

АНАЛІЗ РОСТОВИХ ТА ЗАПЛІДНЮЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГАММА-ОПРОМІНЕНОГО ПИЛКУ ТЮТЮНУ ДУХМЯНОГО

Л. В. ГРУБСЬКА, кандидат біологічних наук, докторант
І. М. ГУДКОВ, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри
радіобіології та радіоекології
А. В. КЛЕПКО, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник,
докторант
С. В. АНДРЕЙЧЕНКО, доктор біологічних наук, професор
**Національний університет біоресурсів та природокористування
України**
E-mail: Grubskalyuda@bigmir.net

Анотація. Гамма-опромінений пилок дуже часто використовується як інструмент генетичного реконструювання рослинної клітини. З цього приводу виникає потреба у проведенні поглиблених наукових досліджень для створення базової радіобіологічної теорії, щоб пояснити встановлені явища. Метою роботи було вивчення дії гамма-опромінення в різних дозах на проростання пилку тютюну духмяного (*Nicotiana alata*) *in vitro*, ростові властивості пилкових трубок та мітотичний поділ генеративної клітини на спермії. Попередньо висушений пилок опромінювали гамма-променями ^{60}Co в дозах 50 – 3000 Гр, а потім пророщували на стерильній водопровідній воді з додаванням 10 % цукрози та 0,01 % борної кислоти. Проростання та довжину пилкових трубок визначали за допомогою окуляр-мікрометра під мікроскопом «МБИ-3» на збільшенні $\times 150$. Ядра пилку забарвлювали 2 % ацетоорсеїном. Встановлено, що гамма-радіація пригнічує проростання та ріст пилкових трубок, зводячи їх нанівець при дозах вище 2000 Гр. В той же час поділ генеративної клітини на спермії повністю припинявся за дози 300 Гр і вище. Також було відмічено дозозалежне уповільнення швидкості росту пилкових трубок. Сукупність встановлених радіаційних змін в пилку, на нашу думку, має сприяти здійсненню гіногенезу та апоміксису.

Ключові слова: пилок, *Nicotiana alata*, пилкові трубки, гіногенез, апоміксис, гамма-опромінення

Актуальність. На сучасному етапі розвитку людства, коли спостерігається невпинне стрімке зростання загальної чисельності населення, поступове виснаження природних та земельних ресурсів, а також різка зміна кліматичних умов на всій планеті, найважливішого значення набуває проблема прискорення селективного процесу та розробки нових підходів збагачення видового генофонду для створення високопродуктивних рослинних форм з ознаками підвищеної резистентності до різних абіотичних та біотичних чинників.

Доведено, що успішність реалізації такої програми базується, в першу чергу, на використанні прийомів генетичного конструювання клітини. В той же час, ефективність застосування останніх прямим чином залежить від нашого вміння управляти процесом запліднення та своєчасно запускати амфіміктний або апоміктний шлях розвитку ембріону. На відміну від амфіміксису, апоміксис дає змогу безпосередньо отримувати гаплоїди та дигаплоїди і тим самим досягати бажаної гомозиготності генів вже в першому поколінні, що значно скорочує час для виведення інбредних ліній та нових сортів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Аналіз даних наукової літератури щодо виникнення апомікса у вищих рослин свідчить про те, що використання опроміненого іонізуючою радіацією пилку у запиленнях з метою індукції гаплоїдного та диплоїдного партеногенезу набуває все більш широкого застосування у рослинництві. Так, групі індійських вчених на чолі з М. Кундю вдалося отримати гаплоїди грейпфрута (*Citrus grandis*) шляхом проведення запилення пилком цитруса видів *Citrus limetta* та *Citrus sinensis*, після його гамма-опромінення в дозах 300 та 400 Гр, відповідно [1]. За менших доз гаплоїди не утворювались. Автори сповістили, що виживання гаплоїдів залежало від стану ендосперма, котрий в більшості випадків був недорозвинутим. Через це, насінні зачатки разом з ембріонами вилучали на 50-й день після запилення та переносили на поживне середовище і таким чином отримували зрілі гаплоїдні рослини.

Двом польським вченим, К. Мусіаль та Л. Прживарі, вдалося отримати гаплоїди ківі (*Actinidia deliciosa*) сорту «Гайвард» шляхом запилення гамма-опроміненим пилком того ж виду, але іншого сорту, зокрема «Томурі» або «Матуа» [2]. Виявилось, що найбільший вихід гаплоїдів спостерігався при дозі в 800 Гр. До того ж, отримане гаплоїдне насіння було повноцінним, оскільки містило ембріони разом з розвинутим ендоспермом. Це згодом давало можливість вирощувати гаплоїдні рослини без використання спеціального поживного середовища та методики культивування ембріонів. До того ж, групою французьких вчених було показано, що ефективність індукції гаплоїдного партеногенезу у ківі залежить від генотипу донора пилку. При цьому показано здатність у деяких гаплоїдних рослин спонтанно подвоювати свій геном і переходити на дигаплоїдний рівень [3].

Група турецьких вчених досліджувала вплив батьківського геному пилку на утворення гаплоїдів у кавуна (*Citrullus lanatus*) [4]. Встановлено, що найбільший вихід гаплоїдів, а саме 6,25 гаплоїдних ембріонів на 100 насінин, вдається отримати у запиленнях гамма-опроміненим в дозі 275 Гр пилком сорту «Устун F1». Отримані дані також вказують на існування генетичної детермінованості гіногенезу.

Гіногенетичні гаплоїди вдалось отримати також у гарбуза (*Cucurbitata* перо L.), причому дози опромінення пилку в 25 Гр та 50 ГР виявились найбільш ефективними для індукції партеногенетичного розвитку яйцеклітин [5]. Також встановлено, що частота появи гаплоїдних рослин гарбуза виду *Cucurbitata moschata* на 100 насінин та 100 ембріонів дорівнювала 0,24 та 0,94, відповідно. Через те, в одному плоді такого гарбуза могло знаходитись до 33 % гаплоїдного насіння [6].

Використання гамма-опроміненого пилку зумовило виникнення гаплоїдного партеногенезу у дині, що згодом дало змогу отримати зрілі гаплоїдні рослини. Гаплоїди проявляли схильність до спонтанного перетворення у дигаплоїди та ($1n/2n$) – міксоплоїди [7]. Також в літературі повідомлялось про успішне отримання гаплоїдів цибулі шляхом комбінованого застосування гіногенезу та культури ембріонів [8]. У мушмули японської (*Eriobotrya japonica*) вдалося отримати життєздатне гаплоїдне насіння шляхом застосування дози в 150 Гр для опромінення пилку з наступною індукцією гіногенезу [9]. В той же час, є повідомлення про безуспішні спроби отримати зрілі гаплоїди слив та полуниць [10, 11].

Тут варто також звернути увагу на те, що у деяких рослин, зокрема у деяких видів тютюну, запилення пилковими сумішами з гамма-опроміненим компонентом іншого виду, як правило, зумовлює індукцію диплоїдного партеногенезу та появу дигаплоїдних рослин, мінаючи при цьому стадію гаплоїдизації [12].

Таким чином, проведений аналіз літератури показав, що гамма-опромінення пилку може стати основою для створення сучасних біотехнологій в рослинництві для прискорення селекції та сортовиведення лише в тому разі, якщо будуть детально вивчені радіобіологічні реакції пилку на гамма-опромінення та встановленні найбільш оптимальні дозові межі для індукції певного генетичного феномену, а саме гаплоїдного партеногенезу, диплоїдного партеногенезу, мутагенезу, трансгенезу та партенокарпії, що стане передумовою для побудови загальної концепції щодо участі гамма-опроміненого пилку у заплідненні та ембріогенезі.

Метою дослідження було вивчення дії гамма-опромінення в різних дозах на проростання пилку тютюну духмяного (*Nicotiana alata*) *in vitro*, ростові властивості пилкових трубок та мітотичний поділ генеративної клітини на спермії.

Матеріали та методи дослідження. Тютюн духмянний (*Nicotiana alata*) – це однолітня квіткова рослина, яку протягом літнього періоду вирощували у вегетаційному будиночку за звичайних умов. З метою збору пилку, спочатку збирали нерозкриті бутони, вилучали з них пиляки перед початком антезису та переносили їх в чашки Петрі, де тримали протягом 30 год при температурі 20 °C та вологості повітря 60 %. Після розкриття пиляків з них витрушували пилки, котрий згодом зберігали в бюксах за -18 °C.

Пилки пророщували в розчині 10 % цукрози та 0,01 % борної кислоти на водопровідній воді, яку попередньо профільтрували під тиском через мікропоровий фільтр фірми «Millipore» з діаметром пор в 0,22 мкм. Для пророщування 0,2 мг пилку спочатку його переносили на покривне скельце, а потім за допомогою голки рівномірно розподіляли по поверхні краплі, що містила 0,04 мл поживного середовища. Приготовлені таким чином препарати розміщали в чашках Петрі разом зі шматками вологого фільтрувального паперу для запобігання висихання пилкової суспензії. Пророщування контрольного та гамма-опроміненого пилку проводили у трьох повторностях за температури +28 °C та освітленості в 800 лк. Пилки вважали пророслими, якщо довжина пилкової трубки була не менше діаметра пилкового зерна. Вважається, що за такої ситуації в пилку вже починається синтез пектинових речовин, котрі так необхідні для побудови

клітинної стінки [13]. Проростання та довжина пилкових трубок визначали за допомогою окуляр-мікрометра під мікроскопом «МБИ-3» (Росія) на збільшенні $\times 150$. В деяких випадках з метою більш довготривалого зберігання тимчасових препаратів пилку їх фіксували та фарбували 0,1 %-вим розчином анілінового блакитного в лактофенолі, що складався з рівних об'ємних частин молочної кислоти, гліцерину, води та фенолу [14]. Проростання пилку та середню довжину пилкових трубок визначали у виборці з двохсот довільно відібраних пилкових зерен. При цьому довірчі інтервали встановлювали в межах $\pm 1,96$ стандартної похибки (SE), керуючись двобічною кривою нормального розподілу даних при $p = 0,95$.

Опромінення сухого пилку гамма-променями проводили при потужності дози 0,2 Гр / с. Для спостереження за поділом генеративної клітини в пилкових трубках використовували фіксацію та забарвлення ацетоорсеїном. Для цього до краплі пилкової суспензії додавали ідентичну за об'ємом краплю 2 %-вого розчину орсеїну в 45 %-вій оцтовій кислоті. Суміш накривали покривним скельцем та декілька разів прогрівали над полум'ям спиртівки, після чого краї препарату окантовували розплавленим парафіном [14].

Статистичні відмінності для різних доз опромінення визначали за допомогою дисперсійного аналізу «ANOVA» та непарного критерія Стьюдента з поправкою Бонфероні при $p < 0,05$ [15].

Дослідження та їх обговорення. Пилкок тютюну духмяного відноситься до типу двоклітинного пилку, який за правилом складається з вегетативної та генеративної клітини, причому генеративна міститься безпосередньо у цитоплазмі вегетативної клітини. Кожне пилкове зерно має три аперттури, або пори, через одну з яких відбувається утворення та ріст пилкової трубки. Ознакою утворення пилкової трубки є втрата міжапертурної ідентичності та поява домінантної пори з вираженою елонгацією інтини, що за своєю довжиною перевищує діаметр пилкового зерна. У двоклітинного пилку поділ генеративної клітини відбувається в пилковій трубці, при цьому ядро вегетативної клітини теж переміщується у пилкову трубку і повільно просувається там в напрямку її кінчика без здійснення мітотичного поділу. Через це, поява у пророслого пилку трьох ядер має свідчити про здійснення мітотичного поділу генеративної клітини та утворення сперміїв.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що поступове підвищення дози опромінення пилку тютюну духмяного з 50 Гр до 100 Гр спричиняє пригнічення утворення сперміїв у 93 % пилкових зерен (табл. 1). Крім того, з'ясовано, що при дозах вище 200 Гр спермії взагалі не утворювались (рис. 1, крива С), що вказує на неспроможність такого пилку до здійснення подвійного запліднення ембріонального мішка за браком активних сперміїв.

Таблиця 1. Аналіз ростових та запліднюючих властивостей пилку тютюну духмяного

Доза опромінення, Гр	Проростання пилку, %	Довжина пилкових трубок, мкм	Пилкові зерна з двома сперміями, %	Швидкість росту пилкових трубок, мкм/год
0	81 $\pm$ 12	737 $\pm$ 165	100	38 $\pm$ 7
50	80 $\pm$ 13	712 $\pm$ 173	82	35 $\pm$ 6

100	75 ± 12	698 ± 154	7	32 ± 6
300	62 ± 10	630 ± 142	1	25 ± 5
1000	34 ± 7	475 ± 130	0	14 ± 6
1500	7 ± 3	120 ± 17	0	6 ± 2
2000	2 ± 1	15 ± 6	0	1 ± 1

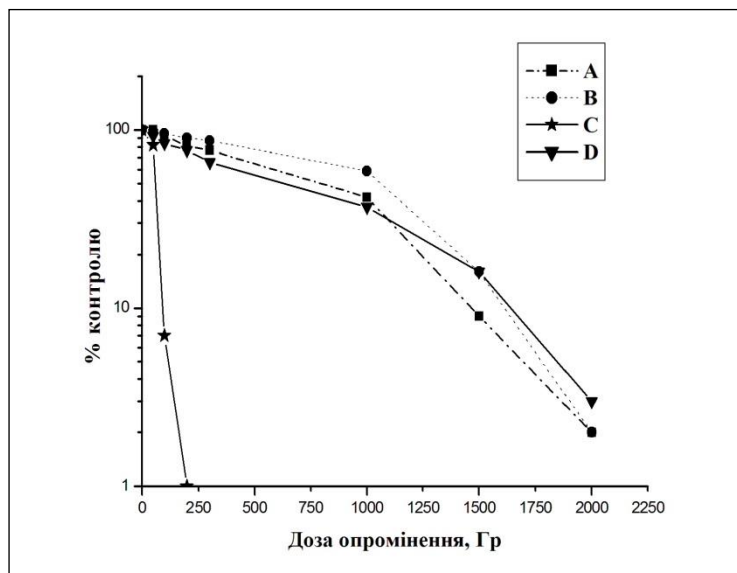
В той же час не виключається здатність такого пилку до гіногенезу та утворення партеногенетичних гаплоїдів, оскільки реститутивне генеративне ядро може приймати безпосередню участь у здійсненні потрібного запліднення центрального ядра та утворенні ендосперму. На користь такої думки також вказують дані щодо уповільнення швидкості росту пилкових трубок. Так, при дозі в 300 Гр середня швидкість росту пилкових трубок *in vitro* зменшувалась в 1,5 рази, при дозі в 1000 Гр – в 2,7 рази, а при дозі в 1500 Гр – в 6,3 рази порівняно з контролем. Дозова крива залежності швидкості росту пилкових трубок на поживному середовищі від дози опромінення пилку наводиться на рисунку 1 (крива D).

Відомо, що повільне просування пилкових трубок в маточці за умов перебігу протамної фази запліднення є важливою передумовою для електрофізіологічної стимуляції насінних зачатків та підготовки їх до нестатевого розвитку шляхом апоміксиса [16].

Суттєвою ознакою дозових кривих проростання пилку та росту пилкових трубок є наявність плеча (рис. 1, криві А, В), що вказує на перебіг процесів пострадіаційного відновлення в пилкових зернах, котрі пов'язані з синтезом елементів інтини, клітинної стінки та каллози.

На відміну дозова крива, що описує залежність мітотичного поділу генеративної клітини від дози опромінення пилку плеча не має (рис. 1, крива С). А це, в свою чергу, може непрямым чином вказувати на відсутність позапланового синтезу ДНК та її репарації в пилкових ядрах. Підтвердженням такої гіпотези є залежність репарації ядерної ДНК в пилку від пострадіаційного зволоження опроміненого пилку [17], которого в наших дослідках проведено не було.

В дослідках також було показано, що проростання опроміненого пилку зберігається ще при дозі в 2000 Гр, хоча і знаходиться на дуже низькому рівні (1 – 3 %). Крім того, з'ясовано, що середня довжина пилкових трубок з ростом дози опромінення пилку повільно зменшується в діапазоні до 1000 Гр, досягаючи при цій дозі величини в 1,5 рази менше контрольної. Після цього процес значно прискорюється, тому при дозі в 2000 Гр середня довжина пилкових трубок вже становила лише 3 % від тієї величини, що спостерігалась при 1000 Гр. (див. табл. 1, рис. 1).



Примітка: А – проростання пилку; В – довжина пилкової трубки; С – поділ генеративної клітини; D – швидкість росту пилкових трубок

Рис. 1. Залежність проростання пилку, поділу генеративної клітини та швидкості росту пилкових трубок від доз зовнішнього опромінення пилку тютюну духмяного гамма-променями ^{60}Co

Висновки і перспективи. Проведені дослідження встановили, що опромінення сухого пилку тютюну духмяного гамма-променями ^{60}Co призводить до пригнічення проростання та росту пилкових трубок при дозах опромінення вище 300 Гр, що також супроводжується помітним уповільненням швидкості росту пилкових трубок. Аналіз дозових кривих встановив наявність пострадіаційного відновлення в пилкових зернах, що був пов'язаний з процесами синтезу полісахаридного матриксу та клітинної мембрани, а не з репарацією генетичного матеріалу пилку.

Уповільнення росту пилкових трубок, відсутність утворення спермій та зменшення середньої довжини пилкових трубок є важливою передумовою адаптації та підготовки рослини до здійснення апоміксиса замість амфіміксиса.

Перспективою подальших досліджень є вивчення особливостей росту пилкових трубок гамма-опроміненого пилку *in vivo* в міжвидових та внутрішньовидових тест системах запилення, а також за умов застосування різних режимів опромінення та пострадіаційної обробки пилку.

References

1. Kundu, M., Dubey, A., Srivastav, M., Malik S. (2017). Induction of haploid plants in citrus through gamma-irradiated pollen and ascertainment of ovule age for maximum recovery of haploid plantlets. *Turkish Journal of Biology*, 41, 469–483. doi:10.3906/biy-1606-28.
2. Musial, K., Przywara, L. (1998). Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit. *Annals of Botany*, 82, 747–756. doi:10.1006/anbo.1998.0747.
3. Chalak, L., Legave, J. M. (1997). Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. *Scientia Horticulturae*, 68, 83–93. doi:10.1016/S0304-4238(96)00976-4.
4. Taskin, H., Yucel, N. K., Baktemur, G., Comlekcioglu, S., Buyukalaca S. (2013). Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with

irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Canadian journal Plant Science, 93, 1165–1168. doi:10.4141/CJPS2013-059.

5. Kurtar, E. S. Sari, N., Abak K. (2002). Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica, 127(3), 335–344. doi: 10.1023/A:1020343900419.

6. Kurtar, E. S. Balkaya, A., Ozbakir, M., Ofluoglu T. (2009). Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). African Journal of Biotechnology, 8 (21), 5944–5951. doi:10.5897/AJB09.730.

7. Lotfi, M. Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M., Earle E. D. (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Reproduction, 21, 1121–1128. doi:10.1007/s00299-003-0636-3.

8. Keller, J. (1990). Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 47(3), 241–247. doi: 10.1007/BF00024247.

9. Blasko, M. Badenes, M. L., Naval, M. M. (2016). Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production. Breeding Science, 66, 606–612. doi: 10.1270/jsbbs.16021.

10. Peixe, A. Campos, M. D., Cavaleiro, C., Barroso, M., Pais S. (2000). Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica* L., cv. “Rainha Cláudia Verde”). Scientia Horticulturae, 86, 267–278. doi: 10.1016/S0304-4238(00)00156-4.

11. Murti, R. H., Kim, H. Ye., Yeoung, Yo. Rog. (2013). Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on in vitro mutagenesis of strawberry. African Journal of Biotechnology, 12(30), 4803–4812. doi: 10.5897/AJB12.1386.

12. Pandey, K. K. (1986). “Egg-transformation” induced by irradiated pollen in *Nicotiana*: critical appraisal of Chyi and Sanford's observations. Theoretical and Applied Genetics, 72, 739–742. doi:10.1007/BF00266538.

13. Andreychenko, S. V., Grodzinskiy, D. M. (1983). Opyljajushhaja sposobnost' i rostovye svoystva pyl'cevyh zeren posle gamma-obluchenija [Pollinating ability and growth properties of pollen grains after gamma irradiation]. Fiziologija i biohimija kul'tury rastenij, 15(2), 148–152. (in Russian).

14. Pausheva, Z. P. (1980). Praktikum po citologii rastenij [Practice of plant cytology]. 3-rd ed. Moscow: Kolos, 304. (in Russian).

15. Gljants, S. (1999). Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika, 460. (in Russian).

16. Hojsgaard, D. H., Martinez, E. J., Quarin, C. L. (2013). Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. New Phytologist, 197, 336–347.

17. Grodzinskiy, D. M., Andreychenko, S. V. (1983). Vneplanovyj sintez DNK v pyl'cevyh zernah petunii gibridnoj posle gamma-obluchenija [Unscheduled DNA synthesis in pollen grains of hybrid petunia after gamma irradiation]. Doklady AN USSR. Ser. B, 9, 60–62. (in Russian).

АНАЛИЗ РОСТОВЫХ И ОПЛОДОТВОРЯЮЩИХ СВОЙСТВ ГАММА-ОБЛУЧЕННОЙ ПЫЛЬЦИ ТАБАКА ДУШИСТОГО

Л. В. Грубская, И. Н. Гудков, А. В. Клепко, С. В. Андрейченко

Аннотация. Гамма-облученная пыльца очень часто используется как инструмент генетического реконструирования растительной

клетки. По этой причине возникает потребность в проведении углубленных научных исследований для создания базовой радиобиологической теории, способной объяснить открытые явления. Целью работы было изучение действия гамма-радиации в разных дозах на прорастание пыльцы табака душистого (*Nicotiana glauca*) *in vitro*, ростовые свойства пыльцевых трубок и митотическое деление генеративной клетки на спермии. Предварительно высушенную пыльцу облучали гамма-лучами ^{60}Co в дозах 50 -3000 Гр, а потом проращивали на стерильной водопроводной воде с добавлением 10 % сахара и 0,01 % борной кислоты. Прорастание и длину пыльцевых трубок определяли с помощью окуляр-микрометра под микроскопом «МБИ-3» на увеличении $\times 150$. Ядра пыльцы окрашивали 2 %-ным раствором ацетоорсеина. Проведенные исследования показали, что гамма-радиация постепенно угнетает прорастание и рост пыльцевых трубок, а также полностью их подавляет при дозах выше 2000 Гр. В то же время деление генеративной клетки на спермии совсем прекращается уже при дозе в 300 Гр и выше. Одновременно отмечено дозозависимое замедление скорости роста пыльцевых трубок. Совокупность выявленных радиационных изменений в пыльце, как нам кажется, должна способствовать реализации гиногенеза и апомиксиса.

Ключевые слова: пыльца, *Nicotiana glauca*, пыльцевые трубки, гиногенез, апомиксис, гамма-облучение.

ANALYSIS OF GROWING AND FERTILIZING PROPERTIES OF NICOTIANA GLAUCA GAMMA-IRRADIATED POLLEN

L. V. Grubska, I. M. Gudkov, A. V. Klepko, S. V. Andreychenko

Abstract. Gamma-irradiated pollen is very often used as a tool for genetic reconstruction of plant cell. In view of this the necessity of pursuing detailed research in order to develop a basic radiobiologic theory for the explanation of discovered phenomena has emerged. The present research aimed at studying gamma-irradiation effects of different doses on germination of tobacco (*Nicotiana glauca*) pollen on artificial feeding medium, growth properties of pollen tubes and mitotic division of generative cell on sperms. The dry tobacco pollen was gamma-irradiated in the dose range 50 – 3000 Gy and then germinated in the solution of 10 % sucrose and 0,01 % boric acid in sterile tap water. Germination and the length of pollen- tubes was determined by the aid of ocular-micrometer under the light microscope “MBU - 3” at the magnification $\times 150$. The pollen nuclei were stained with 2% acetoorsein. Gamma-radiation was shown to gradually suppress germination and pollen tube growth, the doses higher than 2000 Gy being critical for said events. Meanwhile the generative cell division on sperms completely ceased at the dose 300 Gy and higher ones. Simultaneously the dose-dependent slowing of pollen tube grown speed was established. The multiplicity of physiological changes which emerged in pollen after gamma-irradiation, to our opinion, was in favour of gynogenesis and apomixis occurrence.

Keywords: pollen, *Nicotiana glauca*, pollen-tube germination, apomixes, gynogenesis, radiation

