

РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ СЕЛЕКЦІЙНО-ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ СОНЯШНИКУ

М.Ф. ПАРІЙ, К.С. СИТНИК, кандидати біологічних наук
Д.А. ЖУКОВА, науковий співробітник

Досліджено регенераційну здатність трьох типів експлантів двох генотипів соняшнику вітчизняної селекції. Показано, що ефективність регенерації за використання цієї системи культивування складає близько 8 % для котиленонових та гіпокотильних експлантів, а для корневих – регенерація не відбувається. Усі рослини-регенеранти не утворювали корені, що свідчить про необхідність подальшої оптимізації системи регенерації для цих генотипів соняшнику.

Соняшник, *Helianthus annuus*, культивування *in vitro*, регенерація.

Соняшник – одна з найважливіших олійних культур України і світу. Соняшник має незначне генетичне різноманіття, що спонукає вчених до його

розширення як методами класичної селекції, так і за допомогою біотехнологічних підходів, зокрема генетичної трансформації та соматичної гібридизації з дикими видами. Згадані технології можуть забезпечити привнесення в культурні форми соняшнику таких властивостей, як резистентність до грибних та бактеріальних інфекцій, стійкість проти шкідників, збільшення вмісту ненасичених жирних кислот тощо [1].

Однією з передумов генетичного вдосконалення рослин за допомогою біотехнологій є наявність ефективних систем регенерації *in vitro*. Загалом, тотипотентність соматичних клітин рослин, тобто здатність до диференціації, морфогенезу та формування цілої рослини, залежить від видової приналежності рослини, генотипу, конкретної тканини та типу клітин тощо. Тобто різні види і генотипи в межах виду і різні типи клітин тієї ж самої рослини мають різну здатність до регенерації. Соняшник належить до видів, для яких немає ефективних, відтворюваних та генотипонезалежних систем регенерації. У більшості випадків протокол методики, розробленої для конкретного генотипу, не є дієвим для інших форм рослин соняшнику, [2]. Тому, для кожного нового генотипу необхідно розробляти власну систему регенерації. Експериментальна робота з отримання генетично-трансформованих форм рослин таких складних з точки зору культивування *in vitro* видів,

як соняшник, охоплює як необхідний попередній етап вивчення регенераційної здатності певного генотипу, підбір оптимальних умов культивування, вибір типу експланта, оптимізацію складу регуляторів росту тощо.

Мета досліджень – підбір ефективної системи регенерації для двох генотипів соняшнику, які раніше не використовувалися із залученням методів культивування *in vitro*, для їхнього подальшого генетичного вдосконалення.

Матеріали та методика досліджень. *Рослинний матеріал.* Було використано два генотипи рослин соняшнику *Helianthus annuus* вітчизняної селекції: 1006ВНІС і АВ02. Обидва генотипи надані Всеукраїнським науковим інститутом селекції.

Для введення рослин у культуру *in vitro* проводили поверхневу стерилізацію насіння. Насіннєвий матеріал на 1 хв поміщали у 70 %-ний етиловий спирт, далі переносили на 25 хв у комерційний розчин «Білизна», розведений дистильованою водою у співвідношенні 1:2 частини води та відмивали тричі по 5 хв. у стерильній дистильованій воді. Стерильне насіння висаджували на агаризоване середовище MS і пророщували у термостаті за температури 25 °С.

Культивування in vitro та регенерація. В експериментах були використані гіпокотильні, котиледонові та кореневі експланти триденних етиольованих проростків. Система регенерації базувалася на методиці, що описана в [3]. На відміну від протоколу, в наших експериментах було використано нітрат срібла як компонент поживних середовищ. Експланти поміщали на три доби у рідке середовище RMcot такого складу: MS солі та вітаміни, 30 г/л сахарози, 500 мг/л гідролізату казеїну, 10 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л бензиламінопурину (БАП) та 1 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК). По 20 експлантів культивували у 50 мл середовища в конічних колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл при 20 °С на світлі з використанням роторного шейкеру (90 об/хв). Після культивування у рідкому середовищі експланти переносили на агаризоване середовище (12 г/л агару) такого ж складу і культивували на світлі при 20 °С. Перенесення експлантів на свіже середовище проводили через кожні 10 днів. Під час перенесення обрізали обводнені і коричневі частини експлантів, пасажуючи лише щільні зелені частини.

Регенеровані пагони відокремлювали від експлантів та переносили на середовище MS із зміненими концентраціями фітогормонів для їхнього подальшого розвитку та вкорінення. Використовували такі комбінації фітогормонів: 1) 0,15 мг/л НОК та 0,02 мг/л гіберелової кислоти (ГАЗ), 2) 0,1 мг/л індолилмасляної кислоти (ІМК) та 0,5 мг/л ГАЗ, 3) 1 мг/л ІМК та 0,5 мг/л ГАЗ.

Результати досліджень. В експериментах були задіяні два генотипи соняшнику вітчизняної селекції, для яких раніше не проводилися дослідження регенераційної здатності в умовах культивування *in vitro*.

Дослідження регенераційного потенціалу базувалося на протоколі, описаному у статті [3]. Автори статті припустили, що низька регенераційна здатність рослин соняшнику може бути пов'язана з високим вмістом одного з рослинних регуляторів росту – етилену. Для того, щоб знизити рівень етилену в експлантах, авторами запропоновано спершу культивувати експланти у рідкому середовищі протягом трьох діб, а після цього використовувати агаризоване середовище. На думку авторів, умови культивування у рідкому середовищі сприяють зниженню рівня накопичення етилену. У нашій роботі було проаналізовано регенераційну здатність корневих, гіпокотильних та котиленонових експлантів. Повне дотримання протоколу, описаного у статті, призвело до утворення сильно вітрифікованих калюсів для усіх типів експлантів та відсутності регенерації. Очевидно, це пов'язано із використанням у наших експериментах інших генотипів соняшнику. У літературі показано, що додавання нітрату срібла до поживних середовищ сприяє утворенню морфологічно нормальних регенерантів (неветрифікованих) та у цілому підвищує ефективність морфогенезу за рахунок пригнічення синтезу етилену [4, 5]. Тому, у цей протокол було вирішено внести модифікацію та додати до середовища нітрат срібла у вигляді тіосульфату. Окрім того, відомо, що підвищений вміст агару також може сприяти зменшенню оводненості експлантів, тому ми додавали агар у кількості 12 г/л (на відміну від звичайної концентрації 6-8 г/л). Ці модифікації призвели до розвитку більш щільних і зелених калюсних тканин. Генотип АВ02 формував більш щільні структури, тоді як калюсні тканини генотипу 1006ВНІС були більш обводнені і світло-зелені.

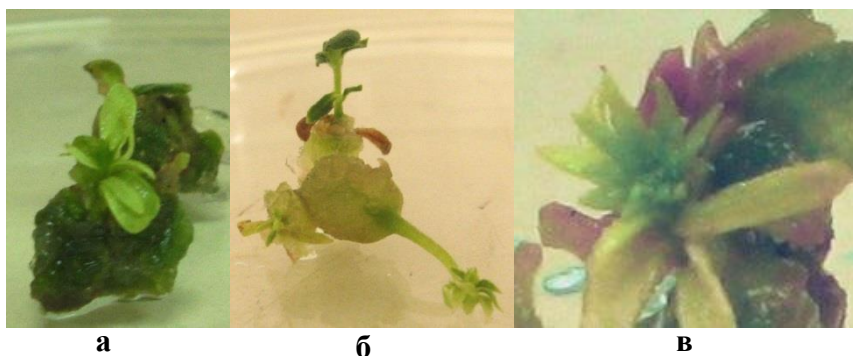
Калюси різних експлантів істотно відрізнялися як за зовнішнім виглядом, так і за регенераційною здатністю. Незважаючи на яскраво-зелений колір та щільність калюсів корневих експлантів, у них так і не вдалося індукувати морфогенез. Котиленонові та гіпокотильні експланти сформували пагони після другого пасажу на твердому середовищі. Для генотипу 1006ВНІС було отримано 4 регенерованих пагони, для генотипу АВ02 – 5 (таблиця).

Результати експериментів з вивчення регенераційної здатності соняшнику

Тип експланту	Генотип	Кількість експлантів	Кількість регенерантів	χ^2 *
Гіпокотилі	1006ВНІС	30	1	2,6
	АВ02	30	0	
Корені	1006ВНІС	30	3	-
	АВ02	30	4	
Котиледони	1006ВНІС	30	0	1,45
	АВ02	30	1	

* Рівень значимості 0,1

Усі отримані регенеранти розвивалися у напрямі формування генеративно-подібних структур. Після закладання перших кількох листочків (рисунок «а»), подальший розвиток листків і стебла припинявся, розвиток коренів взагалі не відбувався. Натомість, на верхівках пагонів розвивалися квіткоподібні структури (рис. «б» «в»). З проблемою передчасного цвітіння незрілих регенованих пагонів також стикалися інші дослідники у дослідженнях із соняшником [6]. Частково передчасне формування генеративних органів може бути обмежено додаванням до регенераційного середовища фенольних глікозидів, зокрема флоридзину чи ескуліну, хоча навіть у низьких концентраціях ці речовини можуть блокувати регенераційні процеси [7].



Морфогенез у рослин соняшнику:

а – регенерація пагона генотипу 1006ВНІС; б, в – розвиток генеративно-подібних структур

Спроби вкорінити отримані регенеранти на жаль не були успішними. Під час вирощування на середовищі для вкорінення, що запропоновано Khalid та ін., (1992 р.) (0,15 мг/л НОК та 0,02 мг/л ГА₃) регеновані пагони досить швидко засихали та гинули. Відомо, що ІМК індукує ризогенез [8, 9]. Однак у наших експериментах використання ІМК у різних концентраціях не призвело до розвитку коренів у рослин-регенерантів.

Висновки

Досліджувані генотипи здатні до регенерації *in vitro*, однак необхідно оптимізувати систему для індукції ризогенезу. У подальшій роботі варто використовувати гіпокотильні та котиledoнові експланти, але некореневі. Ефективність регенерації в цих експериментах склала близько 8 %. У ході подальшої роботи необхідно досліджувати нові чинники впливу, оптимізувати розроблену систему і підвищувати ефективність регенерації, а також залучати нові генотипи вітчизняної селекції.

Список літератури

1. Davey R. Michael, Jun Masood. Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Genetic improvement using conventional and in vitro technologies // Journal of Crop Improvement. – V. 24. – 2010. – P. 349-39.
2. Gurel E, Kazan K. Development of an efficient regeneration system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // J. of Botany. – V.22. – 1998. – P. 381-387.
3. Khalid M.B.Chraibi, Castelle J.-C., Latche A., Roustan J.-P., Fallot J. A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // The role of ethylene//Plant Science. – V. 86. – 1992. – P. 215-221.
4. Yoko Akasaka-Kennedy, Hidefumi Yoshida, Yoshihito Takahata Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO₃ and genotype // Plant Cell Rep (2005) 24: 649–654.
5. Muhammad Ramzan Khan¹, Hamid Rashid, Muhammad Ansar & Zubeda Chaudry. High frequency shoot regeneration and Agrobacterium-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2003) 75: 223–231.
6. Paterson K.E., Everett N.P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus // Plant Science. – V. 42. – 1985. – P. 125-132.
7. Burrus M, Chanabe C, Alibert G, Bidney D. Regeneration of fertile plants from protoplast of sunflower (*Helianthus annuus*)//Plant cell report. – V. 10. – 1991. – P. 161 – 166.
8. Lupi Maria Clara, Bennici Andrea, Locci Francesco, Gennai Delio. Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of *Helianthus annuus* // Plant cell, tissue and organ culture. – V. 11. – 1987. – P. 47 – 55.
9. Prathibha Devi, Swaroopa Reni. Agrobacterium rhizogenesis induced rooting of in vitro regenerated shoots of the hybrid *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosum*//Scientia Horticulturariae. – V 93. – 2002. – P. 179 – 186.

Исследована регенераційна здатність трьох типів експлантів двох генотипів підсолнуха української селекції. Показано, що ефективність регенерації при використанні даної системи культивування становить близько 8 % для гіпокотильних і котиленонових експлантів, а для корневих регенерація взагалі не відбувається. Всі рослини-регенеранти не розвивали корні, що вказує на необхідність подальшої оптимізації системи регенерації для даних генотипів підсолнуха.

Підсолнух, *Helianthus annuus*, культивування in vitro, регенерація.

Regeneration ability for three different explant types of two Ukrainian sunflower genotypes was investigated. Efficiency of regeneration for used culture system was about 8% in case of hypocotyl and cotyledon explants. For root explants regeneration was not achieved. Any of the regenerated

shoots developed root system, so the regeneration system for given genotypes needs to be improved.

Sunflower, Helianthus annuus, in vitro culture, regeneration.