УДК 633.63: 631.531.12

СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ МАТЕРІАЛІВ

В.В. Литвинюк, Й.М. Федорощак,
Н.В. Гарматюк, Н.М. Хіміч, Н.П. Гончарук

У статті висвітлені питання зі створення трансгенних матеріалів фосфінотрицин – толерантних цукрових буряків. Дана характеристика вихідним матеріалам – донорам Bar – резистентності та матеріалам, яким була передана дана ознака, показано успадкування гена толерантності. Оцінено створені трансгенні гібриди в основному сортовипробуванні за їх продуктивністю

Вступ. Використовуючи лише традиційні методи селекції та насінництва цукрових буряків, неможливо швидко і ефективно створити нові гібриди, що задовольняють сьогодення.

На відміну від традиційних методів сучасні досягнення молекулярної біології мають значно більші потенціальні можливості для докорінного удосконалення більшості сільськогосподарських культур подоланням ряду існуючих бар'єрів для класичних методів селекції [1]. Розвиток цукрових буряків із застосуванням даних заходів дещо уповільнений порівняно з іншими видами. Як вказують F.A.Krens et al. [2], K.D'Halluln et al. [3], вони відносяться до непокірних з точки зору молекулярних маніпуляцій і введення трансгенних властивостей обмежується як успіхом методики трансформування, так і рядом інших факторів. S.Kaffka and P.G.Lemaux [4] встановили, що лише кілька генотипів цукрових буряків, які відзначаються досить поганими агрономічними властивостями, можуть бути використані для одержання успішних результатів при трансформації.

Одним із напрямів успішно проведеної генетичної модифікації цукрових буряків є резистентність до гербіцидів, тобто штучне введення у геном відповідної конструкції, що обумовлює їх стійкість до гербіциду суцільної дії Баста (діюча речовина глюфосинат амонію – синтетичний аналог фосфінотрицину). Бур'яни є однією із основних проблем на посівах, і на даний час не існує ефективних для контролю за їх кількістю препаратів, які б не мали негативний вплив на рослини культури, тому на практиці використовують їх суміші. Значно ефективнішим на посівах культури є використання гербіцидів суцільної дії [5]. Створення матеріалів цукрових буряків, стійких до дії гербіцидів суцільної дії, є актуальним.

Матеріали та методика. Вихідним матеріалом для створення генетично модифікованих матеріалів, стійких до гербіциду суцільної дії Баста, слугували донори з Bar- резистентністю та диплоїдні запилювачі, лінії О типу та їх ЧС аналоги ялтушківської селекції. Гібридизація проводилася за програмою беккросів. Для прискореного розмноження селекційних матеріалів використовували селекційно-тепличний комплекс станції. Схрещування, розмноження, сортовипробування проводилося за загальноприйнятими методиками [6, 7]. Для оцінки закріплення гену bar у рослинах по фенотипових ознаках у фазі розвитку рослин двох справжніх листків посіви обробляли гербіцидом Баста у нормі 3 л/га.

Результати досліджень. Дослідження з передачі гена стійкості bar транс-

генних форм розпочалися на станції з 1998 року. Донори, що були одержані з Інституту цукрових буряків, розміщувалися у селекційному розсаднику та селекційно – тепличному комплексі.

У селекційному розсаднику розмножувалося 15 номерів – донорів, які обробляли гербіцидом Баста з розрахунку 3 л/га 20 % концентрації емульсії. Підрахунок загиблих рослин проводили через 20 днів після обприскування (табл.1).

Донори, що були отримані станцією, мали 64,9–97,7 відсотків стійкості до дії гербіциду Баста. Це обумовлено гетерозиготністю матеріалів за трансформованою ознакою і розщепленням при відтворенні матеріалів. Тому дані матеріали потребували також доопрацювання з метою підвищення їх стійкості.

Одночасно із роботами в польових умовах у селекційно – тепличному комплексі здійснювали прискорене відтворення трансгенних матеріалів, проведення насичуючих схрещувань із матеріалами ялтушківського походження. Насіння з рослин, що вирощувалися в ринках, було оцінено за якістю пилку, і фертильні матеріали (24 номери) були висіяні у ґрунтові бокси, а напівстерильні (13 номерів) схрещували з матеріалами ялтушківської селекції. Після браковки матеріалів за масою коренеплодів у теплиці для подальшої роботи було зібрано 1427 шт. штеклінгів, які були висаджені на просторово ізольованій насінницькій клумбі.

Таблиця 1 — Оцінка донорів гена bar до дії гербіциду Баста

№ зп	Амбарний номер	Рядків на ділянці, шт.	Кількість рослин				
			до обробки, шт.	загинуло		толерантних	
				шт.	%	шт.	%
1	4729	2	243	46	18,9	197	81,1
2	4735	1	93	5	5,4	88	94,6
3	4736	1	219	5	2,3	214	97,7
4	4731	1	257	54	21,0	203	79,0
5	4732	1	23	3	13,0	20	87,0
6	4733	2	296	61	20,6	235	79,4
7	4734	1	211	47	22,3	164	77,7
8	4737	1	126	12	9,5	114	90,5
9	4738	1	157	23	14,6	134	85,4
10	4739	2	260	63	24,2	197	75,8
11	4740	2	419	127	30,3	292	69,7
12	4741	2	144	9	6,3	135	93,7
13	4742	2	117	10	8,5	107	91,5
14	4743	2	290	50	17,2	240	82,8
15	4744	2	453	159	35,1	294	64,9

Подальша робота із трансгенними матеріалами продовжувалася з передачі даної ознаки матеріалам ялтушківського походження. Тобто ген стійкості до дії гербіциду Баста шляхом насичуючих схрещувань передавався як багатонасінним запилювачам, так і лініям О типу та їх ЧС аналогів. Так як донори були напівстерильного типу і мали різний рівень однонасінності, то і матеріали, яким передавали ген bar, мали невисокі показники на проміжному етапі (табл. 2).

№ зп	Амбарний номер	Походження	Стерильність, %	Фертильність, %	Однонасінність, %	Багатонасінність, %
1	00-439	Я/LL (Пер)		97,0		97,0
2	00-440	Я/LL (ДА)		99,0		72,0
3	00-443 чс	ЧС лінія	81,0		78,0	
4	00-443 зап	лінія О типу		58,0	77,0	
5	00-444 чс	ЧС лінія	79,0		66,0	
6	00-444 зап	лінія О типу		88,0	67,0	

Тому, крім негативних браковок за ознакою стійкості до дії гербіциду, проводилися браковки за однонасінністю або багатонасінністю, стерильністю – фертильностю залежно від походження матеріалу. Після проведених робіт було одержано лінії О типу та їх ЧС аналоги з високою однонасінністю та стійкістю до дії гербіциду Баста та багатонасінні запилювачі.

Стійкість селекційних матеріалів до дії гербіциду Баста у роки їх формування подано у табл. 3.

Таблиця 3 — Успадкування гена толерантності рослинами цукрових буряків до гербіциду Basta

Амбарний номер	Відсоток толерантних рослин до дії гербіциду Баста				
	2000 р., теплиця-штеклінги	2001 р., поле-коренеплоди	2001 р., поле-насінники	2002 р., поле-коренеплоди	2002 р., поле-насінники
00-439	87,8	76,0	94,0	70,2	92,5
00-440	54,0	64,8	89,0	72,1	91,2
00-441	95,0	64,7	88,7	75,0	92,5
00-442	89,7	65,2	93,0	78,9	-
00-443 чс	80,0	69,7	95,5	85,1	92,4
00-443 зап	79,4	76,6	90,0	83,0	93,2
00-444 чс	94,5	80,8	98,5	79,0	90,1
00-444 зап	94,6	71,4	93,0	68,7	90,4

У роки досліджень рівень стійкості дещо коливався, але в основному він підвищувався. Причиною відхилень може бути часткове самозапилення рослин реципієнта через певне неспівпадання строків цвітіння компонентів схрещувань, недостатньою кількість пилку, утвореного рослинами трансгенних вихідних матеріалів [8]. Результати проведених схрещувань довели можливість концентрації фосфінотрицин – толерантності як у багатонасінному гетерозисному запилювачі, так і у материнських компонентах (лінії О типу та її ЧС аналогу) при створені гібридів генетично модифікованих цукрових буряків.

Внаслідок проведених схрещувань донорів стійкості до дії гербіциду Баста із селекційними матеріалами ялтушківського походження та подальших

добір за селекційними і господарсько-цінними [illegible]
матеріали, які пройшли перевірку у станційному сортовипробуванні. У якості стандартів виступали гібриди селекції фірми КВС (Соня, Ківа, Екстра, Перла, Аріана) (табл..4).

Таблиця 4 — Продуктивність матеріалів, одержаних від гібридизації рослин-донорів і ялтушківських матеріалів

Комбінації	Врожайність коренеплодів, т/га	Цукристість, %	Збір цукру, т/га	Показники продуктивності, % до групового стандарту за		
				врожайністю	цукристістю	збором цукру
st	23,38	13,77	3,23	100	100	100
00443чсх00441	23,63	13,81	3,27	101,1	100,3	101,5
4739 (mm)	20,19	13,78	2,78	86,4	100,1	86,1
00443чсх00443	23,64	14,10	3,35	101,1	102,3	103,7
00444чсх00444	22,36	14,19	3,16	95,6	103,0	98,1
4734 (MM)	22,59	14,32	3,23	96,6	104,0	100,2
00-440 (Я/ДА Ц)	24,54	14,18	3,45	105,0	103,0	107,1
НІР	2,02	0,29	0,31	8,6	2,1	9,6

Одержаний матеріал характеризується по відношенню до групового стандарту за збором цукру у межах 86,1 – 107,1 %., тобто на рівні стандартів. Продуктивність даних матеріалів залежить від генетичної цінності матеріалу. Присутність трансгену у геномі рослин має лише додатковий характер. Проводячи насичуючі схрещування, постійний добір за комплексом господарсько-цінних ознак і толерантності фенотипу до гербіциду є ефективними заходами підвищення їх продуктивності [9]

Висновок. На станції створені генетично модифіковані толерантні до фосфінотрицину цукрові буряки. При чому генетичну конструкцію bar введено у лінії О типу та їх ЧС аналоги і багатонасінні гетерозисні запилювачі. Оцінка матеріалів у станційному сортовипробуванні порівняно із стандартами зарубіжної селекції показали їх високу продуктивність.

Список літератури

1. Hinnisdaels, S., Negrutiu, I., Jacobs, M. and Sidorov, V.(1988). Plant somatic hybridisation: evaluation and perspectives. *International Association Plant Tissue Culture News* 55: 2-20.

2. Potrikus, I. and Spangenberg, G. (1995). Gene transfer to plants. Springer-Verlag, Berlin, 361pp.

3. Kung, S.-D., Arntzen, C.J. (eds) (1989) Plant Biotechnology, Butterworths, Boston, USA.

4. Ramulu, K.S., Dijkhuis, P., Rutgers, E., Blaas, J., Verbeek, W.H.J., Verhoeven, H.A. and Colijn-Hooymans, C.M. (1995). Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually incongruent plant species. Euphytica 85:225-268.

5. Blackhall, N.W., Finch, R.P., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R.

...mediation of electroporation mediated uptake of macromolecules into plant protoplasts. *Protoplasma* 186: 50-56.

6. Методика исследований по сахарной свекле. – К.:ВНИС, 1988. – 292 с.

7. Методика і техніка проведення робіт у селекційній сівозміні / Роїк М.В., Ермантраут Е.Р., Борисюк В.О. та ін. – К.: Науковий світ, 2000. – 29 с.

8. Сливченко О.А. Генетично модифіковані толерантні до фосфінотрицину цукрові буряки як нова форма вихідного матеріалу для селекції. Автореф. дис. ... канд. с.-г.наук: 06.01.05/ІЦБ УААН. – К., 2001. – 19 с.

9. Сливченко О.А. Продуктивність генетично модифікованих фосфінотрицин – толерантних цукрових буряків //Зб. наук. пр. ІЦБ. – В. 3. – К.: 2000. – С. 43- 47.

Аннотация

В статье освещены вопросы создания трансгенных материалов фосфинотрицин - толерантных сахарной свеклы. Дана характеристика исходным материалам - донорам Bar - резистентности и материалам, которым был передан данный признак, показано наследование гена толерантности. Оценена созданных трансгенных гибридов в основном сортоиспытании.

Annotation

The article deals with the problems of development of transgenic materials of phosphinotricin-tolerant sugar beet. Characteristics of initial materials to which this trait was transferred was given; inheritance of tolerance gene was shown. The obtained transgenic hybrids were evaluated for their productivity in the principal variety test.