

ОСОБЛИВОСТІ АНДРОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* РІЗНИХ ВИДІВ СОНЯШНИКУ

Т. В. ЧИГРИН;

О. А. ЗАДОРЖНА, кандидат біологічних наук;

Л. Л. ЮШКІНА, О. Г. СУПРУН

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, Харків

Вступ

Створення подвоєних гаплоїдів – важливий сучасний метод біотехнології, що дозволяє прискорювати селекційний процес завдяки подвоєнню гаметофітної кількості хромосом бажаного генотипу. Дослідження в цьому напрямі проводяться ще з 60-х років ХХ сторіччя. Отримували як спонтанні подвоєні гаплоїди, так і індуковані при створенні певних експериментальних умов. Найпоширенішою технікою отримання подвоєних гаплоїдів є метод індукції андрогенезу шляхом культивування ізольованих пиляків. Цей метод успішно застосовується для ячменю [1, 13], пшениці та тритикале [3, 14], кукурудзи [8-10, 16], ріпаку, гірчиці [12], льону [11, 18], цукрового буряку [6, 7], овочевих [4] та інших культур.

Фактично за останні 30 років культуру пиляків спробували майже для всіх сільськогосподарських культур. Створенню подвоєних гаплоїдів соняшнику присвячені окремі роботи [15, 20]. Описано андрогенез *in vitro* для таких видів соняшнику, як *Helianthus annuus* L., *H. occidentalis* Riddell., *H. decapetalus* L., *H. tuberosus* L. та міжвидових гібридів *H. annuus* x *H. occidentalis*, *H. annuus* x *H. tuberosus*. Визначено значний ефект генотипу на здатність до індукції калюсогенезу та новоутворень [20].

Враховуючи перспективність використання диких видів соняшнику при схрещуванні з культурними та важливу роль методу створення подвоєних гаплоїдів у прискоренні селекційного процесу, метою нашої роботи було визначити особливості андрогенезу ліній культурного соняшнику та різних видів дикого соняшнику для встановлення їх здатності до андрогенезу та подальшого застосування для створення подвоєних гаплоїдів.

Об'єкти та методи досліджень

Матеріалом для досліджень були лінії культурного соняшнику (*H. annuus* L.) селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва: X114В, X526В, X711В, X720В, X762В — відновники фертильності пилку та дикі диплоїдні види соняшнику ($2n=34$): *H. divaricatus* L., *H. giganteus* L., *H. microcephalus* Torrey & Gray, *H. nuttallii* Torrey & Gray, *H. decapetalus* L. Рослини вирощували в польових умовах на території наукової сівозміни Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харківська обл.) в 2010 році.

Для отримання пиляків використовували кошики культурного соняшнику діаметром приблизно 5,5 см та вищезазначених диких видів діаметром 0,7-0,9 см, що відповідало наявності стадії одноядерних вакуолізованих мікроспор. Фазу розвитку пилку визначали під світловим мікроскопом із використанням цитологічних методів на тимчасових препаратах, забарвлених ацетокарміном [5]. В подальшому кошики або їх фрагменти (для культурних ліній) піддавались поверхневій обробці детергентом, потім 96% етанолом (Артемівський спиртзавод, Україна) (30 с), 50% розчином комерційного засобу “Доместос” (ООО Юнілевер СНГ, Росія), що містив гіпохлорит (20 хв.). Чотири рази промивали дистильованою водою. Пиляки, що були на відповідній стадії, ізолювали з квіток під біокуляром (МБС-10, “Рубин”, СРСР) в асептичних умовах ламінар-боксу (КПГ-1М, СРСР), розміщували в пробірках на індукційному поживному середовищі. Основу індукційного поживного середовища складали макро- і мікросолі, вітаміни середовища Murashige & Skoog (MS) [17]. Пиляки у кількості 150 шт. на один зразок

висівали на чотири індукційні поживні середовища. В середовище 1 додавали 250 мг/л гідролізату казеїну (ОХФЗ, Латвія); 1,0 мг/л НОК (SERVA, Німеччина); 2 мг/л 2,4-Д (SERVA, Німеччина); 0,5 мг/л БАП (SERVA, Німеччина); в середовище 2 додавали 0,1 мг/л НОК; 0,2 мг/л БАП. В середовище 3 додавали 500 мг/л гідролізату казеїну, 2 мг/л НОК; 1,0 мг/л БАП; в середовище 4 – 0,1 мг/л НОК; 0,5 мг/л БАП. В усі середовища додавали 30 г/л цукрози; в середовища 1-3 – 8 г/л агару, в середовище 4 – 6 г/л агару.

Культивування проводили у темряві за температури +24°C протягом 7 діб. Після цього пробірки з новоутвореннями переносили в кімнати зі штучним кліматом і продовжували культивувати за температури +24°C \pm 2°C, 16-годинного світлового періоду та освітлення 3000 лк. Частоту формування новоутворень визначали шляхом підрахунку кількості пиляків з новоутвореннями у відношенні до загальної кількості введених в умови *in vitro* пиляків та виражали у відсотках.

Через 28 діб з моменту введення в умови *in vitro* пиляки зі сформованими на їх поверхні макроструктурами з центром регенерації були перенесені на регенераційне середовище, до складу якого входили компоненти середовища MS з додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну та регуляторів росту (0,5 мг/л БАП; 0,5 мг/л кінетин).

Кількість хромосом підраховували стандартним методом [4] у рослин-регенерантів на тимчасових давлених препаратах листочків. Після культивування протягом 30 діб регенеранти переносили на нові середовища з додаванням 3 мг/л НОК.

Аналіз показників калюсо- та морфогенезу проводили за допомогою методів варіаційної статистики [2].

Результати та обговорення

За результатами проведених досліджень встановлено, що при культивуванні пиляків сояшнику на індукційних поживних середовищах спостерігали різну частоту новоутворень. Ця частота відрізнялась у різних генотипів сояшнику на різних середовищах культивування (табл.).

Таблиця

Формування новоутворень з мікроспор різних генотипів сояшнику на 4-х середовищах культивування

Назва зразка	Частота формування новоутворень на відповідному середовищі, %			
	середовище 1	середовище 2	середовище 3	середовище 4
X114B	95,3 \pm 1,7	10 \pm 2,5	94,7 \pm 1,8	7 \pm 2,5
X526B	8,7 \pm 2,3	20,7 \pm 3,3	42,7 \pm 4,0	15,3 \pm 2,9
X711B	48,7 \pm 4,1	10 \pm 2,5	78 \pm 3,4	16,0 \pm 3,0
X720B	48,7 \pm 4,1	12,0 \pm 2,7	27,3 \pm 3,6	7,3 \pm 2,1
X762B	89,3 \pm 2,5	5,0 \pm 1,5	46 \pm 4,0	9,3 \pm 2,4
<i>H.divaricatus</i>	31,3 \pm 3,8	2,7 \pm 1,3	30 \pm 3,7	22,6 \pm 3,4
<i>H.decapetalus</i>	17,0 \pm 3,8	2,0 \pm 1,4	5 \pm 2,2	0
<i>H.giganteus</i>	27,0 \pm 4,4	6,0 \pm 1,9	9,3 \pm 2,4	11,3 \pm 2,6
<i>H.microcephalus</i>	2,7 \pm 1,3	0	1,3 \pm 0,9	-
<i>H.nuttallii</i>	18,7 \pm 3,2	18 \pm 3,1	2,7 \pm 1,3	6 \pm 1,9

На пиляках формувалась калюсна біомаса з окремими щільними утвореннями (рис. 1). Серед ліній культурного сояшнику спостерігали більшу залежність частоти новоутворень від генотипу ($F=7,42/F_{кр}=3,49$), ніж від середовища культивування ($F=1,21/F_{кр}=3,26$).

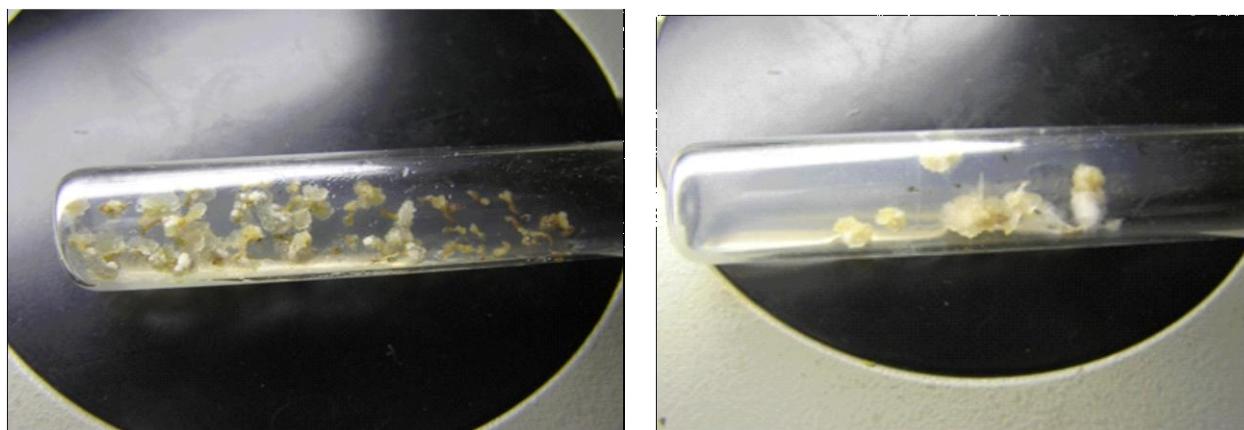


Рис. 1. Новоутворення з мікроспор на середовищі 3 лінії X762В (а) та *H. giganteus* (б)

У диких видів залежність від генотипу та від середовища культивування майже не відрізняється і має місце тенденція більшого впливу середовища культивування ($F=4,38/F_{кр}=3,26$), ніж генотипу ($F=3,37/F_{кр}=3,49$). Такий розбіг, можливо, пов'язаний зі слабшим відгуком на умови андрогенезу диких видів, ніж ліній культурного соняшнику (рис. 2). Так, частота формування новоутворень мікроспор ліній культурного соняшнику без урахування середовища культивування знаходилась в середньому в межах 22-56%.

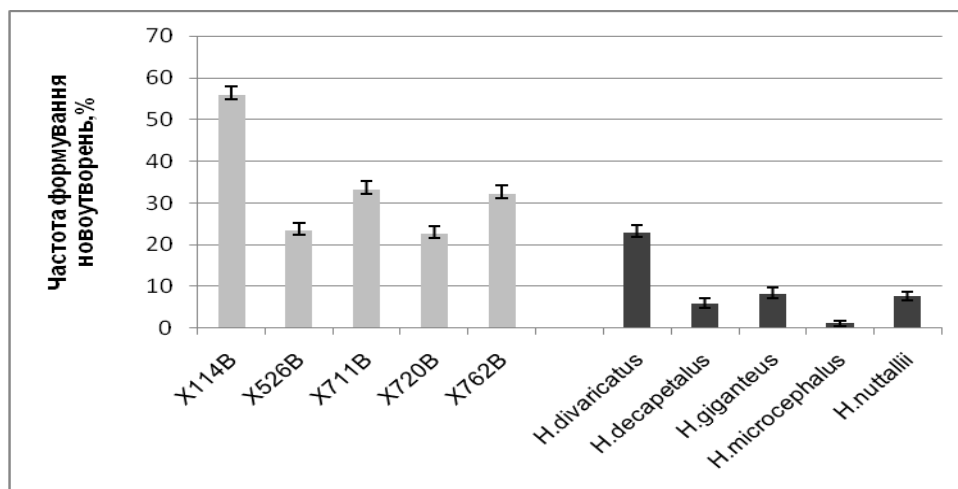


Рис. 2. Частота формування новоутворень з мікроспор при культивуванні *in vitro*

Частота формування новоутворень диких видів перебувала в межах від 0% до 22%. За даними інших дослідників, великої розбіжності між культурними лініями *H. annuus* та дикими видами *H. occidentalis*, *H. decapetalus*, *H. tuberosus* за частотою андрогенезу не спостерігали [8]. Можливо, це пов'язано з тим, що дослідники використовували інші види або біотипи соняшнику, в яких досліджували андрогенез.

Нами вивчена також здатність до андрогенезу на різних індукційних середовищах культивування окремо для диких видів *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii*, *H. decapetalus*, та для ліній культурного соняшнику *H. annuus* (X114В, X526В, X711В, X720В, X762В) (рис. 3). Високі показники частоти новоутворень спостерігали у ліній культурного соняшнику на середовищах 1 і 3, що перевищували цей показник на решті середовищ більш ніж на 40%. Частота

формування новоутворень у диких видів в залежності від середовища коливалася в межах 10%. Це більше ніж переконливо свідчить про нижчу чутливість диких видів соняшнику до використаних поживних середовищ культивування.

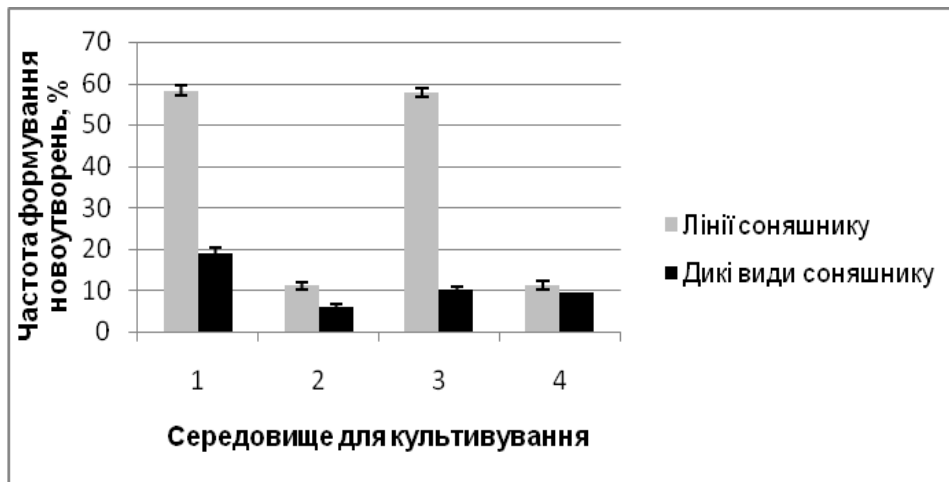


Рис. 3. Частота формування новоутворень на різних поживних середовищах

На регенераційному середовищі центри регенерації зафіксовані для лінії культурного соняшнику X711В, диких видів соняшнику *H. microcephalus* та *H. decapetalus*. Найбільшу кількість регенерантів дали пиляки *H. giganteus* (рис. 4а). У решти зразків на регенераційному середовищі спостерігали калюси різного ступеня щільності. При подальшому культивуванні рослини-регенеранти вдалось одержати лише у *H. giganteus* (рис. 4б) та *H. decapetalus*. Ризогенез спостерігали тільки у *H. giganteus* L. (рис. 4 в) та *H. decapetalus*.

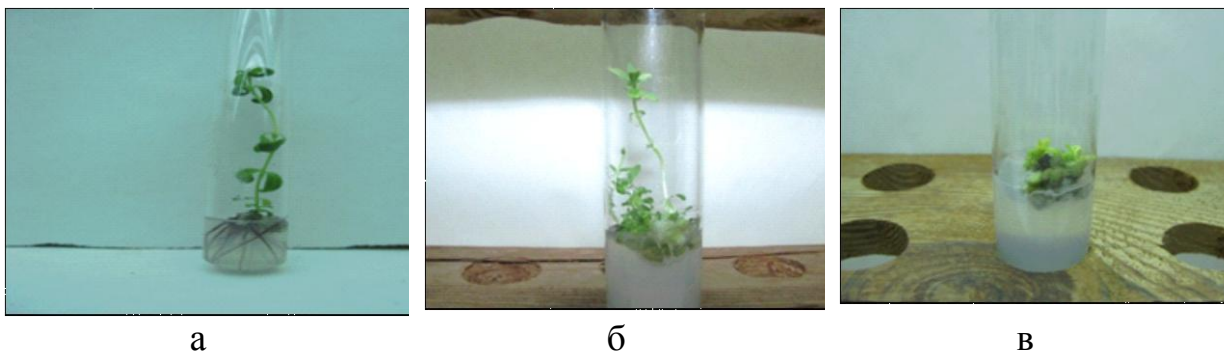


Рис. 4. Регенерація новоутворень соняшнику (а-в): а - формування пагонів; б – рост пагонів; в – ризогенез у пагона

В отриманих пагонів проведено цитологічний аналіз. На проаналізованих препаратах не знайдено метафазних пластинок, де кількість хромосом дорівнювала б 34 (для диплоїдного соняшнику $2n=34$). З метою диплоїдизації отримані пагони піддавались колхіцинуванню шляхом обробки 0,2% розчином колхіцину в умовах вакууму («SPT200 Horizont», Польща). Рослини після обробки помістили в умови штучного клімату, де вони продовжили вегетацію.

Висновки

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про різну андрогенну здатність представників різних видів соняшнику. Вирішальне значення на формування новоутворень мав вплив генотипу соняшнику. Серед вивчених ліній культурного соняшнику та диких видів соняшнику найвища здатність до утворення гаплоїдних

регенерантів була у *H. giganteus*.

Список літератури

1. Білінська О.В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su₂*) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія. – 2010. – Вип.11 (№ 905). – С. 60-66.
2. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных. – М.: Колос, 1966. – 255 с.
3. Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.20 / УААН; Южный биотехнологический центр в растениеводстве. – Одеса, 2004. – 435 с.
4. Гаплоїдія овочевих видів рослин *in vitro* / Кондратенко С.І., Сергієнко О.Ф., Гончарова С.А., Баштан Н.О. / Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. – Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – 2007. – Т. 2. – С. 508-512.
5. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
6. Роїк М.В. Значення генетичних ресурсів рослин для сільського господарства України // Тези доповідей міжнар. наук.-практ. конф. – Оброшено, 2005. – С. 3-5.
7. Рябовол Л.О. Разработка способов получения гаплоидов и дигаплоидов сахарной свеклы как исходного материала для селекционного процесса: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – К., 1994. – 24 с.
8. Сатарова Т.Н., Пиралов Г.Р., Дзюбецкий Г.Р. Ускорение селекционного процесса кукурузы с помощью метода эмбриокультуры // Вестник аграрной науки. – 1993. – № 8. – С. 50-53.
9. Сатарова Т. М. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.20 / НАН України; Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. – К., 2002. – 41 с.
10. Оптимизация процесса диплоидизации гаплоидов кукурузы при ускоренном получении гомозиготных линий / Черчель В.Ю., Сатарова Т.Н., Мельничук О.С., Гарькавая Е.Н. / Селекция і насінництво. – 2009. – Вип. 97. – С. 52-62.
11. Получение удвоенных гаплоидов у льна масличного через культуру пыльников (Методические указания) / Сорока А.И. – Запорожье: Институт масличных культур УААН, 2007. – 26 с.
12. Babbar S.B., Agarwa A.K. Sahay Sh. Isolated microspore culture of *Brassica*: An experimental tool for development studies and crop improvement // Indian Journal of Biotechnology. – 2004. – Vol. 3, № 4. – P. 185-202.
13. Clapham D. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro* // Z. Pflanzenzucht. – 1973. – Bd. 69. – P. 142-155 .
14. Dogramaci-Altuntepe M., Peterson T.S., Jauhar P.P. Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization // The American Genetic Association. – 2001. – Vol. 92, № 1. – P. 56-64.
15. Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration / Thengane S.R., Joshi M.S., Khuspe S.S. et al. / Plant Cell Rep. – 1994. – Vol. 13. – P. 222-226.
16. Hassawi D.S., Liang G.H. Effect of cultivar, microspore development of anther culture of wheat and Triticale // Plant Breeding. – 1990. – Vol. 105, № 3. – P. 332-336.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

18. Kurt O., Evanth G.M. Anther Culture Potential of Linseed (*Linum usitissimum* L.): Effects of Genotypes and Pretreatment on Callus Formation and Differentiation // J.of Agriculture and Forestry. – 1998. – Vol. 22. – P. 553-560.

19. Genotype variation of quantitative trait loci controlling *in vitro* androgenesis in maize / Murigneux A., Bentolila S., Hardy T. et al. / Genome. – 1994. – Vol. 37, № 3. – P. 970-976.

20. Androgenetic response of sunflower in diferent culture environments / Vijaya Priya K., Sassikumar D., Sudhagar R. et al. / Helia. – 2003. – Vol. 26, № 38. – P. 39-50.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.