

О.В. ДУБРОВНАЯ, И.И. ЛЯЛЬКО, Н.Я. ГУБАНОВА

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ ПО ПРИЗНАКУ СТЕРИЛЬНОСТИ ПЫЛЬЦЫ



Проведено изучение природы стерильности пыльцы растений-регенерантов сахарной свеклы, полученных из каллусных культур инбредных линий. Показано, что в большинстве случаев возникающая у регенерантов мужская стерильность обусловлена эпигенетическими факторами и носит модификационный характер. Наряду с этим отмечены и мутационные изменения — выделены формы с цитоплазматической и ядерной стерильностью.

© О.В. ДУБРОВНАЯ, И.И. ЛЯЛЬКО, Н.Я. ГУБАНОВА, 2004

Введение. Наряду с использованием традиционных методов в создании нового исходного селекционного материала все более широкое распространение получают и биотехнологические методы. Примером этого может быть использование соматической изменчивости, в основе которой лежат различные механизмы: изменения числа и морфологии хромосом; точковые мутации, изменения метилирования определенных последовательностей ДНК, транспозиции подвижных генетических элементов, амплификация и редукция повторяющихся последовательностей ДНК, соматический кроссинговер и обмен сестринских хроматид, криптические элиминации вирусов [1, 2].

Соматическая изменчивость растений-регенерантов сахарной свеклы выявляется в виде широкого спектра морфологических, цитологических и биохимических показателей. Спектр генетической изменчивости может включать полезные изменения признаков, что позволяет выделять из соматоклонов ценные мутантные формы для использования в селекционном процессе [3]. К настоящему времени у сахарной свеклы выделены соматические варианты с повышенной способностью к каллусогенезу [4]; высокой и стабильной регенерационной способностью [5]; измененным числом хромосом [6]. Выделены регенеранты, характеризующиеся разнообразием окраски листьев и корнеплодов [7], формы и размеров листьев, черешков, корнеплодов [8]. Получены соматоклоны, различающиеся по хроматографическим характеристикам растворимых белков цитоплазмы, содержанию хлорофиллов и каротиноидов [9], с отличиями в электрофоретических спектрах амплифицированной ДНК [10].

В процессе культивирования *in vitro* могут возникать изменения и в митохондриальном геноме клеток растений, обусловленные внутри- и межмолекулярными перестройками мтДНК за счет рекомбинаций по повторяющимся последовательностям [11], амплификацией последовательностей, предсуществующих в тканях экспланта *in vivo* [12], потерей митохондриальных плазмид [13]. Высокий уровень изменчивости митохондриального генома в культуре *in vitro* способствует получению большого количества разнообразных мутантов, среди которых могут присутствовать формы с мужской стерильностью. Мутанты с цитоплазматической мужской стерильностью были вы-

явлены среди регенерантов, полученных из каллусных культур риса [14], кукурузы [15], сорго [16], циннии [17]. Показано, что изменения митохондриального генома сохраняются у регенерантов в течение нескольких семенных поколений [14]. Значительное количество (40 %) регенерантов, имеющих стерильную пыльцу, было получено также из каллусных культур сахарной свеклы [18]. Однако обусловленность стерильности (цитоплазматическая, ядерная или модификационная) регенерантов свеклы практически не изучалась.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение природы стерильности растений-регенерантов сахарной свеклы, полученных из каллусных культур различных инбредных линий.

Материалы и методы. Для введения в культуру *in vitro* использовали семена 20 фертильных инбредных линий сахарной свеклы третьего-четвертого поколения самоопыления, заложенных на сорте Индустриальная. Проростки, полученные из семян, выращивали на модифицированной среде DS-2 без фитогормонов [19]. В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали листовые пластинки двухмесячных растений. Каллусная ткань была получена на среде МС [20], дополненной 1 мг/л БАП. Для индукции формирования побегов была использована модифицированная среда МС, дополненная БАП (1 мг/л) и НУК (0,5 мг/л). Экспериментальный материал выращивали на свету при 16-часовом фотопериоде и температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

Морфогенные клеточные культуры были индуцированы только от эксплантов растений инбредных линий — 150-21, 150-34 и 150-49. В дальнейшем из них было получено несколько каллусных линий — И-6, И-11, И-17, И-22 (л. 150-21); И-41, И-54 (л. 150-34); И-68, И-71 (л. 150-49). Из каллусных культур 7-9 пассажей были регенерированы побеги, которые затем доращивались на среде МС со сниженным содержанием сахарозы (1 %). Для укоренения побегов к минеральной среде добавляли 2 мг/л ИМК. Хорошо укоренившиеся побеги переносили в стерильную почву и накрывали стеклянными колпаками. Через 14 дней растения переносили в вегетационные сосуды, где они выращивались до конца вегетации.

Полученные корнеплоды после перезимовки при температуре $+5^\circ\text{C}$ вновь высаживали в вегетационные сосуды. Анализ пыльцеобразовательной способности растений проводили визуально в три срока: в момент раскрытия первых цветков, во время массового цветения и в конце цветения. Для идентификации у регенерантов природы стерильности все растения с пониженной пыльцеобразовательной способностью помещали под парные изоляторы с растениями линии 15-47 (генотип Nxxxz), маркированной геном HL (опушенность листовой пластинки), по которому и проводился отбор истинных гибридов [21]. Для получения второго гибридного поколения фертильные растения F_1 размножали на изолированных участках при свободном опылении. Для стерильных и полустерильных растений первого гибридного поколения проводили возвратные скрещивания с тем же опылителем.

При определении типа стерильности семенников использовали классификацию Оуэна [22]. Цитологический анализ пыльцы, окрашенной 4%-ным ацетокармином, проводили на микроскопе «Amplival» при увеличении 15×40 . Математическую обработку данных осуществляли при использовании метода χ^2 [23].

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ пыльцеобразующей способности регенерантов показал, что большинство растений оказались полностью фертильными. Среди растений, полученных из каллусных линий И-6, И-17 и И-54, наряду с фертильными обнаружены семенники со стерильной и полустерильной пыльцой I и II типов (табл. 1). У полностью стерильных растений были пустые, прозрачные, слегка зеленоватые пыльники, которые несколько дней держались на цветке не опадая. При микроскопическом исследовании их содержимого отмечено незначительное количество деформированной пыльцы со слабо развитой экзиной. Для полустерильного растения первого типа характерны более крупные, желтоватые, не растрескивающиеся пыльники, содержащие мелкую нежизнеспособную, одноядерную пыльцу, имеющую оболочку и поры прорастания. Пыльники всех полустерильных растений второго типа были крупные, ярко-желтые, слегка пылящие. Их пыльца представляла собой смесь фертильных и мелких сте-

Таблица 1

Анализ растений-регенерантов по пыльцеобразовательной способности

Происхождение исходного экспланта и номер каллусной линии	Изучено семенников, шт.	Из них			
		фертильных	МС	1/2 МС I	1/2 МС II
л. 150-21					
И-6	16	13	—	—	3
И-11	9	9	—	—	—
И-17	19	16	—	1	2
И-22	9	9	—	—	—
л. 150-34					
И-41	8	8	—	—	—
И-54	18	16	2	—	—
л. 150-49					
И-68	14	14	—	—	—
И-71	15	15	—	—	—

рильных зерен в различных соотношениях. Следует отметить, что регенеранты линии И-6 отличались тем, что пыльники у данных растений не растрескивались и содержали смесь обычной фертильной пыльцы, среди которой встречалось около 15 % стерильных зерен. В конце цветения пыльца у них высыпалась из пыльников, но была склеена в пол-линии, которые часто опадали целиком.

Как уже отмечалось, стерильность пыльцы, выявленная у регенерантов, может иметь разную природу. Установить тип стерильности любого источника возможно на основании изучения характера проявления признака в гибридных потомствах, полученных от скрещивания отдельных мужскостерильных растений с любым фертильным опылителем. В качестве такого опылителя целесообразнее всего использовать опылитель О-типа.

Анализ гибридных потомств F_1 и F_2 от скрещивания регенерантов И-6-3, И-6-5 и И-6-9 с растениями линии 15-47 показал, что все они представлены обычными фертильными формами (табл. 2). Это свидетельствует о модификационном характере возникшей стерильности данных растений.

Проявление признака стерильности в семенниках регенерантов линии И-17 позволило предположить ее цитоплазматическую обусловленность. Гибридное потомство F_1 от растения И-17-2 состояло из стерильных и полустерильных первого типа семенников в соотно-

шении, близком к 1:1. В результате насыщающего скрещивания увеличилось количество стерильных форм, что подтверждает цитоплазматическую природу стерильности пыльцы.

Гибридные потомства F_1 растений-регенерантов И-17-3 и И-17-7, которые по фенотипу были отнесены к полустерильным второго типа, содержали стерильные и полустерильные растения обоих типов в соотношении, близком к теоретически ожидаемому. В результате беккроссного скрещивания мужскостерильных растений из этого поколения с тем же опылителем увеличилось количество стерильных растений за счет уменьшения доли полустерильных форм. Однако, анализируя характер расщепления их потомства, следует предположить, что в качестве материнских форм в этом скрещивании были использованы растения, гетерозиготные по гену Z. Принято считать, что такие биотипы фенотипически не отличаются от полностью стерильных [24].

Среди регенерантов линии И-54 отмечено два стерильных растения. Одно из этих растений имело полулистовую форму с единичными цветками и в дальнейшую работу не включалось. Поколение F_1 , полученное от другого семенника (И-54-1), состояло только из фертильных растений, что позволило предположить ядерный контроль стерильности [22]. Второе гибридное поколение состояло как из фертильных, так и стерильных растений в соотношении, близком к 3:1 соответственно, что подтвердило наше

предположение, поскольку ядерная стерильность свеклы контролируется одним рецессивным геном *a*.

Наличие в наших экспериментах регенеранта с генной мужской стерильностью, вероятно, можно объяснить мутацией ядерных генов, возникшей в результате продолжительного культивирования каллусной культуры *in vitro*.

Выделение среди изученных нами регенерантов форм с цитоплазматической мужской стерильностью можно объяснить двумя причинами. С одной стороны, это может быть связано с мутациями, затрагивающими митохондриальный геном. Установлено, что митохондриальный геном растений свеклы со стерильной (S) и нормальной (N) цитоплазмой отличается как по организации основной митохондриальной ДНК, так и по набору плазмидоподобных миникольцев «а», «b», «с», «d» [25]. В митохондриях S-цитоплазмы содержится только миникольцо «а», а митохондрии N-ци-

топлазмы содержат не менее двух плазмид. Использование молекулярных методов для идентификации типов цитоплазмы показало, что отличия основного митохондриального генома у растений с N- и S-цитоплазмами связано с рекомбинационными перестройками, затрагивающими области генов *cob* (апоцитохром b), *cox II* (вторая субъединица цитохромоксидазы C), *atpA* и *atp6* (α и 6-субъединицы F_1F_0 АТФ-азного комплекса [26], *nd1* (нитратдегидрогеназа) [27], *rrn 26* (26S рибосомная РНК), *rps3* и *orf324* [28].

У свеклы преобразования митохондриального генома были выявлены как в каллусных культурах [29], так и у индуцированных регенерантов [27, 30]. Значительные изменения митохондриальной ДНК, связанные с организацией генов *atpA* и *atp6*, обнаружены в процессе длительного культивирования каллусных культур, полученных от диплоидных мужско-стерильной и фертильной форм [29]. У муж-

Таблица 2
Характер наследования стерильности у растений-регенерантов сахарной свеклы

№ регенеранта	Фенотип исходного растения	Генерация	Количество изученных растений, шт.	Соотношение фенотипов растений, шт.				Теоретически ожидаемое расщепление растений, шт.				χ^2	Предполагаемые генотипы
				MC	1/2 MC I	1/2 MC II	Фертильные	MC	1/2 MC I	1/2 MC II	Фертильные		
И-6-3	1/2 MC II	F_1	54	—	—	—	54						
		F_2	68	—	—	—	68						
И-6-5	1/2 MC II	F_1	38	—	—	—	38						
		F_2	52	—	—	—	52						
И-6-9	1/2 MC II	F_1	42	—	—	—	42						
		F_2	31	—	—	—	31						
И-17-2	1/2 MC I	F_1	36	15	21	—	—	18	18	0	—	1,000	$SXxzz \times Nxxzz$
		$F_1 BC_1$	98	69	29	—	—	73,5	24,5	0	—	1,102	$Sxxzz \times Nxxzz$
И-17-3	1/2 MC II	F_1	67	13	32	22	—	16,75	33,5	16,75	—	2,551	$SXxZz \times Nxxzz$
		$F_1 BC_1$	83	45	35	3	—	41,5	41,5	0	—	1,313	$SxxZz \times Nxxzz$
И-17-7	1/2 MC II	F_1	69	11	39	19	—	17,25	34,5	17,25	—	3,027	$SXxZz \times Nxxzz$
		$F_1 BC_1$	107	64	43	—	—	53,5	53,5	0	—	4,120	$SxxZz \times Nxxzz$
И-54-1	MC	F_1	43	—	—	—	43						$Naa \times NAA$
		F_2	97	19	—	—	78	24,25	—	—	72,75	1,514	$NAA \times NAA$

Примечание. $\chi^2_{\text{теор.}} = 6,0$ (при $P = 0,95$).

скостерильного генотипа показано наличие дополнительного фрагмента 3,9 т.п.н. ДНК после гибридизации с *atp6* и 7,9 т.п.н. — после гибридизации с *atp4*. У фертильного генотипа изменчивость митохондриальной ДНК характеризовалась отсутствием фрагмента 2,1 т.п.н. после зондирования с *atp6*.

Реорганизация генома митохондрий была отмечена у одного из 30 растений, регенерированных из каллуса, который получен от ЦМС — линии сахарной свеклы [30]. У соматоклона исчезли рестрикционные фрагменты, характерные для S-цитоплазмы, и появились новые, присущие N-цитоплазме. В другом случае у одного из восьми изученных регенерантов, полученных от ЦМС линии сахарной свеклы, также была обнаружена новая организация митохондриального генома, которая, однако, не привела к потере стерильности [27]. Следует отметить, что причины изменчивости митохондриального генома у регенерантов свеклы, полученных в условиях *in vitro*, а также у регенерантов других растений до конца не известны.

Вместе с тем не исключена возможность того, что растение инбредной линии 150—21, из которой индуцирована каллусная линия И-17, уже имело S-цитоплазму. Установлено [31], что частота встречаемости растений, имеющих S-цитоплазму, среди инбредных линий свеклы составляет около 6 %. Возможно, что во время пассирования произошла мутация только ядерных генов, контролирующих цитоплазматическую мужскую стерильность. В то же время можно предположить, что исходное растение линии 150—21 имело рецессивные ядерные гены *x* или *z* в гомозиготном состоянии и N-цитоплазму, которая под влиянием гена-мутатора конвертировалась в S-форму. Высказано предположение, что у сахарной свеклы одной из возможных причин конверсии N-цитоплазмы в S-цитоплазму может быть активация ядерного гена — мутатора *Mut* [32]. Не исключена возможность того, что изменение типа цитоплазмы в культуре *in vitro* связано с действием этого гена.

Таким образом, выявлена соматоклональная изменчивость растений-регенерантов сахарной свеклы по признаку стерильности пыльцы. Показано, что мужская стерильность полу-

ченных в данном эксперименте регенерантов имеет как генетическую, так и эпигенетическую природу.

SUMMARY. The nature of pollen sterility in sugarbeet regenerated plants obtained from callus cultures of inbred lines has been investigated. It has been shown that detected male sterility of plants can be caused both by epigenetic and mutation factors. The forms with cytoplasmic and nuclear sterility have been selected.

РЕЗЮМЕ. Досліджено природу стерильності рослин-регенерантів цукрових буряків, отриманих з калусних культур інбредних ліній. Показано, що у більшості випадків чоловіча стерильність, яка виникає у регенерантів, обумовлена епігенетичними факторами і має модифікаційний характер. Поряд з цим відзначені і мутаційні зміни — виділено форми з цитоплазматичною та ядерною стерильністю.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — **60**. — P. 197–214.
2. Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **43**. — P. 179–188.
3. Редько В.В. Особливості онтогенезу та формування продуктивності цукрових буряків і соняшника. — К.: УкрІНТЕІ, 1994. — 140 с.
4. Зубенко В.Ф., Ильенко И.И., Редько В.В., Редько В.И. Селекция форм сахарной свеклы с повышенной продуктивностью в условиях культуры *in vitro* // Докл. ВАСХНИЛ. — 1987. — № 11. — С. 13–15.
5. De Greef W., Jacobs M. In vitro culture of the sugar beet: description of a cell line with high regeneration capacity // *Plant Sci Lett.* — 1979. — **17**. — P. 55–61.
6. Yu M. Observation on callus induction and somaclonal variation in beet species // *Genetics.* — 1987. — **116**, № 1. — P. 3–10.
7. Бормотов В.Е., Свирицкая А.М. Соматоклональная изменчивость растений сахарной свеклы // Всесоюз. конф. по генетике сомат. клеток в культуре, посвящен. памяти А.И. Шاپиро: Тез. докл. (Новосибирск, 13–15 окт. 1989). — Новосибирск, 1989. — С. 12.
8. Редько В.И., Недяк Т.М., Драгунова О.К., Дубін О.В. Калусогенез і соматоклональна мінливість у цукрових буряків // 36. наук. пр. ІЦБ. — К., 2000. — Вип. 2, кн. 1. — С. 138–144.
9. Ильенко И.И., Яворская Т.К., Бех Н.С., Горбатюк Я.В. Морфологическая и биохимическая характеристика соматоклональных вариантов сахарной свеклы // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. — М.: Агропромиздат, 1989. — С. 49–54.

10. Muntali M., Newbury H., Ford-Lloyd R. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD // Plant Cell Repts. — 1996. — 15, № 7. — P. 474–478.
11. Shirzadegan M., Palmer J.D., Christey M., Earle E.D. Patterns of mitochondrial DNA instability in *Brassica campestris* cultured cells // Plant Mol. Biol. — 1991. — 16. — P. 21–37.
12. De Verno L.L., Charest P.J., Bonen L. Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix* // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 88. — P. 727–733.
13. Dorfel P., Weihe A., Knosche R., Börner T. Mitochondrial DNA of *Chenopodium album* (L.): a comparison of leaves and suspension cultures // Curr. Genet. — 1989. — 16. — P. 375–380.
14. Ling D.H., Ma Z.R., Chen M.F. et al. Somaclonal male sterile mutants and their expression in indica rice // Rice Genetics : Proc. Second Intern. Rice Genet. Symp. — IRRI, 1991. — P. 295–303.
15. Earle E.D., Gracen V.E. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue culture // Tissue Cult. Forest and Agr. : Proc. 3rd Tenn. Symp. Plant Cell and Tissue Cult. Knoxville, Tennessee. — New York; London, 1985. — P. 139–152.
16. Elkonin L.A., Gudova T.N., Ishin A.G. Inheritance of male sterility mutations induced in haploid sorghum tissue culture // Euphytica. — 1994. — 80. — P. 111–118.
17. Rogers R., Smith M., Cowen M. In vitro production of male sterile *Zinnia elegans* // Euphytica. — 1992. — 61, № 3. — P. 217–223.
18. Редько В.И., Ильенко И.И., Редько В.В. Соматическая изменчивость сахарной свеклы в культуре in vitro // Материалы Всесоюз. науч. конф. по с.-х. биотехнологии : Тез. докл. (Целиноград, 25–28 июля, 1991 г.) — Целиноград, 1991. — С. 23–24.
19. Doley W.P., Saunders G.W. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole leaf explants in some sugar beet (*Beta vulgaris* L.) populations // Plant Cell Rep. — 1989. — 8, № 4. — P. 222–225.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473–497.
21. Лялько И.И. Морфологическая мутация сахарной свеклы «опушенность листовых пластинок» как маркер закрепителей стерильности // Цитология и генетика. — 1999. — 33, № 3. — С. 47–51.
22. Owen F. V. Male sterility in sugar beets by complementary effects of cytoplasmic and Mendelian inheritance // Amer. J. Bot. — 1942. — 29, № 8. — P. 622–692.
23. Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. — Минск : Выш. шк., 1974. — 448 с.
24. Балков И.Я. ЦМС сахарной свеклы. — М.: Агропромиздат, 1990. — 239 с.
25. Powling A. Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugarbeet with normal and sterile cytoplasmas // Mol. Gen. Genet. — 1981. — 183. — P. 82–84.
26. Dudareva N.A., Veprev S.G., Popovsky A.V. et al. Highrate spontaneous reversion to cytoplasmic male sterility in sugar beet: a characterization of the mitochondrial genomes // Theor. Appl. Genet. — 1990. — 79. — P. 817–824.
27. Dikalova A.E., Dudareva N.A., Kubalakova M., Salganik R.I. Rearrangement in the sugar beet mitochondrial DNA induced by cell suspension, callus cultures and regeneration // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86, № 6. — P. 699–704.
28. Kubo T., Nishizawa S., Mikami T. Alteration in organization and transcription of the mitochondrial genome of cytoplasmic male sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Mol. Gen. Genet. — 1999. — № 2. — P. 283–290.
29. Sadoch Z., Majewska-Sawka A., Jazdzewska E., Niklas A. Changes in sugar beet mitochondrial DNA induced during callus stage // Plant Breed. — 2000. — 119, № 2. — P. 107–110.
30. Brears T., Ciirtis G.J., Lonsdale D.M. A specific rearrangement of mitochondrial DNA induced by tissue culture // Theor. Appl. Genet. — 1989. — 77. — P. 620–624.
31. Мглинец А.В., Вепрев С.Г., Малецкий С.И. Принципы и методы создания ЦМС аналогов инбредных линий сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Каталог коллекции // Генетические коллекции растений. Вып. 3. — Новосибирск / ИГиГ СО РАН, 1995. — С. 229–249.
32. Аульченко Ю.С., Вепрев С.Г., Аксенович Т.И. Изменение типа цитоплазмы сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) при инбридинге. 2. Сегрегационный анализ родословной // Генетика. — 1997. — 33, № 7. — С. 943–950.

Поступила 12.02.04