (з червоним і жовтим забарвленням) у вибірці — 13/28% (рослини генотипів РР і Рр), не пігментованих (білих) — 15/28% (рослини генотипу рр). У перерахунку на експериментальну вибірку (147 коренів) теоретично очікується, що кількість коренеплодів із забарвленим фенотипом становить 68,25, без забарвлення — 78,75 шт. В експерименті забарвлених коренеплодів (червоних і жовтих) — 63, без забарвлення — 84%. Величина $\chi^2=0,75$ (Р=0,95) свідчить, що наявна висока відповідність відсотка фенотипу з нульовою гіпотезою.

Наявність у потомстві рослин з білим забарвленням коренеплоду рослин з червоними і жовтими пігментами у цукрових буряків не є унікальним явищем й описана у багатьох наукових роботах. Наприклад, аналогічне спостереження було зроблено на пшениці (Е.Д. Богданова, 2003). У разі замочування насіння в нікотинової кислоти (в масовій кількості до 50%) у рослин змінювалися морфологічні ознаки (товщина стебла, довжина колоса, розростання стеблових вузла) і забарвлення. Ці зміни зберігаються впродовж багатьох поколінь (десятиліть) і є джерелом мінливості, що широко використовується в селекції цієї культури.

Висновки

Апозиготична репродукція насіння у цукрових буряків призводить до епігенетичних змін

у геномі. Зокрема, від материнських рослин з білими коренеплодами утворюються росли-

ни з червоними і жовтими коренеплодами. Аналіз автосегрегації за ознаками забарвлення свідчить, що цей феномен, імовірно, пов'язаний з активацією локусу *Pp*, який контролює синтез пігментів у різних формах цукрових буряків.

заний з активацією локусу *Pp*, який контролює синтез пігментів у різних формах цукрових буряків.

Бібліографія

1. Богданова Е.Д. Генетическая изменчивость пшеницы, индуцированная никотиновой кислотой и ее производными: автореф. дис. на соиск. науч. ст. д-ра биол. наук. — Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 1992. — 35 с.
2. Богданова Е.Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. — 2003. — 39, № 9. — С. 1221–1227.
3. Богомолов М.А. Апомиксис и его роль в селекции сахарной свеклы // Сах. свекла. — 2005. — № 8. — С. 19–21.
4. Буренин В.И. Гены и генетическая коллекция свеклы // Генетика сах. свеклы. — Новосибирск: Наука, 1984. — С. 37–45.
5. Ванюшин Б.Ф. Энзиматическое метилирование ДНК — эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия. — 2005. — 70, № 5. — С. 598–611.
6. Зайковская Н.Э., Ярмолюк Г.И., Болелова З.А. Особенности апомиксиса у анеуплоидных форм сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ, 1978. — № 9. — С. 11–13.
7. Левитес Е.В., Овечкина О.В., Малецкий С.И. Авто- и эписегрегация по признакам окраски в агамосперных потомствах свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. — 1999. — 35, № 8. — С. 1086–1092.
8. Малецкая Е.И., Малецкий С.И. Апозиготический способ репродукции и гаплоидия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Факторы экспериментальной эволюции организмов: 36. науч. пр. — Т. 3. — К.: Логос, 2006. — С. 274–280.
9. Малецкий С.И. Сцепленное и несцепленное наследование в партеногенетических потомствах растений // Генетика. — 1997. — 33, № 10. — С. 1333–1340.
10. Малецкий С.И. Генетический анализ у автотетраплоидных растений // Биоматериальные распределения в генетических исследованиях на растениях. — Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. — С. 31–49.
11. Малецкий С.И. Эпигенетические и синергические формы наследования репродуктивных признаков у покрытосеменных растений // Журн. общ. биологии. — 2004. — Т. 65. — С. 116–135.
12. Малецкий С.И., Малецкая Е.И. Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. — 1996. — 32, № 12. — С. 1643–1650.
13. Малецкий С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С. Наследование признака ЦМС в апозиготических потомствах сахарной свеклы // Энциклопедия рода *Beta*: биология, генетика и селекция свеклы. — Новосибирск: Сова, 2010. — С. 205–216.
14. Ригер Р., Михаэлис А. Генетический и цитогенетический словарь. — М.: Колос, 1967. — 607 с.
15. Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции: автореф. дис. на соиск. науч. ст. д-ра биол. наук. — Алматы, 1996. — 44 с.
16. Фаворский Н.В. Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Тр. науч. ин-та селекции. Вып. 2. — К.: Сортоводно-семенное управление сахаротреста, 1928. — С. 3–11.
17. Ширяева Э.И., Ярмолюк Г.И., Кулик А.Г., Червякова В.В. Апомиксис у самоопыленных линий сахарной свеклы и использование его в селекции // Цитология и генетика. — 1989. — 23, № 3. — С. 39–44.
18. Цильке Р.А., Позняк С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И. Завязываемость плодов у гибридов сахарной свеклы при апозиготической репродукции в контрастных условиях выращивания // Вестн. НГАУ. — 2010. — 5, № 3. — С. 19–25.
19. Юданова С.С. Миксоплоидия клеточных популяций сахарной свеклы и ее связь с репродуктивными признаками: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. — СПб.: Всерос. НИИ растениеводства, 2004. — 25 с.
20. Butterfass Th. Die Zuordnung der Lokus R der Zuckerrübe (Hypokotylfarbe) zum Chromosomen II // Theoretical and Applied Genetics. — 1968. — V. 38. — P. 348–350.
21. Gentcheff G., Gustafsson A. The double chromosome reproduction in Spinaceae and its causes. 1. Normal behavior // Hereditas. 1939. — 25, № 3. — P. 349–358.
22. Kajanus B. Genetische studien an Beta // Z. Inductive Abstammungsvererbungslehre, 1912. — № 6. — S. 137–179.
23. Keller W. Inheritance of some major color types in beets // J. Agric. Res. — 1936. — 52, № 1. — P. 27–38.
24. Linde-Laursen I. A new locus for colour formation in beet, *Beta vulgaris* L. // Hereditas. — 1972. — 70, 10. — P. 105–112.
25. Owen F.V., Ryser G.K. Some mendelian characters in *Beta vulgaris* and linkages observed in the Y-R-B group // J. of Agric. Res. — 1942. — 65, № 3. — P. 155–171.
26. Pedersen A. The colours of beets (*Beta vulgaris* L.). K. Vet. — og Landbohøjsk. — Arsskr, 1944. — P. 60–111.