

УДК 579.254.2

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИНДУКЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ IN VITRO ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ И ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА

С.И. МИХАЛЬСКАЯ, А.Г. КОМИСАРЕНКО, А.Э. МАЛИНА, Л.Е. СЕРГЕЕВА,
Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

Описан метод индукции регенерации из сегмента 3–4-суточных проростков подсолнечника, включающего часть семядоли с гипокотилем. Реализация морфогенетического потенциала через прямой органогенез достигалась на модифицированной среде МС, содержащей БАП (1 мг/л), НУК (0,1 мг/л) и тиосульфат натрия (20 мг/л). Наличие последнего в зависимости от генотипа приводило к повышению частоты регенерации и множественному побегообразованию. Показана возможность дальнейшего увеличения индукции побегообразования варьированием углеводного состава, заменой сахарозы фруктозой. В результате частота регенерации 10 тестируемых инбредных линий и гибридов составила 30–98 %.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., культура in vitro, прямой органогенез, тиосульфат натрия.

Подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.) — вторая после сои основная масличная культура в мире, главными производителями которой являются Россия, Украина, Аргентина, Китай, Румыния, Франция. Он принадлежит к семейству Asteraceae Dumort. Это диплоидное растение ($2n = 34$), внутривидовое содержание ДНК в клетках которого колеблется в пределах 6–10 пг [1, 21]. Для улучшения этой культуры методами генетической инженерии за последние десятилетия для некоторых генотипов предложены удачные протоколы индукции регенерации in vitro [4, 6, 12, 15–18, 22]. Вместе с тем реализации морфогенетического потенциала многих сельскохозяйственно-ценных линий и гибридов *H. annuus* свойственна низкая эффективность и вариабельность, а также затруднена генетическая трансформация.

Регенерация in vitro *H. annuus* может осуществляться прямым или непрямым органогенезом либо соматическим эмбриогенезом [2–4, 7, 9–11, 13, 15, 21, 24, 25]. При этом реализация морфогенетического потенциала зависит от типа эксплантата, а также генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Имеются сведения о генотипической зависимости показателей — количество побегов на общее количество эксплантатов (Р/Э) и на регенерирующий эксплантат (Р/РЭ) [9]. При идентификации генетических факторов, контролирующих органогенез подсолнечника по Р/Э и Р/РЭ, установлено 13 QTLs. Наличием как общих, так и специфических генов QTL можно объяснить различия по каждому из анализируемых показателей органогенеза (Р/Э и Р/РЭ) среди

отдельных генотипов [14]. На индукцию регенерации влияют регуляторы роста, особенно цитокинины [11, 14]. В ряде случаев интенсификации побегообразования способствуют органические и неорганические компоненты, в частности аминокислоты [26], гидролизат казеина и KNO_3 [21]. Для повышения морфогенетического потенциала культурного подсолнечника помимо оптимизации состава питательных сред предлагаются дополнительные методические приемы. В частности, для некоторых генотипов приемлемо предкультивирование эксплантатов в жидкой культуральной среде с последующим переносом на твердую агаризованную среду [15].

Цель данного исследования — оптимизировать метод регенерации *in vitro* из сегментов проростков инбредных линий и гибридов культурного подсолнечника.

Методика

Объектом исследования служили инбредные линии 96А/3, 16А/3, 70А/3 и гибриды Злыва, Згода, Одесский 504, Одесский 123, Урсус, Заклык (селекции Одесского селекционно-генетического института УААН), гибрид Харьковский (селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН, Харьков), сорт Лидер (селекции ВНИИ масличных культур, Краснодар, Россия) подсолнечника.

Зрелые ядра семян стерилизовали последовательно 96 %-м этанолом (2 мин) и 15 %-м раствором хлорамина (30—40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду МС [20]. Культивировали 3—4 сут при температуре 25—26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3—4 клк.

3—4-суточные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного эксплантата использовали сегмент проростка, состоящий из половины нижней части семядоли с расщепленной верхней частью гипокотила размером 1—2 мм. Для индукции регенерации *in vitro* эксплантаты (по 20 штук на чашку Петри) высаживали на модифицированную нами питательную среду МС, содержащую НУК и БАП в соотношении 1:10, 8 г/л агара (МСМ), и среду МСМ, дополненную 20 мг/л тиосульфата натрия (МСМТ). В качестве источника углевода в средах МСМ и МСМТ использовали 30 г/л сахарозы. Для гибридов Одесский 504 и Харьковский сахарозу заменяли фруктозой (30 г/л). До автоклавирования рН питательной среды составлял 5,7—5,8. Культивирование проводили при условиях, указанных выше. Укоренение осуществляли на МСМ-среде без фитогормонов.

Предкультивирование эксплантатов в жидкой питательной среде осуществляли в МСМ-среде, варьируя концентрации НУК, БАП и KNO_3 , при непрерывном встряхивании на ротационном шейкере в течение 2—10 сут. После этого эксплантаты переносили на твердую питательную среду аналогичного состава и культивировали при вышеуказанных условиях.

Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали как отношение числа регенерантов к общему числу эксплантатов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6—10 повторностей опыта. При ста-

статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Тип эксплантата. Одними из важных факторов, определяющих эффективность индукции регенерации *in vitro* культурных растений, в том числе и подсолнечника, являются природа эксплантата, а также стадия развития растения, из которого он вычленяется. Среди изученных нами эксплантатов (различные сегменты проростка, включая гипокотиль, семядоли, верхушки побега, части развивающихся листьев, черешков и семядолей зрелых семян) органогенез *in vitro* для всех тестируемых генотипов надежно и воспроизводимо осуществлялся при использовании сегмента проростка, состоящего из нижней части семядоли совместно с верхней частью гипокотыля. При этом максимальная частота регенерации наблюдалась у эксплантатов, полученных из 3—4-суточных проростков подсолнечника. У эксплантатов 7—8-суточных проростков регенерационная способность существенно уменьшалась. Следует отметить, что при использовании других перечисленных выше эксплантатов в зависимости от генотипа также осуществлялся органогенез, однако в единичных случаях.

Морфогенетический потенциал реализовывался преимущественно в области соединения семядолей с гипокотилем через прямой органогенез (рис. 1). Появление первых побегов было четко различимо уже на 6—7-е сутки культивирования на средах для индукции регенерации МСМ и МСМТ. Ранний органогенез и отсутствие промежуточной стадии каллю-



Рис. 1. Индукция регенерации подсолнечника

согенеза, который повышает вероятность соматклональной изменчивости, желательны при разработке методов генетической трансформации.

Отметим, что регенерация через прямой органогенез была характерна для ряда генотипов подсолнечника, где в качестве эксплантатов использованы сегменты семядоли [15], половины семядоли 2-суточных проростков [9], гипокотиль с первичным корешком незрелых зародышей [18], меристема побега и примордии листьев 2-суточных проростков [10], незрелые зародыши [24], половины семядоли с расщепленной зародышевой осью или целая семядоля с половиной зародышевой оси 6-миллиметровых незрелых зародышей [5]. Интересно, что для последних эксплантатов наблюдалось уникальное событие: в зависимости от концентрации сахарозы регенерация осуществлялась из одной и той же ограниченной зоны гипокотилия через прямой органогенез или соматическим эмбриогенезом. Об органогенезе из каллюсных культур сообщалось, в частности, при использовании в качестве эксплантатов семядолей [8], сегментов гипокотилия [2, 12, 21], незрелых зародышей на стадии глобулы и торпеды [11]. Кроме того, прямой или непрямой органогенез из одного и того же эксплантата может достигаться изменением состава фитогормонов [15]. Что касается возраста эксплантата, то его оптимум, по данным разных авторов, варьирует от 2-суточных [10] до 11-суточных проростков [21]. Максимальное количество морфогенетических событий для тестируемых нами линий и гибридов свойственно эксплантатам, полученным от 3—4-суточных проростков, на что указывали также Книттер и соавт. [16] для проанализированных ими генотипов.

Питательные среды. Для реализации морфогенетического потенциала эксплантатов тестируемых генотипов подсолнечника использовали оригинальные среды МС, Гамборга, Нича и их модификации, в которых изменяли количественный и качественный составы регуляторов роста, органических и неорганических добавок. Что касается первой, то наиболее эффективной оказалась комбинация НУК и БАП в соотношении 1:10. Для регенерации оптимальной оказалась модифицированная нами питательная среда МС (МСМТ), одним из важных компонентов которой был тиосульфат натрия концентрацией 20 мг/л. Он повышал индукцию побегообразования, особенно для генотипов с низким морфогенетическим потенциалом.

В частности, для инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3 и 16А/3 частота регенерации на среде МСМ без тиосульфата натрия составляла соответственно $31,3 \pm 2,0$, $20,2 \pm 4,6$ и $13,9 \pm 2,0$ %, тогда как введение этого неорганического компонента приводило к статистически достоверному повышению эффективности регенерации приблизительно в 1,3; 1,6; 2,4 раза и частота регенерации линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 достигала соответственно $41,5 \pm 2,3$, $31,7 \pm 1,7$, $32,9 \pm 4,0$ %. Различное влияние тиосульфата натрия на реализацию морфогенетического потенциала линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 и гибридов подсолнечника свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования подсолнечника от этого компонента питательной среды.

При культивировании на средах МСМ и МСМТ индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Однако, если на питательной среде с тиосульфатом натрия для всех генотипов было характерно наличие не менее 2 побегов на регенерирующий эксплантат, то на МСМ этот показатель для некоторых генотипов (инбредные линии 96А/3, 16А/3, 70А/3) составлял преимущественно 1.

Появление 4—5 регенерантов было редким событием. Тем не менее на отдельных эксплантатах, в частности гибридов Злыва и Харьковский, могло образовываться более 5 побегов (см. рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о генотипических различиях множественного побегообразования подсолнечника в зависимости от модификации питательной среды.

Частоту побегообразования *in vitro* инбредных линий, сортов и гибридов *H. annuus* на питательной среде МСМТ иллюстрируют такие данные:

Генотип	Частота побегообразования, %
Одесский 504	(98,2 ± 3,5), 19,2 ± 2,3
Злыва	94,3 ± 2,3
Харьковский	(86,1 ± 4,2), 45,2 ± 2,3
Зубр	72,5 ± 2,8
Урсус	67,8 ± 2,8
Заклык	48,0 ± 2,3
Згода	47,3 ± 2,3
96А/3	41,5 ± 2,3
16А/3	32,9 ± 4,0
70А/3	31,7 ± 1,7

Примечание. В скобках указана частота регенерации на МСМТ-среде, в которой сахараза заменена фруктозой.

Помимо тиосульфата натрия в отдельных случаях эффективным для повышения частоты регенерации было варьирование углеводного состава. В частности, на МСМТ-среде, содержащей вместо сахарозы фруктозу, этот показатель для гибридов Одесский 504 и Харьковский увеличился приблизительно в 5,1 и 1,9 раза (рис. 2, а), а для гибрида Злыва, наоборот, почти в 2 раза уменьшался (см. рис. 2, б). Высокий морфогенетический потенциал для гибридов Одесский 504 и Харьковский наблюдался и при использовании глюкозы (см. рис. 2, а), однако наличие этого углевода приводило к повышению частоты преждевременного цветения. Тем не менее среди использованных углеводов (сахароза, глюкоза, фруктоза, мальтоза) для большинства те-

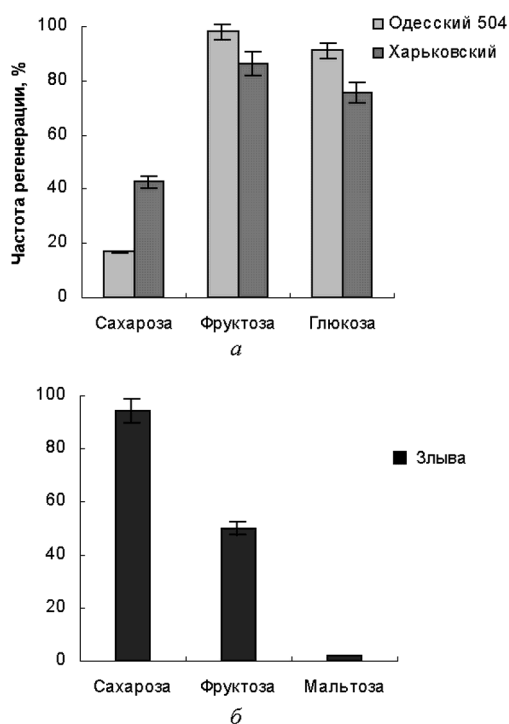


Рис. 2. Влияние содержания углеводов в питательной среде на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника

стируемых нами генотипов процесс регенерации максимально реализовывался при наличии сахарозы, а мальтоза, наоборот, во всех случаях оказывала ингибирующее действие.

Скрининг 10 линий и гибридов на регенерацию *in vitro* *H. annuus* по предложенному нами протоколу показал значительное варьирование морфогенетического потенциала (от ~ 30 до 98 %). Несмотря на генотипическую зависимость, предложенный протокол является перспективным для генетической трансформации культивируемых генотипов.

Предкультивирование эксплантатов в жидкой питательной среде. Чрейти и соавт. [8] предложили двухступенчатую систему регенерации подсолнечника, на первом этапе которой эксплантаты (семядоли) предварительно инкубировали в жидкой питательной среде с последующим переносом их на агаризованную среду, в результате чего повышалась частота побегообразования. Мы проанализировали эффективность такого приема для используемого нами эксплантата на питательной среде МСМ, варьируя концентрации НУК, БАП, KNO_3 и длительность культивирования. Отмечены существенные изменения эксплантатов: они приобретали ярко-зеленую окраску и почти 3-кратно увеличивались в размере. Частота регенерации зависела от генотипа, комбинации фитогормонов и KNO_3 , а также длительности культивирования в жидкой среде. Оптимальной для исследуемых генотипов оказалась МСМ-среда, в которой содержание НУК и KNO_3 было повышено соответственно до 1 мг/л и 6,9 г/л, а длительность предкультивирования составляла 7—10 сут. Так, для сорта Лидер, гибрида Одесский 123, линий 789 и 6913 частота побегообразования приблизительно равнялась соответственно 30; 5; 78 и 46 %. В контрольных экспериментах, в которых те же эксплантаты культивировали на агаризованной среде такого же состава, частота регенерации была почти в 3 раза меньшей. Следует отметить, что этот подход не всегда дает положительный результат [10].

Таким образом, для повышения индукции побегообразования из эксплантата — сегмента семядоли с частью гипокотилия проростков линий и гибридов подсолнечника показана эффективность применения тиосульфата натрия в модифицированной нами питательной среде МС. Наряду с этим для некоторых генотипов целесообразно варьирование углеводного состава с заменой сахарозы фруктозой. Предложенный способ регенерации через прямой органогенез может быть использован при разработке системы методов генетической трансформации.

1. Анисимова И.Н. Геномный анализ рода *Helianthus* L. // Генетика. — 1984. — 20, № 12. — С. 1925—1933.
2. Зезуль Т.Г., Горбатенко Э.В., Ралдугина Г.Н. Регенерация *in vitro* растений подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) через соматический эмбриогенез // Там же. — 1995. — 31, № 2. — С. 228—233.
3. Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology // Plant Physiol. Biochem. — 1994. — 32. — P. 31—44.
4. Albert B., Lucas O., Gall V.L., Albert G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression // Physiol. Plant. — 1999. — 106. — P. 232—237.
5. Bronner R., Jeannin G., Hahne G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*) // Can. J. Bot. — 1994. — 72, N 2. — P. 239—248.
6. Burrus M., Molinier J., Himber C. et al. Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: Transformation patterns // Mol. Breed. — 1996. — 2, N 4. — P. 329—338.

7. Carola M., Trabase T., Sunseri F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledon via somatic embryogenesis // Plant Cell Rep. — 1997. — **16**. — P. 295—298.
8. Chraïbi B.M., Latche A., Roustan J.P., Falloï J. Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Ibid. — 1992. — **10**. — P. 613—620.
9. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 1997. — **48**. — P. 127—130.
10. Dong-Ho Shin D.-H., Kim J.S., Yang J. et al. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. — 2000. — **36**. — P. 273—278.
11. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop. Sci. — 1989. — **29**. — P. 201—205.
12. Everett N.P., Roberson K.E.P., Mascarenhas D. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Biotechnology. — 1987. — **5**, N 11. — P. 1201—1204.
13. Finer D.B. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose-containing medium // Plant Cell Rep. — 1987. — **6**. — P. 372—374.
14. Flores Berrious E., Gentzbitel L., Kayyal H. et al. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet. — 2000. — **101**. — P. 1299—1306.
15. Greco B., Tanzarella O.A., Carozzo G., Blanco A. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Plant Sci. Lett. — 1984. — **36**. — P. 73—77.
16. Hewezi T., Perrault A., Alibert G., Kallerhoff J. Dehydrating immature embryo split apices and rehydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new methods for genetically transforming recalcitrant sunflower // Plant Mol. Biol. Rep. — 2002. — **20**, N 4. — P. 335—345.
17. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // Plant Cell Rep. — 1994. — **14**. — P. 81—86.
18. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // Mol. Breed. — 2000. — **6**. — P. 479—487.
19. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transg. Res. — 2001. — **10**. — P. 435—444.
20. Murashighe T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—497.
21. Paterson K.E., Everett N.P. Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus // Plant Sci. — 1985. — **42**. — P. 125—132.
22. Price H.J., Jonston J.S. Influence of light on content of *Helianthus annuus* Linnaeus // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — **93**. — P. 11264—11267.
23. Rousselin P., Molinier J., Himber C. et al. Modification of sunflower oil quality by seed-specific expression of heterogenous Delta 9-stearoyl-(acyl carrier protein) desaturase gene // Plant Breed. — 2002. — **121**, N 2. — P. 108—116.
24. Sujatha M., Prabakaram A.J. High frequency of embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 2001. — **65**. — P. 23—29.
25. Wilcox McCann A., Cooley G., Van Dreser J. A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryos derived callus // Ibid. — 1988. — **14**. — P. 103—110.
26. Witzens B., Scofcroft W.R., Downes R.W., Larkin P.J. Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* × *H. annuus*) // Ibid. — **13**. — P. 61—76.

Получено 22.01.2009

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ ІНДУКЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ IN VITRO ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ СОНЯШНИКА

С.І. Михальська, А.Г. Комісаренко, А.Е. Малина, Л.Є. Сергєєва, О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Описано метод індукції регенерації із сегмента 3—4-добових проростків соняшника, до якого входить частина сім'ядолі з гіпокотилем. Морфогенетичний потенціал прямим орга-

ногенезом реалізувався на модифікованому середовищі МС, що містило БАП (1 мг/л), НУК (0,1 мг/л) і тиосульфат натрію (20 мг/л). Наявність останнього залежно від генотипу зумовлювала підвищення частоти регенерації і численного пагоноутворення. Показано можливість подальшого збільшення індукції пагоноутворення варіюванням вуглеводного складу, заміною сахарози на фруктозу. В результаті частота регенерації 10 тестованих інбредних ліній і гібридів досягла 30–98 %.

OPTIMIZATION OF METHOD FOR INDUCTION REGENERATION IN VITRO OF INBRED LINES AND HYBRIDS OF SUNFLOWER

S.I. Mykhalska, A.G. Komisarenko, A.E. Malina, L.E. Sergeeva, E.N. Tishchenko

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

The method of regeneration induction from segment of seedling 3–4-days after germination which consists of fragment of cotyledon with hypocotyl is described. Realization of morphogenetic potential by direct organogenesis was achieved on MS medium supplemented BAP (1 mg/l), NAA (0.1 mg/l), with thiosulfate Na (20 mg/l). Using thiosulfate Na, the genotype-dependent increase of number both shoots per explants plated and shoots per regenerating explants take place. Possibility of enhancement of regeneration induction by variation of carbohydrates, when sucrose replaced by fructose, was shown. As a result, the regeneration rate was varied 30–98 %.

Key words: *Helianthus annuus* L., culture in vitro, direct organogenesis, thiosulfate Na.