

УДК 581.1:575

ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ СТВОРЕННЯ НОВИХ ФОРМ БУРЯКІВ І ПШЕНИЦІ

Т.В. ЧУГУНКОВА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Представлено огляд досліджень та головні досягнення співробітників відділу генетичних основ гетерозису Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Основну увагу приділено генетичним, цитологічним, молекулярно-генетичним та біотехнологічним основам створення нових форм буряків і пшениці.

Ключові слова: генетика, гетерозис, цитогенетика, біотехнологія, стреси, геном.

В останні десятиліття робота відділу генетичних основ гетерозису була спрямована на розробку генетичних, цитогенетичних, фізіолого-біохімічних, біотехнологічних основ створення, комплексного вивчення селекційного матеріалу буряків і пшениці, пошуку генетичних критеріїв його оцінки. Велика увага приділялась теоретичному обґрунтуванню й практичному використанню біотехнологічних методів для отримання рослин, стійких до біотичних і абіотичних стресових чинників середовища. Нині дослідження співробітників відділу спрямовані на з'ясування впливу біологічно активних речовин, токсинів збудників хвороб на стійкість і продуктивність рослин ярої та озимої м'якої пшениці. Проводяться молекулярно-генетичні дослідження клітинних ліній і рослин-регенерантів.

Початок наукової роботи відділу пов'язаний зі створенням колекції самозапильних ліній, комплексним вивченням селекційного матеріалу цукрових і кормових буряків. Гомозиготні інбредні лінії отримували багаторазовим примусовим самозапиленням рослин. Їх створювали упродовж кількох десятиліть, закладали на рослинах одно- й багатонасінних сортів цукрових буряків вітчизняної та закордонної селекції, міжсорткових гібридах і селекційних зразках. Щорічно для примусового самозапилення висаджували по кілька тисяч рослин. Теоретичні й практичні розробки в галузі інбридингу у рослин узагальнені в монографії [28].

Науковці відділу розробили оригінальні методики отримання самозапильних ліній цукрових буряків, їх пришвидшеного розмноження. Схрещуванням ліній виведено високопродуктивні гетерозисні гібриди буряків. Загальну комбінаційну здатність інбредних ліній визначали методом топ-кросу, для виявлення ліній з високою специфічною комбінаційною здатністю їх схрещували з високопродуктивними гібридами. Встановлено прямий зв'язок між рівнем гетерозисного ефекту і продуктивністю самозапильних ліній та можливість прогнозування гетерозису на початкових етапах розвитку рослин. У виробничих умовах проводилось насінництво створених у відділі сортів, гібридів цукрових і кормових буряків, розробляли та впроваджували індустриальні технології їх вирощування [29, 31].

У зв'язку з розробкою теоретичних питань гетерозису, його практичним застосуванням при виведенні нових продуктивних гібридів буряків на диплоїдному і триплоїдному рівнях досліджено цитоплазматичну чоловічу стерильність [7, 8]. У результаті багаторічної роботи створено й передано до Національного центру генетичних ресурсів рослин України (м. Харків) стерильну форму КС 99, яка поєднує ознаки стабільного прояву стерильності й обмеженого росту квітконосних пагонів. Широкий асортимент самоzapильних ліній із різним рівнем комбінаційної здатності проаналізовано на наявність закріплювачів цитоплазматичної чоловічої стерильності, виділено перспективні форми [17]. У результаті розроблено методи отримання закріплювачів стерильності, які ґрунтуються на використанні форм, маркованих домінантним сигнальним геном, що спрощує та скорочує селекційний процес, підвищує його ефективність [15].

Отримано тетраплоїдні форми цукрових і кормових буряків. Встановлено цитогенетичні причини зниження фертильності пилку, плодючості експериментальних поліплоїдів [30]. Постійний цитологічний контроль за рівнем плоїдності рослин, характером перебігу мейозу та якістю пилку дав змогу стабілізувати й поліпшити штучно створену популяцію багатонасінних тетраплоїдних запилювачів [25]. Виділено тетраплоїдні запилювачі з високою якістю пилку для гетерозисної селекції буряків на триплоїдному рівні. Створений тетраплоїдний запилювач 4хММ переданий до Національного центру генетичних ресурсів рослин України.

Відомо, що генетичний ефект інбридингу пов'язаний з гомозиготністю кожної інбредної лінії, а також із можливістю виділити низку генотипів, які несуть як цінні, так і негативні ознаки. У результаті генетичних досліджень створеної у відділі колекції самоzapильних ліній буряків знайдено нові мутантні морфологічні ознаки, що виявляються на різних етапах онтогенезу рослин [13, 16]. Отримані константні лінії з опушеною, гладенькою, парусною і кучерявою поверхнями листка, з прямостоячою, розлогою і сланкою розетками, з овальною, ланцето-подібною формами листкової пластинки, з довгими і короткими черешками аналізували на можливість їх використання в генетиці та селекції буряків [14]. Виділено моногенну домінантну ознаку культурних буряків — опушеність листкової пластинки, що контролюється локусом HL. У цукрових буряків виявлено серію множинних алелів цього локусу. Визначено, що опушеність листкової пластинки є чіткою маркерною ознакою при ідентифікації гібридів. Встановлено рецесивний характер успадковування ознаки, що контролює детермінантний характер росту квітконосних пагонів кормових буряків. Доведено ефективність її застосування для поліпшення якості насіння [9]. Для практичного використання морфогенетичних ознак у гетерозисній селекції буряків оцінено морфологічні й цитологічні особливості рослин самоzapильних ліній цукрових буряків з високим рівнем загальної комбінаційної здатності.

Велику увагу було приділено цитогенетичним дослідженням у зв'язку з проблемою гетерозису [27]. Вперше вивчено структуру й поліморфізм каріотипів інбредних ліній, гетерозисних гібридів буряків за використання диференційного забарвлення хромосом у мітозі. Проаналізовано хромомерну будову хромосом на пахітенній стадії мейозу. Досліджено особливості морфології та функціональної активності ядерцеутворювальних ділянок хромосом у сортів, гібридів, інбредних ліній із різною комбінаційною здатністю [12]. Вивчено мінливість розмірів і числа ядерць за інбридингу й гетерозису. Виявлено закономірності та по-

зитивний зв'язок інтенсивності проліферації клітин із продуктивністю рослин, особливості ядерно-цитоплазматичних взаємозв'язків у клітинах різних форм буряків. З'ясовано специфічні особливості структурно-функціональної організації генетичного апарату гібридних організмів та їх батьківських форм, що уможливило конкретизацію уявлення про механізми гетерозису на клітинному й клітинно-популяційному рівнях. Розроблено цитогенетичні основи прогнозування гетерозису, комбінаційної здатності ліній цукрових буряків [23].

Проблеми генетики, селекції буряків вирішували не лише традиційними, а й біотехнологічними методами. Важливим завданням є збереження унікальності мутантних форм і цінних генотипів буряків, отриманих гібридизацією *in vivo*, а також у культурі клітин і тканин *in vitro*. Розроблено методику мікроклонального розмноження різних генотипів буряків, оптимізовано поживні середовища для індукції морфогенезу. Запропоновано ефективну систему методичних прийомів отримання рослин-регенерантів буряків із калюсних культур, а також прямою регенерацією пагонів із тканин експлантатів [32]. Методом прямої регенерації мікророзеток з експлантатів черешка з листком репродуковано чистий генетично цінний селекційний матеріал, тиражовано рослини-регенеранти. Вдосконалена методика переведення рослин зі стерильних умов *in vitro* в умови *in vivo* забезпечила стабільне вирощування біотехнологічних рослин у польових умовах.

Поряд із традиційними генетико-селекційними методами виведення високопродуктивних сортів і гібридів буряків співробітники відділу застосовували біотехнологічні прийоми створення вихідного селекційного матеріалу [18]. З метою отримання форм, стійких до біотичних і абіотичних стресових чинників середовища, застосовували клітинну селекцію буряків. Виявлено стадії розвитку клітинних культур, на яких генетична мінливість калюсних клітин може бути максимальною й ефективно використаною для отримання генетично різноманітних рослин. У результаті клітинної селекції отримано калюсні лінії та рослини-регенеранти кормових буряків, стійкі до токсину збудника бактеріальної плямистості листків, хлоридного й сульфатного засолення. Показано перехресну стійкість цих ліній і до низьких температур. З'ясовано, що лінії, резистентні до одного стресового чинника, можуть виявляти комплексну стійкість до кількох стресових чинників. Створені рослинні форми перевірено на стійкість в умовах *in vitro* та *in vivo*. Згідно з отриманими результатами, клітинну селекцію та соматоклональну мінливість можна використовувати для розширення генетичного потенціалу рослин і створення нового вихідного матеріалу біотехнологічними методами [5].

Молекулярно-генетичними дослідженнями калюсних культур буряків із різною морфогенетичною активністю підтверджено, що утворення морфогенного калюсу супроводжується підвищенням рівня метилювання ДНК. Калюсні культури буряків із високим регенераційним потенціалом характеризувались переважанням у структурі клітинних популяцій диплоїдних клітин, низьким рівнем поліплоїдизації, відсутністю поліморфізму за спектрами низки ізоферментів. Особливістю неморфогенного калюсу є утворення в його клітинах надспіралізованих хромосом і конденсованого хроматину [10, 11].

Дослідження фізіологічно активних речовин як стимуляторів імунних відповідей організму має багаторічну історію. Екологічно безпечні біологічно активні речовини безпосередньо не знешкоджують патогени, а впливають на них через активування антипатогенних продуктів рос-

лин, забезпечують індуковану системну стійкість. Імуномодуляторами можуть бути речовини природного і синтетичного походження: полісахариди, глюкопротеїди, білки, продукти гідролізу хітину, жасмонати, саліцилати та ін. Нині накопичуються знання стосовно різних аспектів впливу біологічно активних речовин біогенної й абіогенної природи на рослинний організм, зокрема досліджуються механізми їх дії, виявляються можливості практичного використання для підвищення продуктивності і захисту рослин від хвороб [21, 22]. У відділі генетичних основ гетерозису роботи у цьому напрямі започатковані використанням екзогенного полісахариду, виділеного з бактерій роду *Pseudomonas*. Газорідинною хроматографією виявлено, що його вуглеводна частина містить глюкозу, рамнозу, ксилозу, галактозу та інші моносахариди, а також до 3 % білка. З'ясовано, що в разі обробки цим екзополісахаридом насіння буряків підвищується енергія його проростання та схожість. У польових умовах дія екзогенного полісахариду була пролонгованою і системною, забезпечувала захист рослин буряку від бактеріальної плямистості листків до кінця вегетації. Згідно з результатами досліджень, екзогенний полісахарид із *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* можна вважати неспецифічним індуктором імунітету, що захищає рослини буряку від комплексу хвороб: бактеріозу, церкоспорозу, вірусної жовтяниці. Доведено, що буряки, які виростили з насіння попередньо відібраних стійких форм, менш уражувались, ніж контрольні рослини [6].

Поряд із дослідженням дії екзополісахариду в умовах *in vivo* вивчено його вплив на розвиток клітинних культур, морфогенез, регенерацію, стійкість рослин-регенерантів в умовах *in vitro*. Всі випробувані концентрації стимулювали приріст маси калюсної тканини, подовжували тривалість пасажу. Збільшувався морфогенетичний потенціал тканин буряків, стійкість до бактеріозу рослин, отриманих методом прямої регенерації в культурі тканин [4, 20].

В останні роки фундаментальні й прикладні дослідження співробітників відділу спрямовані на вивчення важливої сільськогосподарської культури — пшениці, впливу на рослини озимої та ярої м'якої пшениці екзогенного полісахариду з бактерій роду *Pseudomonas*, хітозану різних концентрацій і різної молекулярної маси, мананів із пекарських і кормових дріжджів, їх композицій із рамноліпідом з бактерій роду *Pseudomonas*, механізм дії яких полягає в активуванні захисних реакцій рослин. Проаналізовано енергію проростання, ріст, розвиток, стійкість до бактеріальних і вірусних хвороб рослин пшениці після обробки насіння біологічно активними речовинами. Виявлено позитивну тенденцію порівняно з контролем до підвищення стійкості та врожайності рослин пшениці, оброблених різними композиціями мананів і рамноліпиду [24, 26]. Показано, що добавляння в поживне середовище дріжджового манану з *Candida maltosa* стимулює калусоутворення й морфогенез із експлантатів незрілих зародків пшениці. Активність калусоутворення в озимих і ярих сортів різна. Хітозан, основним компонентом якого є поліглюкози, сприяв приросту калюсної маси й розвитку клітинних ліній пшениці в разі добавляння його у поживне середовище [19].

Розроблено біотехнологію вирощування рослин м'якої пшениці, стійких до офіобольозної кореневої гнилі, комплекс біотехнологічних прийомів, удосконалено процес отримання рослин м'якої пшениці *de novo* із тканин вегетативних органів, підвищено регенераційну здатність калюсних культур, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. З'ясовано, що генотоксичний вплив метаболітів *G. gra-*

minis var. *tritici* на клітини калюсних культур виявляється у кластогенних пошкодженнях структури хромосом і призводить до загибелі клітин унаслідок некрозу. Встановлено, що стійкі до культурального фільтрату лінії характеризуються стабільно-гетерогенною структурою клітинних популяцій, сталим рівнем і подібним типом структурних перебудов хромосом. ISSR-методом аналізу ДНК у стійких до культурального фільтрату *G. graminis* var. *tritici* калюсних ліній пшениці виявлено зміни нуклеотидних послідовностей ДНК та специфічні ISSR-амплікони. Ці амплікони є також у стійких рослин-регенерантів R_0 і рослин R_1 , що може засвідчувати потенційну можливість їх використання як маркерів стійкості до офіобользу [1—3].

Загалом у науковій роботі відділу генетичних основ гетерозису на-полегливо впроваджуються сучасні біотехнології, розробляються прийоми і методи створення нових форм рослин, стійких до несприятливих чинників середовища. Поглиблюються фундаментальні молекулярно-генетичні, цитогенетичні дослідження, які уможливають аналіз геномів, хромосом у клітинних лініях і створюваних рослинних формах, на підставі чого можна прогнозувати особливості структурно-функціональної мінливості генетичного матеріалу рослин *Triticum aestivum* L.

1. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із різних типів експлантатів м'якої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 2. — С. 150—156.
2. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Селекція in vitro м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Там сьмо. — 2009. — **41**, № 4. — С. 314—320.
3. Бавол А.В., Дубровна О.В. Молекулярно-генетичний поліморфізм клітинних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, та регенерантів з них // Цитология і генетика. — 2009. — **43**, № 5. — С. 28—34.
4. Губанова Н.Я., Чугункова Т.В. Использование полисахаридного элиситора в исследованиях in vitro для повышения морфогенеза и устойчивости регенерантов свеклы к бактериозу // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — **38**, № 5. — С. 359—361.
5. Губанова Н.Я., Чугункова Т.В. Клітинна селекція буряку на стійкість до стресових факторів // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — **1**. — С. 590—595.
6. Губанова Н.Я., Чугункова Т.В., Розумна Л.Ф. Вплив полісахаридного еліситору на схожість насіння та стійкість до хвороб рослин буряків // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — **36**, № 6. — С. 478—484.
7. Дубровна О.В., Лялько І.І. Генетичні та молекулярно-генетичні аспекти чоловічої стерильності буряків // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — **8**, № 1. — С. 72—80.
8. Дубровна О.В., Лялько І.І. Сучасні уявлення про чоловічу стерильність буряків // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 5. — С. 380—392.
9. Дубровна О.В., Лялько І.І., Тищенко О.М. Генетика якісних ознак буряків. — К.: Логос, 2010. — 250 с.
10. Дубровная О.В., Тищенко Е.Н. Геномная изменчивость морфогенного и неморфогенного каллуса кормовой свеклы // Цитология и генетика. — 2003. — **32**, № 2. — С. 13—20.
11. Дубровная О.В., Тищенко Е.Н. Изменение уровня метилирования ДНК в культуре in vitro кормовой свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. — 2003. — **35**, № 5. — С. 434—440.
12. Дубровна О.В., Чугункова Т.В. Функціональна активність ядерцевих організаторів хромосом у інбредних ліній цукрового буряка // Цитология и генетика. — 1998. — **32**, № 2. — С. 13—20.
13. Лялько І.І., Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Шевцов І.А. Характер спадковості нових маркерних ознак листкового апарату цукрового буряка // Доп. НАН України. — 1999. — № 3. — С. 201—206.
14. Лялько І.І., Дубровна О.В. Використання морфогенетичних ознак в гетерозисній селекції буряків // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — **3**. — С. 48—55.
15. Лялько І.І., Дубровна О.В. Створення запилювача О-типу у кормових буряків за використання маркерної ознаки листкового апарату // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — **4**. — С. 229—235.

16. *Лялько И.И., Дубровная О.В., ЧуGUNKOBA Т.В.* Генетическая коллекция инбредных линий сахарной свеклы и возможности ее практического использования // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. — 2009. — **166**. — СПб.: ГНЦ РФ ВИР. — С. 404—410.
17. *Лялько И.И.* Использование маркерного признака опушенности листовой пластинки при создании закрепителей стерильности у сахарной свеклы // Цитология и генетика. — 1999. — **33**, № 4. — С. 9—16.
18. *ЧуGUNKOBA Т.В.* Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 6. — С. 509—515.
19. *ЧуGUNKOBA Т.В.* Вплив елісаторів на морфогенез та ростові процеси в культурі тканин in vitro // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. — К.: Логос, 2009. — **2**. — С. 557—563.
20. *ЧуGUNKOBA Т.В., Губанова Н.Я.* Індукована елісаторами стійкість регенерантів буряків до бактеріозу // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. — К.: Логос, 2007. — **2**. — С. 597—600.
21. *ЧуGUNKOBA Т.В., Губанова Н.Я.* Неспецифические элиситоры — модуляторы иммунных реакций растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 2005. — **37**, № 3. — С. 198—207.
22. *ЧуGUNKOBA Т.В., Дубровна О.В.* Елісатори — модифікатори імунних та ростових процесів у рослин in vivo та in vitro // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 6. — С. 480—491.
23. *ЧуGUNKOBA Т.В., Дубровна О.В., Лялько І.І.* Генетичні і цитогенетичні основи гетерозису у рослин. — К.: Логос, 2006. — 260 с.
24. *ЧуGUNKOBA Т.В., Коваленко О.Г.* Вплив дріжджового манану на проростання насіння м'якої пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — **7**, № 1. — С. 108—113.
25. *ЧуGUNKOBA Т.В., Лялько І.І., Дубровна О.В.* Цитогенетичні особливості тетраплоїдних запилювачів цукрових буряків // Цитология и генетика. — 2006. — **40**, № 1. — С. 37—41.
26. *ЧуGUNKOBA Т.В., Розумна Л.Ф.* Ріст, врожайність та стійкість рослин після обробки насіння елісаторами // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2010. — **8**. — С. 263—267.
27. *ЧуGUNKOBA Т.В.* Цитогенетические особенности свеклы при инбридинге и гетерозисе // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — **38**, № 2. — С. 153—162.
28. *Шевцов И.А.* Использование инбридинга у растений. — К.: Наук. думка, 1983. — 269 с.
29. *Шевцов И.А.* Проблемы гетерозиса и его использование для повышения продуктивности сахарной свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. — 1996. — **28**, № 3. — С. 156—165.
30. *Шевцов И.А.* Частота и продуктивность анеуплоидов у триплоидных гибридов сахарной свеклы // Цитология и генетика. — 1999. — **33**, № 5. — С. 3—6.
31. *Шевцов И.А., ЧуGUNKOBA Т.В.* Буряки цукрові, кормові, столові. — К.: Логос, 2001. — 128 с.
32. *Юркова Г.Н., Дубровная О.В., ЧуGUNKOBA Т.В., Лялько И.И.* Микроклональное размножение растений сахарной свеклы с генетически детерминированными признаками // Физиология и биохимия культ. растений. — 1999. — **31**, № 3. — С. 228—233.

Отримано 27.12.2010

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И BIOTECHNOLOGИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ФОРМ СВЕКЛЫ И ПШЕНИЦЫ

Т.В. ЧуGUNKOBA

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев
Представлены обзор исследований и главные достижения сотрудников отдела генетических основ гетерозиса Института физиологии растений и генетики НАН Украины. Основное внимание уделено генетическим, цитологическим, молекулярно-генетическим и биотехнологическим основам создания новых форм свеклы и пшеницы.

GENETICAL AND BIOTECHNOLOGICAL BASIS FOR CREATION NEW FORMS OF BEET AND WHEAT

Т.В. ЧуGUNKOBA

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The paper presents a review of researches and main achievements of scientists of the department of genetical basis of heterosis of Institute of Plant Physiology and Genetics.

Key words: genetics, heterosis, cytogenetics, biotechnology, stress, genom.

