

## УДВОЕННЫЕ ГАПЛОИДЫ В ИЗУЧЕНИИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Е.В. Левитес<sup>1</sup>, А.М. Свирщевская<sup>2</sup>, С.С. Кирикович<sup>1</sup>, Л.В. Милько<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия, e-mail: levites@bionet.nsc.ru, <sup>2</sup> Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Минск, Беларусь, e-mail: annasv@minsk.sovam.com

Проведено изучение полиморфизма по ферментным локусам *Adh1*, *Idh1*, *Idh3*, *Me1* и *Pgd1*, контролирующим, соответственно, алкогольдегидрогеназу, изоцитратдегидрогеназу, малик-фермент и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу в линиях удвоенных гаплоидов сахарной свеклы гиногенетического происхождения, культивируемых *in vitro* и *in vivo*. В обоих вариантах опытов – у регенерантов и в семенном потомстве – выявлены качественные изменения в экспрессии четырех из пяти исследованных генов, возникающие в процессе формирования линий удвоенных гаплоидов.

### Введение

Одним из факторов, способных вызывать эпигенетические изменения у растений, является полиплоидия (Scheid *et al.*, 1996; Matzke *et al.*, 1999). В большинстве проведенных к настоящему времени экспериментов плоидность растений изменялась от диплоидного к более высоким уровням. При полиплоидизации возможны парамутагенные–парамутабилильные взаимоотношения между аллелями исходного растения. В связи с этим представляет интерес оценка степени изменчивости и стабильности генов при переводе растения с гаплоидного уровня на диплоидный, когда исходное растение несет всего лишь один аллель. Такой переход можно наблюдать в процессе экспериментального гиногенеза *in vitro* и последующего формирования линий удвоенных гаплоидов гиногенетического происхождения *in vivo*. Именно такая модель была использована при исследовании полиморфизма изоферментных спектров в культивируемых *in vitro* регенерантах исходно гаплоидных линий сахарной свеклы (Levites *et al.*, 2005), а также в семенных потомствах таких линий, прошедших культивирование *in vitro* и последующее размножение *in vivo* (Kirikovich *et al.*, 2003).

### Материалы и методы

Материал для анализа получали из растений диплоидных сортов сахарной свеклы Белорусская односемянная 69 (Бел 69), Ганусовская односемянная 55 (Ган 55), Белоцерковская односемянная 40 (Бц 40) и Янаш А3. Удвоенные гаплоиды получали с помощью технологии экспериментального гиногенеза *in vitro* (Svirshchevskaya, Dolezel, 2000). В эксперименты были взяты семена трех сортов-доноров и двух линий удвоенных гаплоидов: Янаш-КУГ и Бц 40-СУГ(35) РК. Эти линии, происходящие из неоплодотворенных семязачек донорных растений диплоидных сортов Янаш А3 и Бц 40, исходно были гаплоидными. Для удвоения числа хромосом у регенерантов Янаш-КУГ использовали колхицин, а полиплоидизация гаплоида Бц 40-СУГ(35)РК происходила спонтанно при его длительном (более двух лет) культивировании в условиях *in vitro*.

Семенное потомство этих линий получали переопылением *in vivo* удвоенных гаплоидов, полученных от одного индивидуального растения сорта под бязевыми изоляторами (по 3–5 штук) при первой репродукции и на отдельных изолированных участках (по 25–30 штук) при второй репродукции.

Значительную часть опытов составил ана-

лиз изоферментных спектров в культивируемых *in vitro* регенерантах сахарной свеклы гиногенетического происхождения. В анализ были взяты 12 гиногенетических линий, каждая из которых происходила из одной неоплодотворенной семяпочки донорного диплоидного растения одного из сортов: Янаш А3, Бц 40, Бел 69 или Ган 55. Спецификой использованной модели является то, что каждая из исследованных линий явилась результатом микрклонального размножения *in vitro* единичного гаплоидного растения-регенеранта (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001).

В качестве маркерных признаков были выбраны изоферментные спектры алкогольдегидрогеназы (ADH1, E.C.1.1.1.1.), изоцитратдегидрогеназы (IDH1 и IDH3, E.C.1.1.1.42.), малик-фермента (ME1, E.C.1.1.1.40.) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (PGD1; E.C. 1.1.1.44.), контролируемые соответственно локусами *Adh1*, *Idh1*, *Idh3*, *Me1*, и *Pgd1* (Levites, Garifullina, 1988).

### Результаты и обсуждение

При исследовании семян трех сортов сахарной свеклы Бел 69, Ган 55 и Бц 40, являющихся донорами линий гиногенетического происхождения, было установлено, что они мономорфны по алкогольдегидрогеназе (ADH1) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназе (PGD1) и все исследованные семена этих сортов имели фе-

нотипы ADH1-FF и PGD1-FF соответственно (табл. 1). По изоцитратдегидрогеназе (IDH1) был полиморфен лишь сорт Бц 40, остальные два сорта были мономорфны, все исследованные семена этих сортов имели фенотип IDH1-FF. По изоцитратдегидрогеназе-3 (IDH3) полиморфизм был выявлен лишь в сорте Бел 69. Все исследованные сорта были полиморфны по малик-ферменту, но в меньшей степени этот полиморфизм проявился в сорте Бц 40, поскольку в исследованных семенах этого сорта было обнаружено лишь два фенотипических класса в соотношении 2FS : 16SS.

Линия удвоенного гаплоида Янаш-КУГ, полученная из сорта Янаш А3, а также линия Бц 40-СУГ(35)ПК, полученная из сорта Бц 40, были мономорфны по ADH1 и имели такой же фенотип (ADH1-FF), как и исходные сорта. Это говорит о достаточной стабильности локуса *Adh1* при переводе растения с гаплоидного уровня на диплоидный. Обращает на себя внимание полиморфизм этих линий по малик-ферменту. Выявленные в линии Янаш-КУГ фенотипы по малик-ферменту (3FC : 12FF : 20FS : 39SS : 4CS) говорят о том, что исходное растение, взятое для получения удвоенных гаплоидов, было гетерозиготно по локусу, контролирующему малик-фермент. Наиболее вероятный генотип этого растения был *Me1-F/Me1-S*, поскольку частота фенотипов FF, FS и SS в

Таблица 1

Соотношение фенотипов маркерных ферментов в семенах диплоидных сортов и удвоенных гаплоидных линий сахарной свеклы

Анализируемый материал	ADH1	IDH1	IDH3	ME1	PGD1
	FF-FS-SS	FF-FS-SS	FF-FS-SS	CC-FC-FF-FS-SS-CS	FF-FS-SS
Сорт Бц 40	70-0-0	36-24-9	68-0-0	0-0-0-2-16-0	17-0-0
Сорт Бел 69	40-0-0	40-0-0	22-16-1	0-0-3-12-15-0	10-0-0
Сорт Ган 55	74-0-0	85-0-0	85-0-0	0-5-19-14-1-1	28-0-0
Янаш КУГ	52-0-0	48-2-0	41-17-1	0-3-12-20-39-4	-
БЦ 40 СУГ(35) ПК	55-0-0	93-0-0	22-37-19	0-7-18-35-18-1	-

КУГ – удвоенный гаплоид, полученный колхичинированием; СУГ – удвоенный гаплоид, полученный путем длительного (более двух лет) культивирования *in vitro*, сопровождаемого спонтанной диплоидизацией; ПК – рекультивированная линия, т. е. проведенная через циклы культивирования *in vitro* два раза. Типы изоферментных спектров (фенотипы) обозначали как: FF (спектр, представленный изоферментом с быстрой электрофоретической подвижностью), CC или SS (спектры, представленные изоферментами с самой быстрой или, соответственно, с медленной электрофоретической подвижностью), FC, FS и CS – спектры, характерные для гетерозигот и имеющие в своем составе изоферменты с промежуточной электрофоретической подвижностью.

этой линии значительная. Однако в этой линии выявлены также продукты третьего аллеля – *Mel-C*. На это указывают встречающиеся с небольшой частотой фенотипические классы FC и CS (Kirikovich *et al.*, 2003). Этот факт не вписывается в представления, основанные только на законах классической менделевской генетики, но он может быть объяснен на основе представлений, используемых в неканонической генетике и, в частности, на основе понятий об эпигенетической изменчивости. Для обозначения феномена появления продукта третьего аллеля в потомстве диплоидного гетерозиготного растения предложен термин «редетерминация» (Levites *et al.*, 2001). Редетерминация – это качественное изменение экспрессии аллеля ферментного локуса, заключающееся в том, что он начинает определять образование изоферментов, сходных по своим свойствам с изоферментами, соответствующими другим аллелям данного локуса.

Аналогично высокий уровень полиморфизма по малик-ферменту выявлен в линии удвоенного гаплоида Бц 40-СУГ(35)РК (7FC : 18FF : 35FS : 18SS : 1CS), прошедшей двукратную половую репродукцию и двукратное (повторное) культивирование *in vitro* (Kirikovich *et al.*, 2003). Количественное и качественное сходство изменчивости малик-фермента у линий, прошедших либо обработку колхицином, либо повторные циклы культивирования в условиях *in vitro*, свидетельствует о сходстве механизмов, лежащих в основе этой изменчивости. Это хорошо согласуется с данными о влиянии колхицина на характер эпигенетической изменчивости в агамоспермных потомствах растений сахарной свеклы (Levites *et al.*, 2000).

Полиморфизм ферментов, выявляемый в семенных потомствах удвоенных гаплоидов, свидетельствует о том, что переход растений с гаплоидного уровня на диплоидный приводит к изменениям в экспрессии генов, кодирующих эти ферменты (Kirikovich *et al.*, 2003). В связи с этим была предпринята попытка выяснить, в какой момент времени эти изменения происходят: непосредственно при диплоидизации *in vitro* или на стадии первичной репродукции *in vivo*, т. е. при переопылении растений, полученных микроразмножением одного

и того же первичного гаплоидного регенеранта соматического происхождения.

Для этого исследовали экспрессию маркерных ферментных генов в культивируемых *in vitro* регенерантах сахарной свеклы. Необходимо подчеркнуть, что в данной части работы исследовали линии растений-регенерантов, каждая из которых была получена путем микрклонального размножения единичного гаплоидного растения-регенеранта свеклы. При использовании этой экспериментальной модели учитывалось, что гаплоидные ( $x$ ) растения-регенеранты в процессе культивирования *in vitro* постепенно, через миксоплоидию ( $x + xx$ ) переходят на диплоидный ( $xx$ ) уровень плоидности (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001).

Анализ уровня плоидности у растений-регенерантов *in vitro* проводили методом световой микроскопии путем подсчета числа хромосом в листьях на стадии метафазы (Бормотов и др., 1976) и цитофотометрированием (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001).

Результаты, полученные в ходе биохимического анализа культивируемых *in vitro* 12 линий, представлены в табл. 2. Линии растений-регенерантов были мономорфны по ADH1 и имели фенотип FF, аналогичный фенотипу исходных сортов сахарной свеклы. Это указывало на стабильность локуса *Adh1* в растениях-регенерантах (Levites *et al.*, 2005).

По IDH1 выявлены как мономорфные, так и полиморфные линии растений-регенерантов (Levites *et al.*, 2005). Полиморфизм выявлен, например, в длительно культивируемых *in vitro* исходно гаплоидных линиях Янаш 2(2) и Янаш СУГ 58(4), полученных от растений сорта Янаш А3. В линии Янаш 2(2) обнаружено 13 растений фенотипа IDH1-FF и 3 растения с мозаичным фенотипом IDH1-(FF+FS). Мозаичный фенотип характеризуется тем, что в одном листе данного растения выявляется спектр IDH1-FF, характерный для гомозигот, а в другом листе того же самого растения – гетерозиготный фенотип IDH1-FS. В линии Янаш СУГ 58(4) аналогично было выявлено 4 растения фенотипа IDH1-FF, 2 растения фенотипа IDH1-FS и 3 растения фенотипа с мозаичным фенотипом IDH1-(FF+FS). Цитофотометрический анализ этих линий показал наличие гаплоидных клеток с высокой достоверностью, так как в каждом из двух образ-

Таблица 2

## Частоты фенотипов ADH1 и IDH1 у растений-регенерантов сахарной свеклы гиногенетического происхождения

Название линии	Данные цитоанализа* (общее число клеток/ из них гаплоидных клеток)	ADH1	IDH1		
		FF – FS – SS	FF – FS – SS		
Бел 69-3(5)-10(1)	10/10	14 – 0 – 0	0	4с + 6м	4
Бел 69-3(5)-10(4)	10/10	–	0	0	8
Бел 69-3(7)	30/30	3 – 0 – 0	14	0	0
		5 – 0 – 0	9	0	0
Бел 69-3(14)	4621/2060*	9 – 0 – 0	7	1	0
		8 – 0 – 0	8	0	0
Бел 69-3(15)	3123/1050*	7 – 0 – 0	0	0	7
		8 – 0 – 0	0	0	8
		6 – 0 – 0	0	0	8
Бел 69-3(16)	4895/2544*	13 – 0 – 0	14	0	0
		8 – 0 – 0	8	0	0
Ган 55-5(2)	3209/854*	9 – 0 – 0	0	0	10
		–	0	0	9
		–	0	0	8
Ган 55-7(2)	4805/1513*	13 – 0 – 0	0	0	13
		–	0	0	13
Ган 55-7(5)	10/10	16 – 0 – 0	2	6с + 8м	1
		–	0	2с + 9м	1
Янаш 2(2)	4573/1660*	9 – 0 – 0	10	0	0
		15 – 0 – 0	13	3 м	0
Янаш 58(4)	4049/1971*	11 – 0 – 0	4	2с + 3м	0
		–	13	0	0
Бц 40 35/3РК <sup>2</sup>	10/0 УГ	6 – 0 – 0	11	0	0
		–	5	5	3

УГ – удвоенный гаплоид, с – стабильный фенотип, м – мозаичный фенотип. \* Результаты цитофотометрического анализа, представляющие собой средние из 5 повторностей для каждого генотипа; уровень ploидности определен в данном случае по относительному содержанию ДНК в ядрах клеток листовой ткани регенерантов: общее число ядер равно сумме 1С, 2С, 4С и 8С ядер, число гаплоидных ядер соответствует числу 1С. Данные, не отмеченные знаком \*, получены методом световой микроскопии. Количество строчек для каждого номера соответствует количеству проанализированных чашек Петри.

цов из более чем 4000 ядер гаплоидными оказались соответственно 1660 и 1971; остальные клетки этих линий имели диплоид-

ный и более высокий уровень ploидности (Svirshchevskaya, Dolezel, 2001; Levites *et al.*, 2005). Появление гетерозиготных и мозаич-

ных фенотипов хорошо согласуется с данными микроскопии и цитофотометрии, свидетельствующими о постепенном увеличении уровня ploидности регенерантов при их длительном культивировании. Таким образом, миксоploидность растений сопровождается их мозаичностью по типу изоферментного спектра. Это указывает на то, что переход растения на более высокий уровень ploидности сопряжен с изменением экспрессии маркерного гена. Всего из 12 линий удвоенных гаплоидов в 5 линиях был выявлен полиморфизм по IDH1. В 4 гомозиготных линиях (Бел 69-3(5)-10(4), Бел 69-3(15), Ган 55-5(2), Ган 55-7(2)) (табл. 2) обнаружена редетерминация: вместо аллеля *Idh1-F*, присутствовавшего в исходных сортах сахарной свеклы, в этих линиях выявлялся аллель *Idh1-S*.

Анализ изоферментных спектров PGD также выявил полиморфизм по быстромигрирующей зоне PGD1 среди регенерантов линий Бел 69-3(14) и Ган 55-5(2). Этот полиморфизм трудно интерпретировать, поскольку ранее в этой зоне у изученных сортов свеклы он выявлен не был (Levites, Garifullina, 1988), так же, как и в семенах сортов, взятых для получения линий удвоенных гаплоидов (табл. 1). Нестабильность локусов *Idh1* и *Pgd1*, контролирующих IDH1 и PGD1, при стабильности локуса *Adh1*, контролирующего ADH1, предполагает, что изменение уровня ploидности в соматических клетках побегов регенерантов свеклы является не единственным фактором, определяющим различную экспрессию генов в тканях побегов при их культивировании *in vitro*.

Результаты, полученные при исследовании гиногенетических регенерантов сахарной свеклы *in vitro*, хорошо согласуются с данными об обусловленном эпигенетической изменчивостью полиморфизме изоферментных спектров в половом потомстве удвоенных гаплоидов сахарной свеклы (Kirikovich *et al.*, 2003). Высокая частота фенотипических изменений в экспрессии маркерных генов у культивируемых

*in vitro* и *in vivo* исходно гаплоидных регенерантов сахарной свеклы свидетельствует о том, что они сохраняются не только в ряду клеточных, но и половых поколений, т. е. наследуются, а изменение уровня ploидности является важным фактором, влияющим на характер эпигенетической изменчивости у растений.

### Литература

- Бормотов В.Е., Загрекова Н.Н., Матросов Б.Ф. и др. Обзоры по цитогенетике полиploидных форм сахарной свеклы. Минск: Наука и техника, 1976. С. 62–68.
- Kirikovich S.S., Svirshchevskaya A.M., Levites E.V. Variation at isozyme loci in seed offspring of sugar beet gynogenetic lines // Sugar Tech. 2003. V. 5, N 4. P. 289–292.
- Levites E.V., Garifullina F.Sh. Use of isozymes as genetic markers for identification of sugar beet varieties // Biochemical Identification of Varieties: Materials of the 3th International Symposium ISTA. Leningrad, USSR, 1988. P. 104–109.
- Levites E.V., Denisova F.Sh., Kirikovich S.S., Judanova S.S. Ratios of phenotypes at the *Adh1* locus in the apozygotic offspring in sugarbeet ( $C_1$  generation) // Sugar Tech. 2000. V. 2, N 4. P. 26–30.
- Levites E.V., Shkutnik T., Shavorskaya O.A., Denisova F.Sh. Epigenetic variability in agamosperous progeny of sugar beet // Sugar Tech. 2001. V. 3, N 3. P. 101–105.
- Levites E.V., Svirshchevskaya A.M., Kirikovich S.S., Mil'ko L.V. Variation at isozyme loci in cultured *in vitro* sugar beet regenerants of gynogenetic origin // Sugar Tech. 2005. V. 7, N 1. P. 71–75.
- Matzke M.A., Scheid O.M., Matzke A.J.M. Rapid structural and epigenetic changes in polyploidy and aneuploid genomes // BioEssay. 1999. V. 21. P. 761–767.
- Scheid O.M., Jakovleva L., Afsar K. *et al.* A change of ploidy can modify epigenetic silencing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7114–7119.
- Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. Production and performance of gynogenetic sugarbeet lines // J. Sugar Beet Res. (USA). October-December. 2000. V. 37, N 4. P. 117–133.
- Svirshchevskaya A.M., Dolezel J. Karyological characterization of sugar beet gynogenetic lines cultured *in vitro* // J. Appl. Genet. 2001. V. 42, N 1. P. 21–32.

## Use of double haploids of sugar beet for the study of epigenetic variability

E.V. Levites<sup>1</sup>, A.M. Svirshchevskaya<sup>2</sup>, S.S. Kirikovich<sup>1</sup>, L.V. Milko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 630090, Novosibirsk, Russia, e-mail: levites@bionet.nsc.ru, <sup>2</sup>Institute of Genetics and Cytology of NASB, 220072, Minsk, Belarus, e-mail: annasv@minsk.sovam.com

### Summary

Polymorphism assessment on alcohol dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malic enzyme and 6-phosphogluconate dehydrogenase loci has been conducted in sugar beet doubled haploid lines of gynogenetic origin cultured *in vitro* and *in vivo*. Qualitative changes in gene expression in four out of five genes under investigation were shown to take place in both experimental variants (regenerants and seed progeny) during the process of doubled haploid line formation from a haploid regenerant.