

Визуальная морфологическая оценка генетически модифицированных растений не показала их отличия от контрольных: листья черешковые с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием, сбегая по черешку. Наибольшую ширину лист имеет в середине пластинки, проявляется гофрированность листа. Цвет листовых пластинок меняется от зеленого до темно-зеленого. В процессе старения переходит в желто-бурый тона.

Таким образом, для успешного выделения генетически модифицированных растений с устойчивостью к фитопатогенам необходимо проводить оценку в 3 этапа: первичный отбор в условиях *in vitro* на селективной среде, подтверждение наличия целевого гена в растительном геноме методом ПЦР, вторичный отбор в условиях закрытого грунта на искусственно зараженной почве.

Полученные данные позволили разработать методику создания трансгенных растений с устойчивостью к фитопатогенам. Преимущество данного метода состоит в передаче гена *rs* из пыльцы в семяпочку через систему пыльцевых трубок (PTS), что позволяет сократить продолжительность получения трансгенных форм растений, осуществлять работу независимо от времени года.

#### Список литературы

1. Нуждина В. В., Матасов А. А. Учет корневых гнилей и классификация селекционного материала сахарной свеклы по устойчивости к почвенным фитопатогенам // Методические указания. – Рамонь, - 2003. – 24 с.
2. Парашина Е.В., Аветисов В.В. и др. Использование гена защитного пептида (дефензина) из семян редьки для повышения устойчивости томатов к заболеваниям, вызываемым грибами // Биотехнология. - 1999 - №6. - С.35-41.
3. Рассадина Г. В. Юрьева Н. О., Ефремова Н.Н. Методические указания по получению трансформированных растений картофеля. - М.: - 1995. - 15 с.
4. Цветков И.Л., Дорохов Д.Б. Гончаров Ж.Л. и др. Идентификация российских сортов картофеля посредством построения профилей белка и ДНК/ /Potato global Research e. Development. -V.1. - 2000. -С. 242-248.
5. Terras R.G. et al // Plant Cell. -1995. -V.7- №5. - P.573-588.

#### Анотація

Наведені результати з проведення генетичної трансформації цукрових буряків з використанням системи пилкових трубок (PTS) і вектора Ti-плазми *Agrobacterium tumefaciens*, яка несе ген *rs* дефензіна редьки. ПЦР-аналізи виділені генетично модифіковані рослини цукрових буряків і показана їх стійкість на штучному інфекційному фоні до корневих і кагатних гнилей в умовах *ex situ*.

#### Annotation

The results of sugar beet genetic transformation using pollen tube system (PTS) and Ti-plasmid vector of *Agrobacterium tumefaciens*, bearing *rs* gene of radish defensin, are presented. By PCR analysis, genetically modified sugar beet plants have been selected, and their resistance to root and clamp rots on artificial infected background under *ex situ* conditions has been shown.

УДК 633.63:631.52

## ПРИСКОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

В.І. Редько, М.В. Роїк, Н.С. Бех,  
Т.М. Недяк, Н.П. Слуцька

### ОГЛЯДОВА СТАТТЯ

У статті висвітлені можливі шляхи прискорення селекційного процесу цукрових буряків за допомогою біотехнологічних методів. Показано перспективу застосування методів клонального мікророзмноження, культивування ізолюваних зародків, незапліднених насінневих зачатків, експериментальної поліплоїдії *in vitro*, соматичної мінливості, селективних середовищ, подвійних культур. Буряківництво – пріоритетна галузь сільськогосподарського виробництва в Україні. Селекціонерами постійно ведеться робота з отримання нових сортів і гібридів. Процес створення вихідного матеріалу та отримання гібриду, який відповідав би сучасним вимогам за врожайністю і цукристістю, стійкістю до біотичних і абіотичних стресових факторів, технологічними якостями, триває 10-12 років.

Прискорити селекційний процес можна завдяки оптимізації класичних методів та розробці нових. Вважається, що наука рухається поштовхами залежно від успіхів, які робить методика. З кожним кроком методики вперед ми піднімаємось на сходинку в пізнанні властивостей живого організму, наданні йому нових якостей.

Такими сучасними методами є методи біотехнології, які дозволяють швидко розмножити і довго зберігати у чистоті цінні селекційні матеріали та створювати нові форми, вести добір цінних генотипів в умовах культури *in vitro*. Пріоритет в дослідженнях з біотехнології цукрових буряків належить науковцям Інституту цукрових буряків, які ще в 1976 р. розпочали роботу з культурами ізолюваних клітин і тканин.

Розробка прийомів вегетативного розмноження *in vitro* дає змогу розв'язати проблему швидкого розмноження та довготривалого збереження елітних рослин для використання їх у рекурентній селекції, яка спрямована на підвищення концентрації бажаних генів, що контролюють ознаки врожайності, високої технологічної якості і стійкості до стресових факторів. Цей метод дозволяє зберегти чистоту генотипів, що є досить складним завданням для такої перехреснозапильної культури, як цукрові буряки.

Клональне мікророзмноження має певні переваги порівняно з традиційними методами вегетативного розмноження:

- коефіцієнт розмноження значно вищий. З однієї, введеної в стерильну культуру бруньки, можна отримати за рік від 5000 до 10000 рослин-регенерантів;
- ріст рослин можна підтримувати протягом багатьох років, зберігаючи генетичну чистоту;

Метод розмноження швидко економічний. Тисячі рослин ростуть на великій лабораторній площі.

- одночасно з розмноженням відбувається оздоровлення матеріалу від патогенних мікроорганізмів [7, 11].

Однією з важливих проблем сучасності є збереження генетичного різноманіття культурних і диких форм рослин, в тому числі і цукрових буряків. Традиційно цього досягають створенням банку насіння, яке відтворюють періодично пересіваючи його.

На даному етапі розвитку біології все частіше з метою збереження генетичного фонду використовують метод криозбереження та інші біотехнологічні методи [4, 19, 22].

Збереження рослинного матеріалу при криоконсервації відбувається при повному припиненні росту. При цьому вихід регенованих рослин не дуже високий.

Для збереження рослинного матеріалу цукрових буряків була розроблена система уповільнення їх росту (ростучі колекції) зниженою температурою та зміною складу живильного середовища [14].

Вона задовільняє такі вимоги:

- генетична стабільність;
- можливість регенерації будь-якого генотипу, який зберігатиметься у культурі *in vitro*;
- мінімалізація затрат на догляд за рослинами за рахунок збільшення строку культивування без пересадок;
- зменшення витрат на створення відповідних умов для підтримання життєздатності культури;
- оптимальні умови культивування в разі необхідності швидкого нарощування депонованого матеріалу, які забезпечать високий коефіцієнт розмноження;
- стерильність рослинного матеріалу;
- можливість транспортування в разі необхідності на далекі відстані.

Метод клонального мікророзмноження і збереження в культурі *in vitro* може найти своє місце на всіх етапах селекційного процесу.

Культура зародків, ізольованих на ранніх стадіях ембріогенезу, є ефективною для отримання рослин із маложиттєздатних зародків.

Як показали цитоембріологічні дослідження, стадії «початкового і середнього серця» є критичними в циклі ембріонального розвитку рослин, бо на цих стадіях спостерігається відмирання зародків, викликане генетичними і фізіолого-біохімічними причинами.

Але ще деякий час вони зберігають свою життєздатність. Ізолювання зародків від материнського організму і експлантація їх на штучне живильне середовище – єдиний спосіб регенерувати з них рослини.

Були розроблені температурний і світловий режими та створене живильне середовище для регенерації рослин цукрових буряків із зародків на стадіях «серця» і «торпеди» [1, 6].

В селекції цукрових буряків актуальним завданням є отримання і розмноження інбредних ліній з високою комбінаційною здатністю у зв'язку із селекцією на їх основі гетерозисних міжлінійних гібридів. Труднощі у створенні гомозиготних ліній шляхом примусового самозапилення обумовлені наявністю генів, детермінуючих систему самонесумісності у рослин.

В селекційних практиках для отримання гомозиготних ліній все частіше використовують гаплоїдію. Вперше явище гаплоїдії у цукрових буряків було відкрито Леваном у 1945 році. Гаплоїди одержували використовуючи природу поліембріонію, схрещування культурних видів з дикими, запилення приймочок маточок опроміненим  $\gamma$ -променями пилком. Проте, вихід гаплоїдів був незначним і варіював від 0 до 0,3%.

Підвищенню ефективності роботи по гаплоїдії сприяли методи біотехнології. Вони мають ряд переваг перед інцухтом:

- зменшення в 2-3 рази строків створення константних чистих ліній завдяки виключенню довготривалих повторних циклів самозапилення;
- можливість уникнути негативного ефекту інцухт-депресії;
- залучення в селекційний процес збагаченого гібридного матеріалу, який розширює генетичну основу створюваних гетерозисних гібридів;
- використання клонального мікророзмноження дозволяє швидко розмножити гаплоїди та отримати з них гомозиготні лінії поліплоїдизацією у культурі *in vitro*.

Крім отримання гомозиготних ліній використання гаплоїдів дозволяє вивчити характер прояву дії гену, що визначає селективну ознаку (рецесивну, домінуючу, адитивну).

Гаплоїдні рослини у цукрових буряків частіше отримують у культурі незапліднених насінневих зачатків. У інших видів використовують також пиляки та ізольовані мікроспори.

Розроблена методика культури *in vitro* ізольованих незапліднених насінневих зачатків дала змогу отримувати вихід гаплоїдів від 0,8 до 16,7%. Встановлено, що основними факторами, які впливають на ефективність методу, є умови культивування, генотип і фізіологічний стан рослини-донора [8, 20].

Збільшення кількості гаплоїдів спостерігається при вилученні незапліднених насінневих зачатків з розкритих квіток, а також при запиленні опроміненим пилком столових буряків  $\gamma$ -променями. Введення в генотип рослини-донора насінневих зачатків маркерних генів дає змогу візуально виділяти гаплоїди [17].

Щоб одержати фертильні гомозиготні лінії гаплоїди переводили на дигаплоїдний рівень в умовах *in vitro* на живильних середовищах з колхіцином. Вживання бруньок після обробки колхіцином в середньому складало 87,8%, а вихід дигаплоїдів – 62% [8, 20].

Для сучасної гібридної селекції цукрових буряків важливим є створення тетраплоїдних запилювачів. Існує кілька методів індукції тетраплоїдів, які в основному відрізняються способом введення в рослину поліплоїдизуючого фактору, яким є колхіцин, його концентрацією, часом дії, а також фазою розвитку рослини в момент його дії. Їх ефективність визначається виходом тетраплоїдних рослин.

Традиційні методи полягають в обробці насіння або багаторазовому на капиванні на точки росту бруньок розчинів колхіцину в концентрації 0,02-1,0% [23, 19]. Процес створення стабільних тетраплоїдів триває 6-8 років.

Тому була розроблена методика отримання тетраплоїдів в культурі *in vitro*. Оцінка плоїдності після колхіцинування в другому пасажі на стандартному живильному середовищі  $S_{200}$  показала, що кількість бруньок, меристемні клітини яких мали змінене число хромосом, становила 42-59%, а вихід стабільних тетраплоїдів – 8-26% залежно від генотипу [18, 15].

Цей метод дозволяє:

- підвищити вихід тетраплоїдів порівняно з традиційним;
- робить операції з колхцином більш безпечними;
- є економічно вигідним;
- шляхом клонування *in vitro* можна швидко розмножити тетраплоїди і отримати укорінені рослини.

При розробленні підходів до проведення селекції в умовах *in vitro* було встановлено, що культивовані *in vitro* рослини проявляють подібний до донорських характер онтогенезу і що між утилітарними ознаками рослин і ознаками їх вегетативних аналогів у культурі *in vitro* існують кореляції [2, 8].

Стійкість рослин до біотичних і абіотичних стресових факторів – генетично зумовлена потенційна ознака, яка проявляється лише в умовах стресу. Тому наявність надійних методів створення і діагностики вихідних матеріалів забезпечує успіх селекції стійких до негативних факторів сортів та гібридів.

З використанням селективних середовищ, які імітують у культурі *in vitro* стресові умови, були отримані форми, стійкі до засолення субстрату та дефіциту вологи в ньому [13, 3]. Вивчався вплив солей важких металів на ріст рослин у культурі *in vitro* [9]. Розроблена методика оцінки селекційних матеріалів на стійкість до гнилей коренеплодів на середовищах з екстрактом і культуральною рідиною грибів роду *Fusarium* та в подвійній культурі калюсу і патогенного гриба [12, 16, 20].

Рослинна клітина, переведена в умови культивування *in vitro*, залишається тотипотентною і зберігає основну генетичну інформацію про цілий організм, яку може реалізувати при створенні відповідних умов. Проте фізичні та хімічні фактори культивування, що мають мутагенну дію, а також генетична гетерогенність соматичних клітин експланта створюють передумови для отримання генетично змінених рослин. Таку мінливість називають соматоклональною. Їх використання дає можливість розширити генетичну різноманітність цукрових буряків.

У регенованих із калюсної культури соматоклонів спостерігали відмінності як у порівнянні з вихідною формою, так і між ними. В культурі *in vitro* вони відрізнялись за кольором і формою листків і черешків, їх кількістю, здатністю до коренеутворення і калюсогенезу за електрофоретичними спектрами пероксидази та співвідношенням хлорофілу а і b. У польових умовах - за габітусом, строками дозрівання. Крім того, серед рослин другого року життя були виявлені форми з чоловічою стерильністю [10, 21, 22].

Таким чином, в Інституті цукрових буряків УААН при розробці біотехнологічних методів одержано ряд вагомих результатів, які сприятимуть підвищенню інтенсивності і результативності селекційного процесу, розширенню і покращанню генетичного потенціалу вітчизняного генофонду вихідних матеріалів цукрових буряків.

#### Список літератури

1. Белоус В.Е., Ильенко И.И., Редько В.И., Осавлюк С.Н. Влияние условий культивирования на развитие изолированных зародышей сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. – М.: Госагропромиздат. – 1989. – С. 32 – 41.
2. Зубенко В.Ф., Ильенко И.И., Редько В.В., Редько В.И. Селекция форм

- сахарной свеклы с повышенной продуктивностью в условиях культуры in vitro // Доклады ВАСХНИЛ. – 1987. - № 11. – С. 13-15.
3. Зубенко В.Ф., Ильенко И.И., Редько В.И., Редько В.В. Отбор устойчивых к хлоридному засолению форм сахарной свеклы в условиях культуры тканей // Доклады ВАСХНИЛ. – 1987. - №5. – С. 18 – 20.
4. Ильенко И.И. Микрклональное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре in vitro // Физиол. и биохим. культ.раст. – 1983. – 15, №4. – С. 351 – 355.
5. Попов А.С. Кривоконсервация клеток растений // Методы культивирования клеток. – Л.: Наука. – 1988. – С. 70 – 77.
6. Редько В.І., Білоус В.О., Ковальчук Н.С. Перспективи використання культури недозрілих зародків in vitro в селекції цукрових буряків // Труды Міжн. конф. «Селекція і вирощування польових культур». – Кам'янець-Подільський. – 1992. – С. 72.
7. Редько В.И., Ильенко И.И., Недяк Т.Н. Вегетативное размножение сахарной свеклы в культуре in vitro // Труды Междунар. науч.-произ. конф. «Пути интенсификации свеклосахарного производства в республике Беларусь». – Минск: Юнипак. – 2002. – С. 161 – 163.
8. Редько В.И., Ильенко И.И., Редько В.В., Самойлова Т.М. Культура меристем in vitro и селекция сахарной свеклы // Труды V съезда ВОГиС. – Москва. – 1987. – Т. IV, ч. 4. – С. 161.
9. Редько В.І., Недяк Т.М., Драгунова О.К. Вплив солей кадмію на рослини цукрових буряків у культурі in vitro // Зб. наук. пр. ІЦБ УААН. – К.: 2005. – С. 425 – 429.
10. Редько В.І., Недяк Т.М., Драгунова О.К., Дубін О.В. // Калусогенез і соматоклональна мінливість у цукрових буряків // Зб. наук. пр. ІЦБ. – 2000. – Вип. 2, Кн. 1. – С. 138 – 143.
11. Редько В.І., Недяк Т.М., Дубін О.В., Ніколаєнко А.П. Розмноження та збереження селекційних матеріалів цукрових буряків у культурі in vitro // Збірник наукових праць ІЦБ. – 2000. – Вип. 2., Кн. 1. – С. 123 – 130.
12. Редько В.І., Нурмухаммедов А.К., Недяк Т.М. Подвійна культура калусу буряків і грибів роду *Fusarium* // Захист рослин. – 2000. - №7. – С. 20 – 21.
13. Редько В.И., Редько В.В., Сахро Л.А. Реакция меристем сахарной свеклы на солевой стресс в условиях in vitro // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. – М.: Госагропромиздат. – 1989. – С. 27 – 32.
14. Редько В.І., Роїк М.В., Недяк Т.М., Бех Н.С., Слуцька Н.П. // Повільноростучі in vitro колекції цукрових і кормових буряків як метод збереження їх генетичного різноманіття // Зб. наук. пр. ІЦБ. – 2008. – Вип. 10. – С. 231 – 234.
15. Роїк М.В., Бех Н.С., Редько В.І. Створення тетраплоїдів цукрових буряків у культурі in vitro // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2006. – С. 503 – 506.
16. Роїк М.В., Нурмухаммедов А.К., Редько В.І., Недяк Т.М. Нова методика оцінки стійкості цукрових буряків проти збудників гнилей // Вісник аграрної науки. – 2004. - №5. – С. 24 – 26.
17. Рябовол Л.О. Розробка способів одержання гаплоїдів і дигаплоїдів цукрового буряка, як вихідного матеріалу для селекційного процесу: Автореф. дис. канд. с.-г. наук: 05.05.69 / ІЦБ УААН – К.: 1994. – 20 с.
18. Спосіб отримання тетраплоїдів цукрових буряків у культурі in vitro / Пат. №45656А Україна, МПК7А01Н4/00/. М.В. Роїк, В.І. Редько, Ю.В. Кірса-

нова, Т.М. Недяк, А.П. Николаенко; Інститут цукрових буряків УААН. – Зареєстровано 25.05.01; Опубл. 15.04.02, бюл. «Промислова власність», №4.

19. Engelmann F. In vitro conservation research activities at the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 1997. – 3, №1. – P. 46 – 52.

20. Park C.H., Kim D.W. Colchicine-induced variation in *Kochia Scouleriana* Schrad // 15-th Int. Bot. Congr., Yokogama, Fng. 28 – Sept. 3, 1993 – P. 529

21. Redko V., Dragunova O.K. Obtaining haploid and dihaploid lines of sugar beet under in vitro conditions // Abstr. II Intern. Symp. on Plant Biotechnology. – Kyiv. – 1988. – P. 33.

22. Redko V., Dragunova O.K., Neduk T.M., Dubin A.V. Somaclonal variants of sugar beet // Abstr. II Intern. Symp. on Plant Biotechnology. – Kyiv. – 1998. – P. 106.

23. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // Plant Breeding Rev. – 1989. – 7. – P. 159 – 182.

24. Vassilevska-Ivanova Lidansly T., Cekova Z. Colchicine treatment on cultivated Sunflower *Helianthus annuus* L. Methods and influences // Докл. Българ. АН. – 1996 – 49, №5. – С. 105 – 108.

#### **Анотация**

В статье представлены возможности ускорения селекционного процесса сахарной свеклы с помощью биотехнологических методов. Показана перспектива применения методов клонального микроразмножения, культивирования изолированных зародышей, неоплодотворенных семязпочек, экспериментальной полиплоидии *in vitro*, соматической изменчивости, селективных сред и двойной культуры.

#### **Annotation**

The article deals with possibilities of accelerating the breeding process of sugar beet with the help of biotechnological methods. Prospects of using methods of clonal micropropagation, culturing isolated embryos, unfertilized ovules, experimental polyploidy *in vitro*, somaclonal variability, selective media and double cultures were shown.