

УДК 633.63:631.527.5

## МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Е.Н.Васильченко, Т.П.Жужжалова,  
О.А.Подвигина, О.А.Землянухина, Д.Н.Федорин

В статье рассмотрены основные лимитирующие факторы культивирования *in vitro* незрелых зародышей от межвидовой гибридизации *B. vulgaris* L. x *B. corolliflora* Z. Выявлено, что полученные межвидовые гибридные растения различаются по количеству хромосом. Гибриды, наследующие фенотип *B. vulgaris* L. и диплоидное число хромосом, несут лишь отдельные элементы генома дикого вида, что выражается присутствием видоспецифичных сателлитных участков ДНК и повышением в 2-3 раза активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы по сравнению с родительскими формами. Гибридные растения, сохраняющие коническую форму корнеплода, высокую разделяемость (98 %) и ЦМС, могут быть использованы как исходный материал в селекционной работе

**Введение.** Все виды дикой свеклы обладают рядом ценных признаков и скрещивание их с культурной свеклой может представлять большую практическую ценность. Так у диких форм свеклы отмечены холодо- и зимостойкость, засухоустойчивость, односемянность, устойчивость к болезням и вредителям (в частности к нематоду), склонность к агамоспермии.

Однако лишь ограниченное число межвидовых скрещиваний может привести к получению полноценных гибридных растений. Дикие сородичи сахарной свеклы, представленные видами из секций *Patellaris* и *Corolliflorae*, как правило, от скрещиваний с *Beta vulgaris* дают нежизнеспособные или стерильные в силу отсутствия гомологии между хромосомными наборами гибриды (Jasem, 1976). Невозможность осуществления таких скрещиваний очень часто связана с приостановкой развития гибридного зародыша, что в свою очередь, может быть обусловлено либо его ранней гибелью, либо дегенерацией эндосперма (Прилюк, 1984; Дунаева, 2000; Savitsky, 1981; Nalin, 1999). В настоящее время современная техника культуры зародышей и тканей делает реальным более интенсивное вовлечение диких сородичей в работу по переносу желаемых генов от диких форм в культурные сорта сахарной свеклы.

Поэтому для эффективного получения определенной генетической комбинации желаемых признаков в процессе межвидовой гибридизации мы использовали метод эмбриокультуры, позволяющий в условиях *in vitro* выращивать регенеранты из зиготических зародышей на разных стадиях развития.

**Материалы и методы.** Материалом для гибридизации служили сахарная свекла с ЦМС рамонской селекции и дикий вид *Beta corolliflora*. Для получения межвидовых гибридов проводили принудительное опыление пыльцой дикого вида.

Для культивирования эксплантов применялась питательная среда Гамборга (Gamborg, Eveiling, 1958) с добавлением 6-бензил-аминопурина, кинетина, гиббериллина, НУК, ИМК, ИУК в различных концентрациях и соотношениях,

сахарозы 20-50 г/л, pH раствора 5,8-6,0. Введение в культуру *in vitro* незрелых зародышей межвидовых гибридов осуществляли на 3, 5, 8 и 12 дней. Культивирование эксплантов проводили в условиях света и темноты при температуре 23-26°C.

Активность ферментов пероксидазы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы определяли в гомогенатах тканей растений по методике А.А. Землянухина, Л.А. Землянухина (1996). Расчет относительной общей активности проводили путем отнесения изменения оптической плотности на единицу оптической плотности (мин) в мл ферментативного препарата без учета оптической плотности к оптической плотности (мин) в мл ферментативного препарата с учетом оптической плотности. Коэффициент относительной активности (ФЕ/мл) рассчитывали по формуле:  $FE/ml = \frac{OD_{\text{субстрат}}}{OD_{\text{фермент}}}$ .

Детекцию интрогрессии чужеродного генетического материала в генотип сахарной свеклы проводили методом ПЦР-амплификации с использованием видоспецифических праймеров (Gendullis F., Desel C., Galasso, Schidt, Zuber)

Плоидность растений определяли путем проточной цитометрии (ПЦ) на приборе Partec, а также приготовлением временных цитологических препаратов по методике Ярмолюк (1966). Просмотр материала проводили на микроскопе Jenoval.

**Результаты исследований.** Введение в культуру *in vitro* незрелых зародышей межвидовых гибридов на разных стадиях развития (3 -12 дней после опыления) показало их различную отзывчивость на стрессовые условия. Недифференцированные гибридные зародыши (5 дневные) прорастали на питательной среде с частотой 0,9-7,3 %, но проростки на ранних стадиях развития погибали. С увеличением возраста зародышей их жизнеспособность увеличивалась до 25,0 %. При этом также отмечалась ранняя гибель проростков и образование неморфогенных структур - разрастание стебля, гипокотилея, витрификация семядольных листочков, точек роста и др. В результате этого выживаемость проростков снижалась до 12,5 %.

Экспериментальные данные, полученные нами в ходе исследований подтвердили тот факт, что незрелым зародышам в возрасте 3 дней для дальнейшего развития требовалось наличие большого содержания сахарозы и гормонов в питательной среде. Количество нормально развитых проростков при этом не превышало 5%. С увеличением возраста зародышей их потребность в гормонах несколько снижалась, а количество нормально развитых проростков увеличивалось до 12 %. Однако следует отметить, что независимо от возраста зародышей, частота образования проростков увеличивалась при наличии в питательной среде большого количества сахарозы (табл. 1).

Культивирование 8-дневных зародышей приводило к формированию 10,0-25,0 % растений на среде с 20 г/л сахарозы, а содержание 40 г/л углеводов стимулировало регенерацию 17,8-48,6 % введенных эксплантов.

В ходе исследований было выявлено, что незрелые зародыши сахарной свеклы в условиях культуры тканей развивались как на свету, так и в темноте. В темновых условиях культивирования происходило формирование большего количества недифференцированных структур - каллусы, разросшиеся и витрифицированные ткани листьев и гипокотилей. Это увеличивало общее количество полученных проростков с 4,0 до 48,6 %, но одновременно снижало и образование нормально развитых регенерантов с 18,9 до 2,7 %. Культивирование эксплантов на световом режиме снижало формирование недифференцированных структур и положительно влияло на развитие неспособных проростков, количество которых увеличивалось с возрастом зародышей до 2,5-9,0 %.

Таблица 1 – Влияние состава среды и возраста зародышей на их жизнеспособность в условиях *in vitro*

№	Гормон. Состав среды, мг/л	Сахар, г/л	Получено проростков					
			3 дня		5 дней		8 дней	
			всего, %	норм. развиты, %	всего, %	норм. развиты, %	всего, %	норм. развиты, %
1	0	20	3,1	1,5	17,1	14,3	10,0	10,0
2	0	40	4,0	2,0	2,5	0	17,8	17,8
3	Гк, Кн, БАП-0,2	20	0	0	1,0	0	33,3	25,0
4	Гк, Кн, БАП-0,2	40	7,5	5,0	4,0	0	31,1	33,3
5	Гк, Кн, БАП-0,1	20	1,7	1,7	12,0	12,0	24,4	24,4
6	Гк, Кн, БАП-0,1	40	1,7	1,7	12,0	12,0	48,6	48,6
7	Гк, Кн-0,1 НУК-0,05	20	3,1	1,5	13,3	6,7	26,7	23,3
8	Гк, Кн-0,1 НУК-0,05	40	8,9	4,5	10,0	10,0	30,0	30,0

НСР<sub>0,05</sub>

0,31    0,31    1,19    1,18    1,66    1,68

Культивирование проростков от межвидовых скрещиваний выявило наличие морфологических признаков диких видов свеклы. На начальных этапах своего развития у части регенерантов обнаружилась яркая антоциновая окраска гипокотилия и черешков листьев, которая сохранялась на всех этапах микроразмножения.

Более четко морфологические признаки проявились при выращивании микроклонов в условиях закрытого грунта. Наблюдения позволили установить целый ряд различий у полученного потомства. Так, растения 1 года жизни, имеющие диплоидный набор хромосом ( $2n=18$ ), обладали признаками, характерными для материнской формы (культурной свеклы), а именно: зеленой окраской гипокотилия, слабофрированной формой листовой пластинки, конической формой корнеплода (рис. 1).

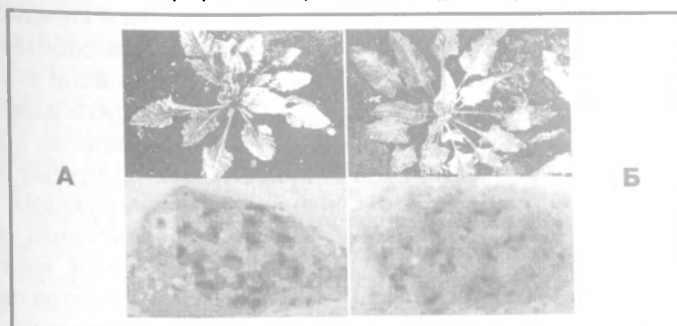


Рисунок 1 – Внешний вид гибридных растений и количество хромосом в фазе розетки листьев

Примечание. а) диплоидная форма; б) триплоидная форма.

...имеющих триплоидный набор хромосом ( $2n=27$ ), при проведении проточной цитометрии выявлены классы клеток, занимающие промежуточное положение между материнской и отцовскими формами.

По морфологии они характеризовались наличием признаков дикого вида свеклы: розовой окраской hypocotyle и черешков длинночерешковыми, цельнокрайними, остроконечными листьями яйцевидной и стреловидной формы и темно-зеленой окраски, а также выемчатым основанием листьев и стержневым разветвленным корнем.

Для диплоидных растений II года жизни были характерны: прямостоячая розетка листьев, многостебельные цветоносные побеги, высокая разветвленность – 98 %, цитоплазматическая мужская стерильность. Цветки имели желтые стерильные пыльники. При самоопылении данные формы завязывали семена, что свидетельствует о склонности к апомиктическому способу размножения (рис.2).



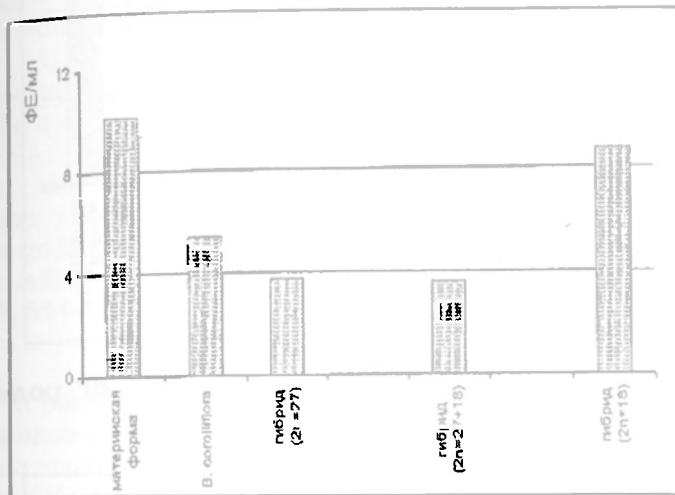
**Рисунок 2 — Растения сахарной свеклы, полученные в результате межвидовой гибридизации**

**Примечание:** а - диплоидная форма; б - триплоидная форма

27-хромосомные растения II года жизни обладали раскидистой розеткой, характерной для дикой свеклы, одностебельным цветоносным побегом, на котором часто формировались партикулы, цитоплазматической мужской стерильностью, характерной для сахарной свеклы, с пыльниками темного цвета и отсутствием завязывания семян при самоопылении.

По литературным данным известно, что отдаленная и межвидовая гибридизация являются мощным стрессовым фактором, способным вызывать структурные изменения гибридируемого генома в процессе его стабилизации (Трубачева, Салина, Нумерова, 2003). В результате возможна частичная репрессия генов, ответственных за биосинтез белков, которая вызывает существенные изменения в метаболизме. Поэтому ключевые ферменты основного и вторичного обмена, регулирующих скорость адаптивных реакций у растений являются более доступными метками для выявления встраивания чужеродных генов при межвидовой гибридизации (Тютюрев, 2002). Одним из самых ранних ответов на встраивание чужеродных генов является накопление пероксида водорода и других активных форм кислорода, при этом происходит активация генов пероксидазной активности, выражающаяся в изменении фермента и количестве его изоформ в ту или иную сторону.

В результате проведенных исследований выявлено, что диплоидные и триплоидные растения, полученные от скрещивания *B. vulgaris* L. x *B. corolliflora* Z., различались и по общей активности фермента пероксидазы. Так, у диплоидных растений она оказалась ниже, чем у материнской формы на 1 ФЕ/мл и составила 9 ФЕ/мл; в то же время пероксидазная активность на 4 ФЕ/мл оказалась выше, чем у отцовского компонента – дикой свеклы (рис.3).



**Рисунок 3 — Активность пероксидазы у родительских форм и межвидовых гибридов**

Триплоидные растения характеризовались пониженной активностью данного фермента по сравнению с культурной свеклой в 3 раза (3,8 – 3,9 ФЕ/мл); и в 1,5 раза в сравнении с дикими видом *B. corolliflora*.

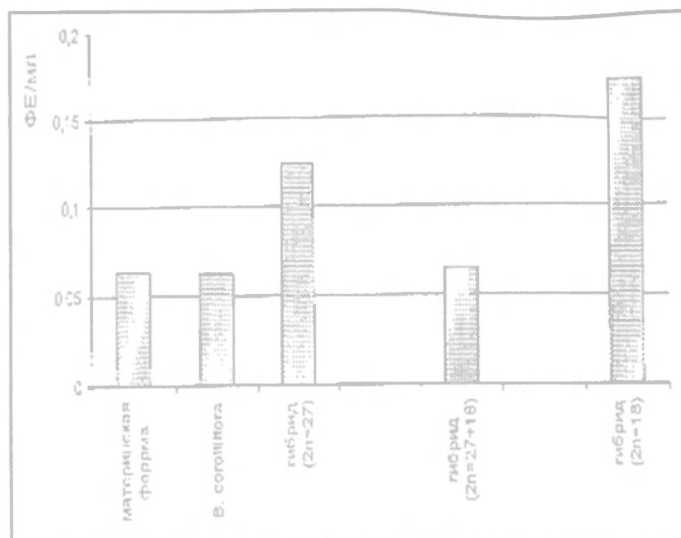
Изучение общей активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы выявило значительное ее повышение по сравнению с родительскими формами, которая у 27-хромосомных растений была выше в 2 раза (0,12 ФЕ/мл), а у 18-хромосомных растений в 3,5 раза (0,18 ФЕ/мл) (рис. 4).

Изменения ферментативной активности вызвано, по-видимому, стрессовым состоянием метаболизма гибридных растений при интрогрессии генома дикой свеклы в геном сахарной.

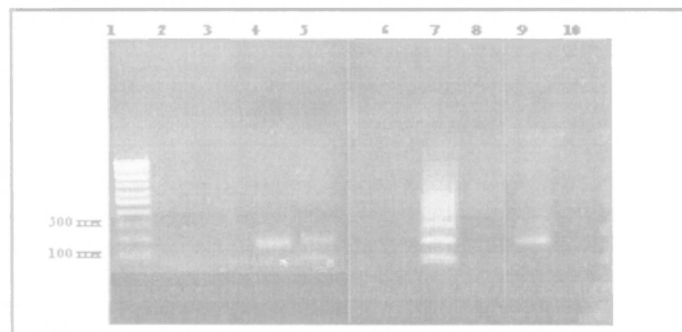
В результате проведенного молекулярного анализа методом ПЦР у диплоидных растений, полученных от скрещивания *B. vulgaris* x *B. corolliflora*, были выявлены сателитные участки ДНК (161 п.н.), видоспецифичные для *B. corolliflora* (рис.5).

Выявленный продукт полимеразной цепной реакции (161 п.н.) является результатом специфического связывания праймера с матрицей, что подтверждает наличие у диплоидов сателитной последовательности Hae III, являющейся видоспецифическим признаком дикого вида *B. corolliflora*. Это возможно происходит в результате отдаленности скрещиваемых геномов, когда гибридизируются лишь те участки ДНК, которые имеют генетическое родство (Wet, Newell, Brink, 1984).

Полученные данные позволили предположить, что 18 хромосомные растения, несущие фенотип культурной свеклы и имеющие отдельные элементы генома дикого вида, являются гибридными.



**Рисунок 4 — Общая активность глюкозо-6-Ф-ДГ родительских форм и гибридных растений.**



**Рисунок 5 — ПЦР-продукты родительских форм и межвидовых гибридов**

**Примечание.** 1 – маркер молекулярной массы (1 Кв + 100 вр DNA ladder); 2, 6 – материнская форма; 3, 8 – растения (2n=27); 4, 9 – растения-миксоплоиды (2n=27,18); 5 – растения (2n=18); 7 – *V. Corolliflora*; 10 – отрицательный контроль.

В результате проведенных экспериментов выделен и отобран гибридный материал (2n=18) с морфологическими и функциональными изменениями генома, который можно использовать в качестве исходных форм в процессе селекционной работы.

#### Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1975. – 120 с.
2. Дунаева С.Е. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и позднеспелых сортов ячменя. 2. Морфологическая дифференциация зародышей как показатель компетентности их клеток к регенерации растений / С.Е. Дунаева, М.В. Лу-

кьянова, О.Н. Ковалева, О.Г. Козырева // Физиология растений. – 2000. – т.47, №1. – С. 58-64.

3. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. – Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та. - 1996.- С.97-98.

4. Прилюк Л.В. Получение гибридов тетраплоидной пшеницы однозерняной и рожью / Л.В. Прилюк // Генетика. – 1984. – т.20. – С.1344-1347.

5. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений. – С.-Петербург. – 2002. – 74 с.

6. Savitsky H.I. Production of homozygous nematode resistance plant lines in diploid *Beta vulgaris* – procumbens hybrids / H.I. Savitsky // Genetics. – 1981. v. 97. – P.94.

7. Wet I.M.I. de, Newell C.A., Brink D.E. Counterfeit hybridization and specification // Biop. Science. – 1984. – V.34, № 5. – P. 111.

8. Jassem B. Embryology and genetics of apomixis in the section Corollinae of the genus *Beta* / B. Jassem // Acta. Biol. Cracovensia. Ser. Botanica. - 1976. - V.19. - P. 151-172.

#### Анотація

В статті розглянуті основні лімітуючі фактори культивування *in vitro* незрілих зародків від міжвидової гібридизації *B. vulgaris* x *B. corolliflora* Z. Визначено, що отримані міжвидові гібридні рослини розрізняються за кількістю хромосом. Гібриди, які наслідують фенотип *B. vulgaris* x *B.* і диплоїдне число хромосом, несуть лише окремі елементи генома дикого виду, що визначається присутністю видоспецифічних сателітних ділянок ДНК і підвищенням в 2-3 рази активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази у порівнянні з батьківськими формами гібридні рослини, які зберігають конічну форму коренеплоду, високу роздільноkwітковість (98 %) і ЦЧС, можуть бути використані як вихідний матеріал в селекційній роботі

#### Annotation

In the paper, main limiting factors for *in vitro* culturing of immature embryos obtained by interspecific hybridization of *B. vulgaris* x *B. corolliflora* are considered. It has been revealed that the obtained interspecific hybrid plants differ in number of chromosomes. Hybrids inheriting phenotype of *B. vulgaris* and diploid number of chromosomes have only separate elements of wild type genome that is expressed by presence of DNA species-specific satellite sites and by 2-3-fold increase of glucose-6-phosphatedehydrogenase activity compared to parent forms. Hybrid plants that keep conical form of beets, high monogermity level (98 %) and CMS can be used as starting material in breeding work.