

Особенности регенерации растений инбредных линий сахарной свеклы в культуре *in vitro*

Т. В. Чугункова, О. В. Дубровная

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
252022, Киев, ул. Васильковская, 31/17

Определены оптимальные условия культуры тканей in vitro и ряд биотехнологических приемов для индукции образования побегов из эксплантов инбредных линий сахарной свеклы. Цитогенетический анализ растений-регенерантов, полученных из каллусных культур, выявил у них различия по плоидности и уровню хромосомных aberrаций.

Введение. Использование клеточных технологий для тиражирования растений с маркерными либо хозяйственно полезными признаками базируется на изучении регенерационной способности вводимых в культуру генотипов растений и их строгой цитогенетической характеристике. Затруднения в получении генетически однородных растений-регенерантов могут быть существенным фактором, ограничивающим широкое применение микроклонального размножения в практике. Кроме того, использование биотехнологических приемов лимитируется различной регенерационной способностью вводимых в культуру генотипов, нестабильностью процесса морфогенеза и, как следствие, затруднениями в получении регенерантов.

Для повышения эффективности регенерации сахарной свеклы использовали различные способы оптимизации условий культивирования. В частности, применяли регенерационные среды, где регуляторами роста служили цитокинины, чаще всего, БАП — отдельно или в сочетании с одним из ауксинов [1—3]. На частоту органогенеза существенное влияние оказывали физические факторы. Наиболее частотой оказалась температура 31 °С. Высокую частоту индукции каллуса отмечали в темноте [4].

Успешная регенерация побегов была получена на различающихся по минеральному составу и органическим добавкам средах. Использовали разные типы эксплантов и одно- или двуступенчатый путь индукции побегообразования [5—7]. Регене-

рация растений происходила непосредственно из ткани экспланта или через соматический эмбриогенез [8, 9].

Прямая регенерация в наибольшей степени гарантирует генетическую идентичность регенерантов с исходным материалом. Это особенно важно при необходимости сохранения и тиражирования уникального либо ценного генетического материала. Однородность регенерантов обеспечивается их происхождением непосредственно из диплоидных клеток экспланта. Образование растений-регенерантов из каллусной ткани не исключает возможности обнаружения цитологически разнородного потомства. В таком случае возникает необходимость цитогенетического контроля растений, полученных *in vitro*.

Нашей задачей было выявление и использование факторов, способствующих максимальной регенерации растений сахарной свеклы в культуре *in vitro*, а также цитогенетический анализ полученных растений-регенерантов.

Материалы и методы. Для введения в стерильную культуру сахарной свеклы использовали семена 12 генетически маркированных инбредных линий. Проросшие свеклы выращивали на среде МС-2 без фитогормонов и на среде RV [7]. Эксплантами служили черешок с листом культивируемых *in vitro* растений. Экспланты длиной 10—30 мм высаживали в чашки Петри с 25—30 мл питательной среды. Для индукции формирования побегов и каллусов были использованы шесть вариантов регенерационных сред [2, 3, 6, 7, 10, 11]. Экспериментальный

материал выращивали на свету с 16-ч фотопериодом при температуре 26 ± 2 °С. Частоту пролиферации микророзеток и каллуса учитывали как соотношение числа эксплантов с розетками либо с каллусом к общему числу высаженных эксплантов. Побеги, полученные из разных серий опытов, далее доращивали на минеральной среде МС со сниженным процентом (1 %) сахарозы. Для укоренения подросших побегов к минеральной среде добавляли один из ауксинов: ИУК, НУК, ИМК. Наилучшие результаты были получены на среде ДС-55, содержащей ИМК (МАЭ по МС + 5,0 ИМК). Хорошо укоренившиеся растения переносили в почву. Цитогенетический анализ растений-регенерантов осуществляли в меристематических клетках молодых листочков по стандартной методике давленных препаратов [12].

Результаты и обсуждение. Для определения плоидности в каждом растении изучали по 30—40 метафазных пластинок. Для создания оптимальных условий индукции образования побегов в культуре ткани сахарной свеклы было изучено влияние регенерационных сред, типа экспланта, длительности пассирования на процессы микроразмножения.

При испытании нескольких вариантов регенерационных сред было обнаружено, что все они способствовали пролиферации каллуса. Каллусообразующий ответ зависел от генотипа растения, состава питательной среды, типа экспланта. В табл. 1 представлены данные о каллусообразовании на эксплантах нескольких генотипов сахарной свеклы, высаженных на среды, описанные в работе Сандерса и соавт. («С») [11] и Фрейда и соавт. («RV») [7], различающиеся по соотношению регуляторов роста. Однако регенерация растений из каллуса проходила недостаточно интенсивно.

Нами были проведены эксперименты по получению прямой регенерации растений из тканей экспланта. Пересадка эксплантов из листа, черешка либо листа вместе с черешком показала, что наиболее подходящими для прямой регенерации оказались экспланты из листа с черешком, высаженные на среду «RV». Процент регенерации побегов из эксплантов листа с черешком значительно увеличивался в сравнении с отдельно взятым черешком или листом (табл. 2).

Наблюдения показали, что частота регенерации зависела также от физиолого-морфологического состояния пробирочного растения. Экспланты из растений с удлиненными, матового цвета или витрифицированными листьями не регенерировали.

Изучена зависимость регенерационной способности от длительности выдерживания пробирочных растений на питательной среде. Было показано, что трехразовое пассирование растений *in vitro* является оптимальным для реализации их регенерационного потенциала. Так, подсчет частоты регенерации побегов выявил, что выдерживание растений на регенерационной среде в течение одного пассажа (15 с) обеспечивало регенерацию микророзеток только на уровне 21,4 %, в то время как срок в три пассажа повышал частоту регенерации в 4 раза (табл. 3).

Более длительное выращивание исходных растений на среде «RV» не только снижало частоту регенерации, но и приводило к витрификации и прекращению роста.

Следует отметить, что размножение растений можно значительно ускорить, исключая культуру эксплантов и получая микророзетки на самом материнском растении, прошедшем трехразовое пассирование на регенерационной среде. Аналогичные

Таблица 1

Частота каллусообразования на эксплантах сахарной свеклы, % (один месяц после начала культивирования)

| Линия | Среда «С» [11] | | Среда «RV» [7] | |
|-------|----------------|----------|----------------|---------|
| | Лист | Черешок | Лист | Черешок |
| 2 | 100,0*** | 100,0*** | 100,0*** | 84,0*** |
| 3 | 44,0* | 100,0* | 88,8* | 85,0* |
| 6 | 97,6** | 73,3** | 66,6* | 90,0* |
| 8 | 90,0** | 0,0 | 60,0*** | 38,8** |
| 10 | 50,0*** | 87,5** | 64,7*** | 68,3*** |

* Слабая; ** средняя; *** сильная пролиферация каллуса.

Таблица 2
Регенерация побегов из эксплантов разного типа

| Тип экспланты | Количество высаженных эксплантов | Количество регенерирующих эксплантов | Регенерация, % |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| Черешок | 60 | 6 | 10,00±3,87 |
| Лист | 82 | 2 | 2,43±1,70 |
| Лист с черешком | 98 | 44 | 44,89±4,79 |

Таблица 3
Частота образования микророзеток в зависимости от длительности пассирования пробирочных растений на среде PV

| Число пассажей | Количество высаженных эксплантов | Количество регенерирующих эксплантов | Регенерация, % |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| 1 | 56 | 12 | 21,43±5,48 |
| 3 | 62 | 54 | 87,19±4,24 |
| 5—6 | 54 | 30 | 55,58±6,76 |

Таблица 4
Частота регенерации микророзеток из эксплантов инбредных линий сахарной свеклы на среде RV [7]

| Номер линии | Исходное количество эксплантов | Количество регенерирующих эксплантов | Регенерация, % |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| 1 | 50 | 23 | 46,00±7,05 |
| 2 | 47 | 18 | 38,38±7,10 |
| 3 | 50 | 25 | 50,00±7,07 |
| 4 | 60 | 30 | 50,00±6,45 |
| 5 | 60 | 19 | 31,61±6,00 |
| 6 | 60 | 13 | 21,65±5,32 |
| 7 | 59 | 27 | 45,73±6,48 |
| 8 | 58 | 29 | 50,00±6,56 |
| 9 | 49 | 27 | 55,13±7,10 |
| 10 | 57 | 29 | 55,32±6,58 |
| 11 | 58 | 16 | 27,59±7,10 |
| 12 | 50 | 22 | 44,91±7,03 |

данные получены нами и при скрининге разных генотипов кормовой свеклы [13].

Прямая регенерация микророзеток из эксплантов разных самоопыленных линий сахарной свеклы варьировала в зависимости от генотипа линии (табл. 4). Следует отметить, что изучаемые само-

опыленные линии четвертого поколения инбридинга отличались друг от друга по уровню общей комбинационной способности (ОКС). Сравнение процессов прямой регенерации у линий с высокой [3, 4, 8] и низкой [5, 6, 11] ОКС выявило тенденцию к повышению частоты регенерации рас-

тений из эксплантов, полученных от линий с высокой по отношению к линиям с низкой ОКС. Процент регенерации форм с высокой ОКС колебался в пределах 50 %, в то время как у линий с низкой ОКС он не превышал 32 %.

Изучение регенерационной способности эксплантов, полученных от индивидуальных растений, показало, что она может варьировать в довольно значительных пределах. Так, анализ отдельных растений линии, полученной от сорта Индустриальная, выявил, что их регенерационный потенциал может изменяться в достаточно широких пределах — от 20 до 90 %. Среди них удалось выделить два растения со способностью стабильно образовывать побеги с частотой 70—90 %.

Цитогенетический анализ растений, полученных методом прямой регенерации из тканей экспланта, не выявил существенных отличий по хромосомному составу между регенерантами и исходными растениями. Все растения-регенеранты оказались диплоидами и имели 18 хромосом. В то же время среди растений-регенерантов, образовавшихся из каллусных культур, наряду с диплоидными встречались гаплоидные, полиплоидные, а также анеуплоидные растения с разным числом хро-

мосом (табл. 5). Аналогичные данные получены и при микроклональном размножении растений других культур [14—16].

Преобладающее число растений-регенерантов имело 18 хромосом, что соответствует диплоидному набору сахарной свеклы. Наряду с диплоидами у изученных нами линий с низкой ОКС выявлены единичные гаплоидные растения, а также сравнительно большое количество анеуплоидных регенерантов. У линий с высокой ОКС гаплоидные регенеранты практически не встречались, при этом отмечено появление отдельных полиплоидных растений с триплоидным и тетраплоидным числом хромосом.

Полиплоидные растения были обнаружены и среди растений-регенерантов других линий. Анеуплоидные растения-регенеранты с околодиплоидным числом хромосом обнаружены при эмбриогенезе из каллусных культур практически всех изученных линий. У растений-регенерантов отмечен достаточно высокий уровень хромосомных aberrаций — от 1,2 до 6,7 %. Частота хромосомных aberrаций в клетках апикальной меристемы листа диплоидных растений-регенерантов у линий с низкой ОКС достигала 6,7%, в то время как у линий с высокой

Таблица 5
Цитогенетический анализ растений-регенерантов, полученных из каллусных культур сахарной свеклы

| Номер линии | Всего изучено растений* | Количество растений | | | | | Частота нарушений митоза в апикальной меристеме диплоидных растений-регенерантов, % | | | | |
|-------------|-------------------------|---------------------|----|----|----|--------------|---|------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| | | n | 2n | 3n | 4n | Анеуплоидные | Всего изучено анафиз | Количество анафаз с нарушениями, % | Из них | | |
| | | | | | | | | | отставших хромосом, % | мостов, % | прочих, % |
| 1 | 51 | — | 48 | 1 | 1 | 1 | 183 | 3,2 | 1,6 | 1,6 | — |
| 2 | 51 | 1 | 45 | 1 | 2 | 2 | 157 | 3,8 | 1,3 | 1,9 | 0,6 |
| 3 | 70 | — | 64 | 1 | 2 | 1 | 162 | 1,9 | — | 1,9 | — |
| 4 | 65 | — | 61 | 1 | 2 | 1 | 177 | 2,3 | 0,6 | 1,7 | — |
| 5 | 40 | 2 | 35 | — | — | 3 | 143 | 5,6 | 2,1 | 2,8 | 0,7 |
| 6 | 38 | 1 | 33 | — | — | 4 | 178 | 6,7 | 2,8 | 2,2 | 1,7 |
| 7 | 54 | 1 | 51 | — | 1 | 1 | 183 | 3,3 | 1,6 | 1,6 | 1,2 |
| 8 | 62 | — | 60 | — | 2 | — | 170 | 1,2 | 1,2 | — | — |
| 9 | 66 | 1 | 62 | — | 2 | 1 | 191 | 2,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 |
| 10 | 60 | — | 56 | — | 3 | 1 | 177 | 1,7 | 1,1 | — | 0,6 |
| 11 | 43 | 1 | 39 | — | — | 3 | 161 | 5,6 | 3,2 | 1,2 | 1,2 |
| 12 | 63 | 1 | 60 | — | 1 | 1 | 152 | 4,6 | 2,0 | 2,0 | 0,6 |

* В каждом растении изучали по 30—40 метафаз.

ОКС она была сравнительно ниже — на уровне 2—3 %.

Аберрации хромосом представлены единичными мостами и фрагментами. Отмечены также нарушения веретена деления в виде отставания хромосом. Выявлялись отдельные клетки с микроядрами, трехполюсными и асимметричными митозами.

Таким образом, была подтверждена универсальность среды «RV», позволяющей в условиях *in vitro* получать растения-регенеранты из эксплантов различных генотипов сахарной свеклы. Показано преимущество выбора в качестве экспланта листа с черешком для прямой регенерации растений сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Усовершенствована технология прямой регенерации, что позволило повысить частоту пролиферации микророзеток до 60—80 %. Выявлена тенденция к повышению частоты регенерации микророзеток из эксплантов самоопыленных линий с высокой комбинационной способностью в сравнении с формами, имеющими низкую ОКС. Цитогенетический анализ растений-регенерантов, полученных из каллусных культур, выявил растения разного уровня плоидности и отличия в частоте хромосомных нарушений у линий с различной комбинационной способностью.

Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Г. Н. Юрковой за участие в проведении эксперимента.

Т. В. Чугункова, О. В. Дубровная

Особливості регенерації рослин інбредних ліній цукрового буряка в культурі *in vitro*

Резюме

Визначено оптимальні умови культури тканин *in vitro* та ряд біотехнологічних прийомів для індукції утворення пагонів із експлантів інбредних ліній цукрового буряка. Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів, отриманих із калусних культур, виявив у них відміни за плоїдністю та рівнем хромосомних аберацій.

T. V. Chugunkova, O. V. Dubrovnyaya

The peculiarities of regeneration of plants of inbred lines of sugar beet cultured *in vitro*

Summary

Regenerated plants were obtained from cultures of petiole with leaf and calluses of the inbred lines of sugar beet. The reliable and reproducible technology for receiving high frequency shoot regeneration was worked out.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бормотов В. Е., Долбик А. М. Каллусообразование на

листовых эксплантах инбредных линий сахарной свеклы // Тез. докл. Междунар. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». — Новосибирск, 1988. — С. 17.

2. Бормотов В. В., Свирицкая А. М. Соматоклональная изменчивость растений сахарной свеклы // Тез. докл. Всесоюз. конф. по генетике сомат. клеток в культуре, посвященной памяти Н. И. Шапиро. — Звенигород, 1989. — С. 102.
3. Жужжалова Т. П., Знаменская В. В. Влияние генотипа и питательной среды на процесс микроразмножения сахарной свеклы // Тез. докл. Междунар. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». — Новосибирск, 1990. — С. 159—160.
4. De Greef W., Jacobs M. *In vitro* of the sugar beet—description of a cell line with high regeneration capacity // Plant Sci. Lett.—1979.—17, N 1.—P. 55—61.
5. Detrez C., Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Noreel B. S. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro* // J. Exp. Bot.—1988.—39, N 204.—P. 917—926.
6. 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, N 4.—P. 222—225.
7. Freytag A. H., Anand S. C., Rao-Arelli A. P., Owens L. D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro* // Ibid.—1988.—7, N 1.—P. 30—34.
8. Kubalukova M. Somatic embryogenesis and cytoplasmic sterility in *Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* // Biol. Plant.—1990.—32, N 6.—P. 414—419.
9. Mikami T., Jana J., Kinoshita T. Plant regeneration from leaf discs of sugar beet and wild beets // Proc. Jap. Soc. Sugarbeet Technol.—1988.—30.—P. 108—112.
10. Mikami T., Sudor R., Nagao E., Kinoshita T. Genotypic variation in the *in vitro* morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *B. maritima* L. // Euphytica.—1989.—40, N 3.—P. 271—273.
11. Saunders J. W., Doley W. P. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and a somaclonal variant for *in vitro* behavior // J. Plant Physiol.—1986.—124, N 5.—P. 473—479.
12. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений.—М.: Колос, 1980.—С. 168—170.
13. Чугункова Т. В., Юркова Г. Н., Розумная Л. Ф., Шевцов И. А. Регенерационная способность сортов и селекционных образцов кормовой свеклы // Физиология и биохимия культурных растений.—1993.—№ 6.—С. 54—60.
14. Cavalini A., Cramonini B., Lupi M. Cytological study of callus and regeneration plantlets of *Bellevalia romana* L. // Protoplasma.—1986.—132, N 1—2.—P. 58—63.
15. Linacero R., Vazquez A. Cytogenetic variation in rye regenerated plants and their progeny // Genome.—1992.—35, N 3.—С. 428—430.
16. Cellarova E., Rychlova M., Honcariv R. Cytological instability in *Matricaria chamomilla* L. tissue cultures // Herba hung.—1984.—24, N 3.—P. 37—51.

УДК 581.143.6+633.413.
Поступила в редакцию 11.12.96