

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ РЕСТИТУЦИОННЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Елена Николаевна Васильченко¹
Татьяна Петровна Жужжалова¹
Татьяна Григорьевна Ващенко²
Елена Олеговна Колесникова¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы
и сахара имени А.Л. Мазлумова

²Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Представлена технология создания дигамплоидных линий сахарной свеклы при культивировании *in vitro* неоплодотворенных семязачатков. Показано, что на первом этапе для индуцирования гаплоидов существенное значение имеют фенотипические признаки семенных растений, морфологические и цитологические особенности формирующихся бутонов и неоплодотворенных семязачатков. Изложен метод двух-этапного культивирования изолированных семязачатков на питательной среде Гамборга (B₅), способной регулировать обеспеченность эксплантов гормонами и питательными веществами, особенность которого заключается в изменении консистенции среды, что позволяет в жидкой фазе проводить дифференциацию культивируемых тканей, а при переносе на агаризованную среду индуцировать формирование гаплоидных регенерантов. Гормональный состав среды эффективно регулирует направление морфогенетического развития у изолированных семязачатков – через прямую регенерацию (эмбриоидогенез) или через каллус (гемморизогенез), что свидетельствует о тотипотентности как половых, так и соматических клеток экспланта. Стабилизирующий отбор при создании дигамплоидов способствует выявлению ценных морфологических признаков регенерантов. Последним этапом процесса культивирования *in vitro* является укоренение диплоидизированных регенерантов методом пересадки на новую питательную среду с измененным составом ауксинов. Микроклоны с мощной корневой системой и хорошо развитой листовой поверхностью используют как посадочный материал. Отбор на этапе стабилизации гаплоидных регенерантов и после диплоидизации индуцированных партеногенетических растений проводят на основе учета плоидности цитофотометрически по содержанию ядерной ДНК. Молекулярно-генетические исследования амплифицированных фрагментов ДНК митохондриального генома позволяют проводить генотипирование регенерантов по стерильному и фертильному типам цитоплазмы. На заключительном этапе микроклоны переводят в закрытый грунт, где выращивают из них семенные растения. В результате исследований созданы 4 реституционные линии и получены семена для дальнейшего изучения и использования в селекции сахарной свеклы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарная свекла, селекция, индуцирование гаплоидов, DH-технологии, RFLP-анализ, растения-регенеранты.

THE TECHNOLOGY OF CREATING RESTITUTION SUGAR BEET LINES

Elena N. Vasilchenko¹
Tatiana P. Zhuzhzhlova¹
Tatiana G. Vashchenko²
Elena O. Kolesnikova¹

¹A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar

²Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great

The authors present the technology of creating dihaploid lines of sugar beet during *in vitro* cultivation of unfertilized ovules. It is shown that at the first stage the induction of haploids is significantly influenced by phenotypic signs of seed plants, as well as morphological and cytological features of forming buds and unfertilized ovules. The authors describe a method of two-stage cultivation of isolated ovules on Gamborg B₅ medium that regulates the supply of hormones and nutrients to explants. The peculiarity of this method is the change in the consistency of the medium, which allows performing the differentiation of cultured tissues in the liquid phase and inducing the formation of haploid regenerants at transfer to the agarized medium. The hormonal composition of the medium efficiently regulates the direction of morphogenetic development in isolated ovules through direct regeneration (embryoidogenesis) or callus (gemmorizogenesis), which indicates the totipotency of both the sex and somatic cells of the explant. The stabilizing selection in dihaploid creation helps to identify the valuable morphological features of regenerants. The last stage of *in vitro* cultivation process is the rooting of

diploidized regenerants by transferring them to a new culture medium with the modified auxin composition. The microclones with a powerful root system and a well-developed leaf surface are used as planting material. Selection at the stage of stabilization of haploid regenerants and after diploidization of induced parthenogenetic plants is performed on the basis of cytophotometric analysis of ploidy by the content of nuclear DNA. Molecular genetic studies of amplified DNA fragments of the mitochondrial genome allow genotyping the regenerants by sterile and fertile types of the cytoplasm. At the final stage the microclones are transferred to the soil in the nursery conditions, where they are grown into seed plants. As a result of the research 4 restitution lines were created and seeds were obtained for further studies and use in the selection of sugar beet.

KEY WORDS: sugar beet, selection, induction of haploids, DH technologies, RFLP analysis, regenerative plants.

Введение

Традиционное получение инбредных линий и гибридов в селекции сахарной свеклы является трудоемким процессом, требующим длительного времени из-за 2-летнего цикла развития растений, само- и перекрестной несовместимости, инбредной депрессии. Поэтому в большинстве развитых стран в настоящее время для создания гомозиготных линий, ускорения селекционного процесса и индукции генетического разнообразия широко используются биотехнологии получения удвоенных гаплоидов (DH-технологии) [7, 8]. С помощью DH-технологии полностью гомозиготные растения можно получить в течение одного года, в отличие от классических методов селекции, при использовании которых процесс инбридинга занимает 6–12 лет [5, 6].

Реституционные DH-линии (удвоенные гаплоиды) представляют собой константные, нерасщепляющиеся формы, пригодные для использования в качестве линий для создания гибридов или как исходный материал для селекционной работы [3]. Преимущество этого биотехнологического подхода также состоит в расширении формообразовательного процесса за счет гаметоклональной изменчивости при получении новых генетически улучшенных линий сахарной свеклы [1].

Вероятность получения гаплоидов у различных форм сахарной свеклы неодинакова и в значительной степени зависит от генотипических особенностей донорского материала. Необходимыми условиями формирования гаплоидных регенерантов являются первичная оценка морфологических признаков, проведение цитологического и цитофотометрического анализов уровня пloidности, а также оптимизация этапов морфогенеза в период стабилизирующих отборов [2, 4]. Важным является также молекулярное маркирование для выделения гомозиготных линий сахарной свеклы с ценными селекционными признаками. Для ускоренного получения выровненного семенного материала рекомендуются методики по выращиванию штеклингов *ex situ* и созданию условий их яровизации, обеспечивающих оптимальное развитие семенных растений.

Выявление условий формирования гаплоидных регенерантов *in vitro* и оценка особенностей их морфогенеза, биохимических и молекулярно-генетических характеристик созданных линий удвоенных гаплоидов с ценными селекционными признаками имеют важное прикладное значение для селекции при создании высокопродуктивных гибридов. Поэтому разработка технологии целенаправленного создания DH-линий сахарной свеклы с ценными селекционными признаками является важным и актуальным направлением селекционных исследований.

Материалы и методы

В ходе экспериментов использовали селекционные материалы лаборатории ЦМС и лаборатории исходного материала Всероссийского научно-исследовательского института сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова.

В качестве эксплантов использовали неоплодотворенные семязачатки, изолированные из семенных растений сахарной свеклы в фазах бутонизации и начала цветения. Цветоносы с бутонами стерилизовали в 10% растворе хлорамина в течение 1 часа.

Культивирование эксплантов осуществляли на питательной среде Гамборга разной консистенции (жидкая и твердая фазы) [4], с разным составом желирующих веществ (агар, *gelrit*) с добавлением ауксинов и цитокининов в различных сочетаниях [10].

Определение ploидности у регенерантов сахарной свеклы проводили методом проточной цитофотометрии на анализаторе ploидности фирмы Partec.

Для получения препаратов тотальной ДНК использовался метод с применением ЦТАБ-буфера (цетилтриэтиламмония бромид). Амплификацию ДНК проводили в автоматическом режиме в термоциклере «ДНК-технологии».

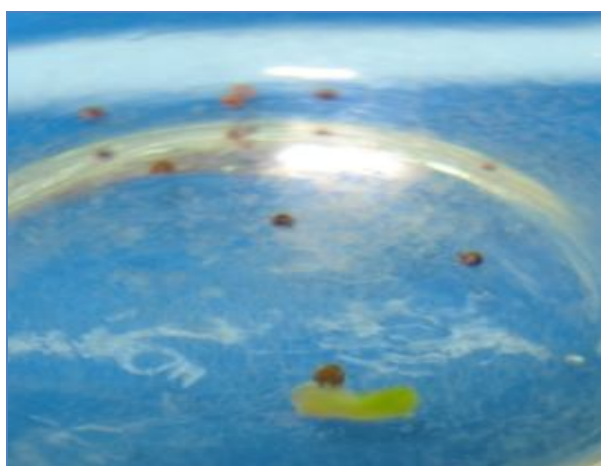
Для визуализации выявленных ампликонов проводили электрофорез в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Амплификацию фрагментов ДНК, содержащих тандемные повторы, осуществляли с использованием двух пар праймеров [9].

Результаты и их обсуждение

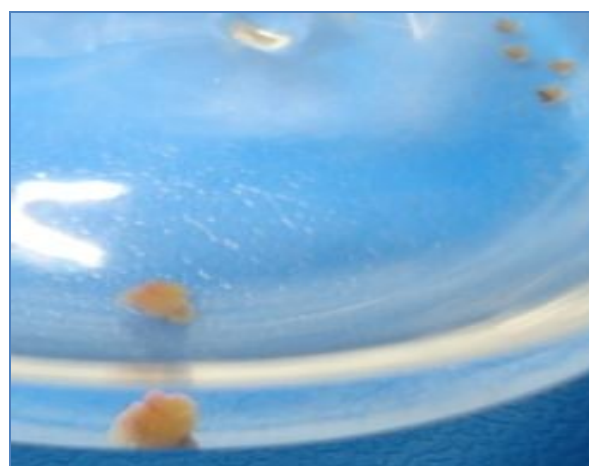
При индуцировании гаплоидии существенное значение имеют ценные селекционные и фенотипические признаки материалов сахарной свеклы, вводимых в культуру. Поэтому в качестве доноров для создания гомозиготных линий принято использовать селекционный материал с высокой закрепительной способностью ЦМС, отдельноплодностью, продуктивностью и другими ценными свойствами. Обычно для эксплантации семязачатков используют цветоносные побеги семенных растений ценных генотипов в период бутонизации.

В процессе исследований было установлено, что наибольшей регенерационной способностью при индуцировании гаплоидов обладают семязачатки, содержащие восьмиядерные зародышевые мешки, расположенные в центральном колосе кистевидного соцветия сахарной свеклы. Высокая тотипотентность изолированных семязачатков в этот период обеспечивает в условиях *in vitro* наибольшую компетентность к морфогенезу и восстановлению растительного организма с новыми ценными свойствами.

К числу наиболее важных факторов, способных вызывать у эксплантов индукцию морфогенных структур сахарной свеклы в культуре *in vitro*, относится использование экзогенных регуляторов роста и консистенции питательной среды. Проведенные исследования показали, что использование среды жидкой консистенции, содержащей цитокинин БАП 1,0 мг/л, вызывает дифференциацию клеток тканей в среднем до 6,1%. Добавление БАП 2,0 мг/л повышает выход дифференцированных тканей до 6,8% от введенных семязачатков с формированием массы клеток более плотной структуры (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Проплиферация новообразований из клеток женского гаметофита на питательной среде жидкой консистенции:
а – концентрация БАП 1 мг/л, б – концентрация БАП 2 мг/л

При добавлении в модифицированную среду активированного угля 5 мг/л и цитокинина БАП 2,0 мг/л частота формирования регенерантов составляет 6,7% (табл. 1).

Таблица 1. Влияние состава питательной среды на регенерацию новообразований

Номер питательной среды	Регуляторы роста, мг/л	Содержание желирующих и стимулирующих веществ, г/л	Получено	
			новообразований, шт.	регенерантов, %
1	БАП 1,0 мг/л	Агар 7 г/л	105	1,9
2	БАП 2,0 мг/л	Агар 7 г/л	80	2,5
3		Агар 7 г/л + AgNO ₃	125	0,8
4		Агар 7 г/л + активированный уголь 5 г/л	120	6,7
5		Gelrit 3 г/л	125	3,2
6	Гиббереллин 2,0 мг/л	Gelrit 3 г/л	140	2,8
7	Гиббереллин 1,0 мг/л + БАП 0,2 мг/л + ИМК 0,1 мг/л	Gelrit 3 г/л	420	5,7

На средах, где в качестве отвердителя использовался *gelrit*, частота регенерации варьирует от 3,2 до 5,7%. При добавлении в питательную среду нитрата серебра (AgNO₃) количество регенерантов снижается до 0,8%.

Дифференцированные структуры, выращенные на жидких питательных средах и пересаженные на твердые модифицированные среды с различным составом гормонов и желирующих веществ (агар, *gelrit*), индуцируют побеги, различающиеся по морфологии (рис. 2).

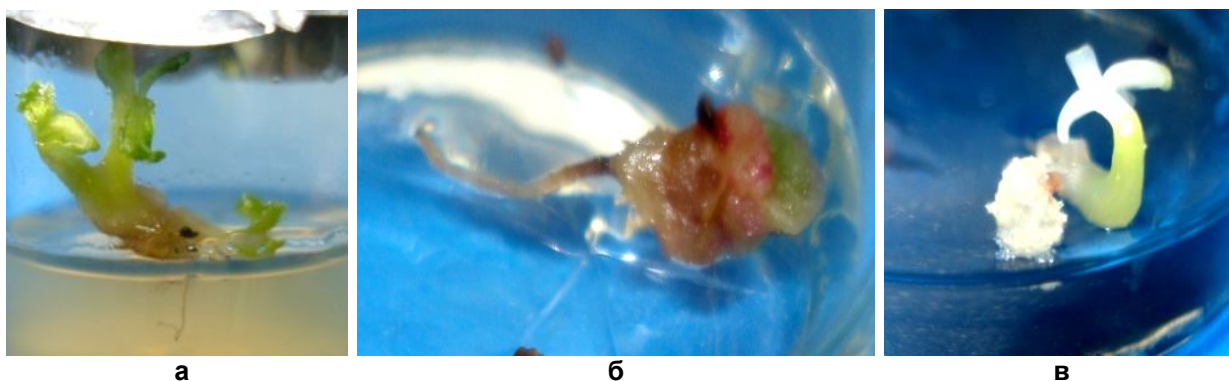


Рис. 2. Индукция побегов на средах с разным составом желирующих веществ: а – агар; б, в – *gelrit*

На начальных этапах развития гаплоидные регенеранты имеют незначительные размеры (формируют 1–2 пары листьев) и различаются только по окраске гипокотыля – розовый или зеленый.

В зависимости от донорского материала гибель регенерантов достигает 40–50%. Это требует стимулирования пролиферации меристем и формирования побегов более высоких порядков.

При дальнейшем культивировании на питательной среде, содержащей цитокинин БАП 0,2 мг/л, кинетин КН 0,2 мг/л и гиббереллин Гк 0,2 мг/л в соотношении (1 : 1 : 1), в течение 3–4 недель происходит формирование нормально развитых растений (до 95%) и образование многочисленных пазушных побегов с частотой нормально развитых до 10 шт./эксплант.

В процессе дальнейшего развития регенеранты увеличиваются в размере и формируют розетку листьев, различаясь по морфологическим признакам: окраске и форме листовых пластинок, длине и окраске черешка, высоте растений.

Обычно гаплоидные регенеранты фенотипически отличаются от диплоидных форм меньшей высотой и размером всех органов. Проведение отбора позволяет выделить нормально развитые гаплоидные формы, которые в зависимости от генотипа имеют более узкие листовые пластинки с длинными черешками или, наоборот, широкие листья с волнистым краем, но короткими черешками.

Более точным доказательством стабилизации и выравнивания гаплоидных регенерантов является выявление уровня ploидности на проточном цитофотометре. Согласно анализу, количество ядерной ДНК у гаплоидных регенерантов в фазе G₁ (митоза) составляет 1С, что соответствует уровню ploидности n = 9.

На первом этапе отбирают и формируют линии изучаемых генотипов только с гаплоидным набором хромосом (n = 9).

Для получения гомозиготных линий, способных участвовать в селекционном процессе, гаплоидные растения переводят на более высокий уровень ploидности. Удвоение числа хромосом происходит при выдержке микроклонов в течение двух суток на среде с колхицином (0,005 мг/л). Количество диплоидных растений в данном случае составляет 91,3%. При колхицинировании гаплоидов наблюдается частичная полиploидизация растений и появление, наряду с диплоидами, триploидных и тетраploидных форм, которые подлежат браковке.

Дальнейшее культивирование на ростовой среде (ГК, 6-БАП, Кн – по 0,2 мг/л) вызывает стабилизацию ростовых процессов и формирование диплоидных растений с содержанием ядерной ДНК 2С, соответствующей уровню ploидности (2n = 18). Диплоидные нормально развитые микроклоны имеют зеленые и широкие листья, оптимальное соотношение черешка и листовой пластинки, развитые точки роста.

Существенное значение после проведения диплоидизации растений имеет выявление генетических изменений, которые не проявляются фенотипически. Проведенные исследования показали, что PCR и RFLP-анализ с использованием рестриктазы Hind III позволяет идентифицировать тип цитоплазмы у создаваемых дигаплоидов сахарной свеклы по числу рестриктов (рис. 3).

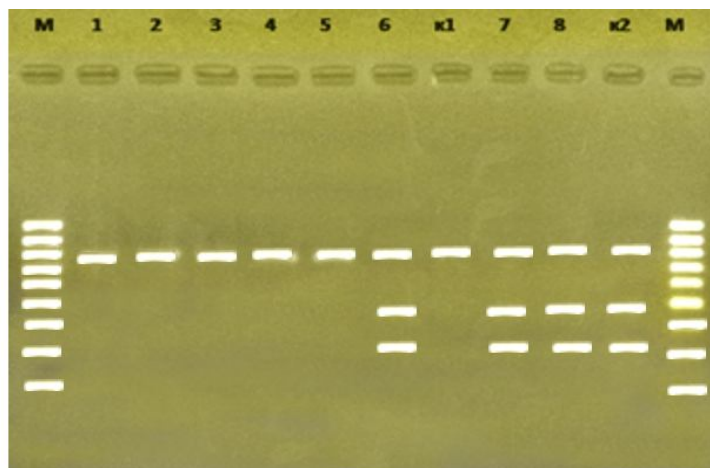


Рис. 3. Электрофореграмма рестриктов амплифицированных фрагментов ДНК (RFLP-анализ, рестриктаза Hind III) у дигаплоидных растений-регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.): κ1 – контрольные фертильные растения; κ2 – контрольные стерильные растения; 1–5 – формы с нормальной (N) цитоплазмой; 6–8 – формы со стерильной (S) цитоплазмой; M – маркеры молекулярных масс

У дигаплоидных микроклонов с нормальной цитоплазмой амплифицируется один фрагмент (800 п.н.). У стерильных (S) форм выявляются два продукта рестрикции 320 и 480 п.н. Реституционные ДН-линии, у которых этот фрагмент не рестрицируется Hind III, представлен полностью фертильными формами с нормальной цитоплазмой (N) и ядерными генами в рецессивном состоянии (*rf*). В остальных образцах наблюдается полиморфизм фрагментов, что, по-видимому, предполагает наличие у соответствующих гаплоидных форм стерильной цитоплазмы (S) и разное сочетание рецессивных и доминантных аллелей ядерных генов *Rf₁/rf₁* и *Rf₂/rf₂*. Поэтому выявление растений-регенерантов со стерильной цитоплазмой на ранних этапах культивирования имеет

большое значение при селекции сахарной свеклы для создания линий с ЦМС и высокопродуктивных гибридов на стерильной основе.

Индукция ризогенеза у стабилизированных форм с удвоенным набором хромосом была успешной при добавлении в среду ауксинов ИМК (1 мг/л), НУК (1 мг/л) и $AgNO_3$ 2,0 мг/л. Добавление в питательную среду нитрата серебра ($AgNO_3$) стимулировало образование корней в пределах 4,7–11,6%. При этом установлено, что частота корнеообразования зависит от генотипа и варьирует в пределах 77,3–96,7% (табл. 2).

Таблица 2. Влияние гормонального состава на индукцию ризогенеза у реституционных линий

Генотип	Процент укоренения			
	НУК 1 мг/л	НУК 1 мг/л + $AgNO_3$ 2,0 мг/л	ИМК 1 мг/л	ИМК 1 мг/л + $AgNO_3$ 2,0 мг/л
1039	86,4	95,7	91,0	96,7
26	81,8	93,4	89,2	95,8
43	77,3	82,0	81,4	92,7

На следующем этапе технологии проводится пересадка растений в нестерильные условия закрытого грунта. Наилучшим субстратом является смесь песка с перегноем в соотношении 1 : 1.

Создание 100% влажности воздуха в течение 2–3 дней позволяет сохранить до 72% микроклонов. Дальнейшее выращивание в течение 2–3 месяцев дает возможность получить небольшие корнеплоды (штеклинги) массой от 16 до 100 г. При посадке в субстрат микроклоны адаптируются к искусственным условиям теплиц (рис. 4).

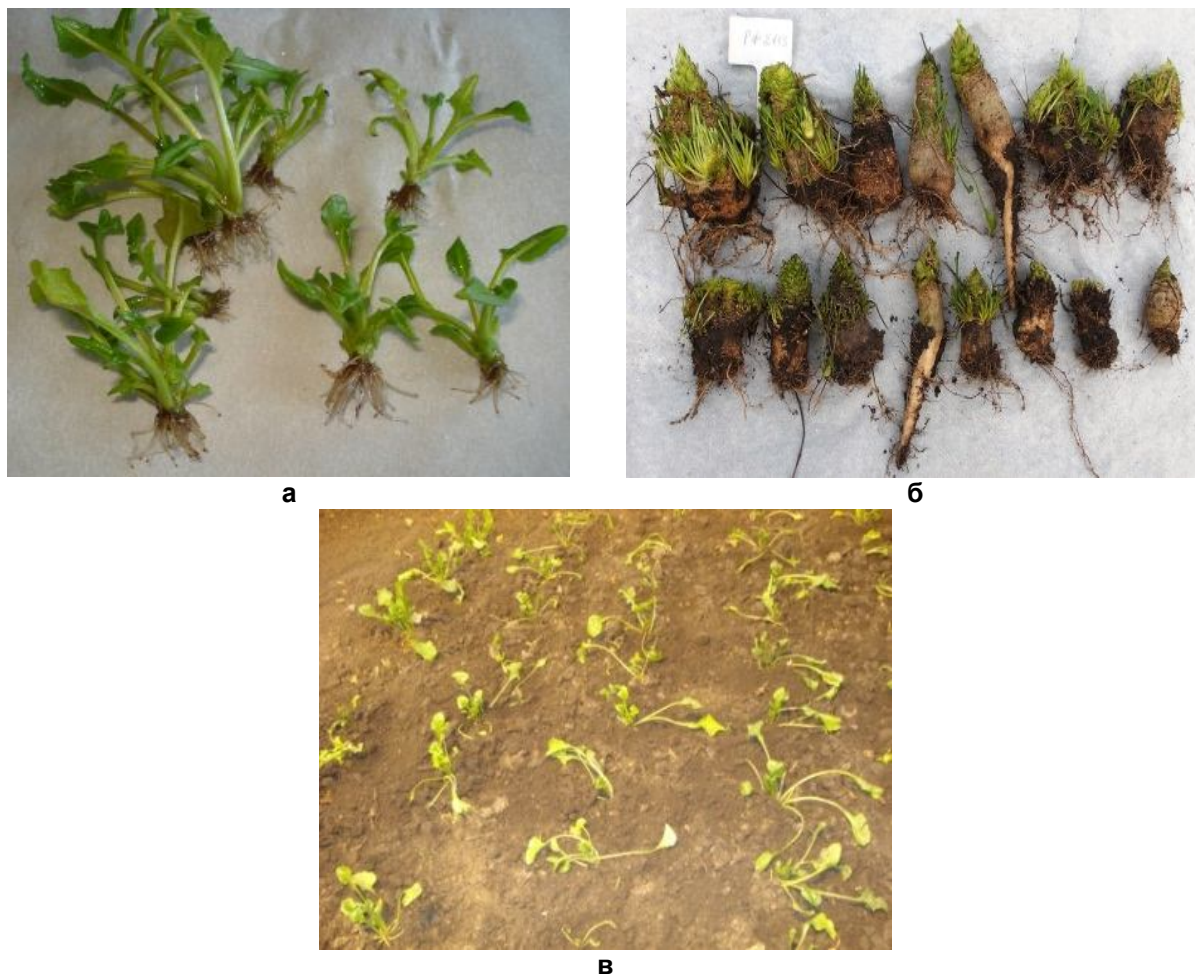


Рис. 4. Микроклоны сахарной свеклы в условиях теплицы: а – микроклоны; б – штеклинги; в – высадка микроклонов в грунт

Для получения семенных растений необходим период яровизации. С этой целью через 60–70 дней после посадки в грунт понижают интенсивность освещения и температуру до +4°C в течение 45 дней. В данных условиях яровизация проходит успешно, что выражается в ускорении развития цветоносных побегов и цветков.

В начале стеблеобразования температуру повышают до 14–20°C и поддерживают ее при непрерывном освещении (1000 люкс) на протяжении месяца. В этот период отмечается активный рост и развитие семенных растений. По истечении этого срока растения формируют нормальный габитус куста, наблюдаются процессы бутонизации и цветения (рис. 5).



Рис. 5. Формирование габитуса семенных растений сахарной свеклы на разных фазах развития

Высота растений достигает 1,5 метра и больше, толщина основного цветоносного стебля составляет 3,0–3,5 см, цветение проходит одновременно и интенсивно, фертильность пыльцевых зерен варьирует от 87 до 92%. Через 8–10 недель формируются семена с высокой раздельноплодностью (рис. 6).



Рис. 6. Семена гомозиготных реституционных линий сахарной свеклы

В результате исследований созданы 4 реституционные линии и получены семена для дальнейшего изучения и использования в селекции сахарной свеклы.

Заключение

Разработана технология создания реституционных линий сахарной свеклы, которая включает трехлетний цикл проведения следующих биотехнологических и селекционных приемов:

- на *первом этапе* осуществляется индукция регенерантов из неоплодотворенных семязачатков с учетом морфологических, цитологических и молекулярно-генетических признаков. Проводится стабилизация отобранных нормально развитых гаплоидных регенерантов с использованием микроразмножения на агаризованных средах;

- *второй этап* включает создание ДН-линий с использованием диплоидизации гаплоидного материала путем колхицинирования и отбор по молекулярно-генетическим признакам;

- на *третьем этапе* выращивают семена реституционных линий после укоренения их в культуре *in vitro* и выращивания штеклингов и семенных растений в закрытом грунте.

Библиографический список

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – Москва : Наука, 1964. – 272 с.
2. Гаплоидный партеногенез *in vitro* у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*): факторы и диагностические признаки / Т.П. Жужжалова, О.А. Подвигина, В.В. Знаменская, Е.Н. Васильченко, Н.А. Карпеченко, О.А. Землянхуина // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 5. – С. 636–644.
3. Могилевская Л.А. Условия культивирования изолированных неоплодотворенных семян льна масличного для получения гаплоидных растений / Л.А. Могилевская, А.И. Сорока, В.А. Лях // Вісник Запорізького державного університету. – 2002. – № 3. – С. 3–8.
4. Особенности морфогенеза и молекулярно-биохимических свойств гаплоидных регенерантов сахарной свеклы / Е.Н. Васильченко, Т.П. Жужжалова, О.А. Землянхуина, Н.А. Карпеченко // Сахарная свекла. – 2017. – № 8. – С. 14–20.
5. Подвигина О.А. Индуцирование гаплоидии из неоплодотворенных семян сахарной свеклы в условиях *in vitro* / О.А. Подвигина // Энциклопедия рода *Beta*. Биология, генетика и селекция свеклы : сб. науч. тр. Института цитологии и генетики СО РАН, Россия. – Новосибирск : Сова, 2010. – С. 455–465.
6. Шмыкова Н.А. Получение удвоенных гаплоидов у видов рода *Brassica L.* / Н.А. Шмыкова, Д.В. Шумилина, Т.П. Супрунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 1. – С. 111–120.
7. Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation / J.M. Dunwell // Plant Biotechnology Journal. – 2010. – Vol. 8, No. 4. – Pp. 377–424.
8. Chen J.F. In vitro haploid and diploid production via unfertilized ovule culture / J.F. Chen, L. Cui, A.A. Malik, K.G. Mbira // Plant Cell and Tissue Culture. – 2011. – Vol. 104, Issue 3. – Pp. 311–319.
9. Rogers S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue / S.O. Rogers, A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 5. – Pp. 69–76.
10. Tomashevskaja-Sowa M. Effect of growth regulators and other components of culture medium on morphogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris L.*) / M. Tomashevskaja-Sowa // Acta Agrobotanica. – 2012. – Vol. 65, No. 4. – Pp. 91–100.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ Принадлежность к организации

Елена Николаевна Васильченко – старший научный сотрудник отдела генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Татьяна Петровна Жужжалова – доктор биологических наук, профессор, зав. отделом генетики и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Татьяна Григорьевна Ващенко – доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Российская Федерация, г. Воронеж, тел. 8(473) 253-76-93 (доб. 1269), e-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Елена Олеговна Колесникова – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории культуры тканей ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова», Российская Федерация, Воронежская область, Рамонский район, пос. ВНИИСС, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Дата поступления в редакцию 02.02.2018

Дата принятия к печати 20.02.2018

AUTHOR CREDENTIALS Affiliations

Elena N. Vasilchenko – Senior Research Scientist, the Dept. of Biotechnology and Genetics, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Tatiana P. Zhuzhzhlova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Dept. of Biotechnology and Genetics, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Tatiana G. Vashchenko – Doctor of Agricultural Sciences, Professor, the Dept. of Plant and Seed Selection Breeding, Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Russian Federation, Voronezh, tel. 8(473) 253-71-81, e-mail: selection@agronomy.vsau.ru.

Elena O. Kolesnikova – Candidate of Biological Sciences, Research Scientist, Tissue Culture Laboratory, A. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar, Russian Federation, Voronezh Oblast, Ramonsky District, VNISS settlement, e-mail: biotechnologiya@mail.ru.

Received February 02, 2018

Accepted February 20, 2018