

свидетельствуют о значительной зависимости каллусогенеза, морфогенеза от среды культивирования, ризогенеза – от генотипа образца.

Results of 10 pea (*Pisum sativum* L.) cultivars *in vitro* cultivation show, that callusogenesis, shoot formation more depend from medium components, risogenesis – from genotype.

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

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,*

*Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com*

### **ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА**

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L.) является одной из важнейших масличных культур, однако на мировом рынке еще не появились его биотехнологические продукты. Основными причинами, которые замедляют прогресс в улучшении этой культуры методами генетической инженерии, являются отсутствие рутинной системы регенерации и низкая эффективность стабильной трансформации [1].

Основное внимание исследователей при разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника обращено на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию, за счёт которой наиболее часто наблюдается стабильная интродукция рекомбинантных молекул в его геном [2]. Несмотря на компетентность к агробактериальной инфекции, *H. annuus* с трудом поддается классическим методам агробактериальной трансформации. Прогресс в повышении частоты трансформации был достигнут с разработкой способа поранения эксплантатов бомбардировкой микрочастицами вольфрама до инокуляции с агробактериями [4]. Другие подходы связаны с обезвоживанием и последующей регидратацией, инфльтрацией, использованием пектиназ [5,6]. Тем не менее, эффективность трансформации подсолнечника все еще остается на низком уровне, поэтому существует необходимость оптимизации системы методов интродукции Т-ДНК в его геном.

Для повышения частоты трансформации некоторых культур успешно применяют ультразвуковую обработку [8]. В связи с этим на первоначальном этапе работы мы анализировали влияние ультразвука на морфогенетический потенциал инбредных линий подсолнечника, где в качестве эксплантата при культивировании *in vitro* использовали сегмент 4-дневного этиолированного проростка.

#### **Материалы и методы**

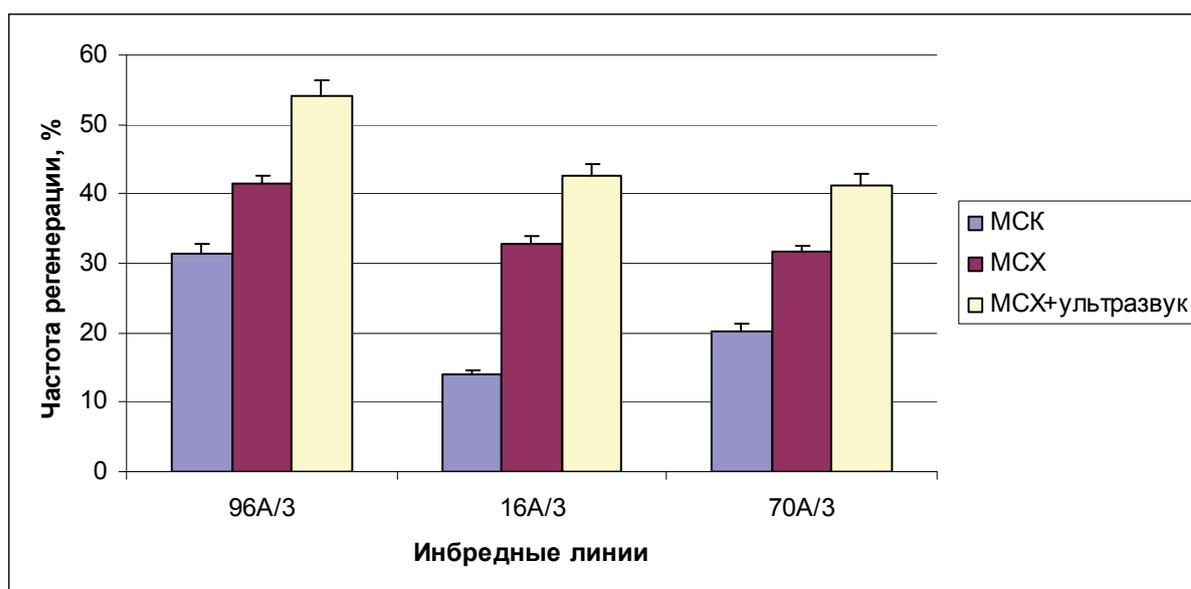
Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника: 96А/3, 16А/3 и 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института). Зрелые семена стерилизовали 96% раствором этанола на протяжении 2 мин и 10% раствором хлорамина 30-40 мин с последующим трехкратным промыванием в дистиллированной воде. Затем высаживали на питательную среду Мурашиге-Скуга (МС); культивировали 4 дня при температуре 25 °С – 26 °С. В качестве первичного эксплантата использовали часть семядоли с гипокотилем, которые подвергали действию ультразвука с использованием ультразвукового диспергатора УЗДН-1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С. После этого эксплантаты высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (контроль, МСК) [3], дополненную химическим компонентом, содержащим сульфгидрильную группу (МСХ). Частоту регенерации исследуемых линий оценивали как процентное соотношение регенерантов к общему количеству или эксплантатов (S/E), или регенерирующих эксплантатов (S/RE).

#### **Результаты и обсуждение**

Для *H. annuus* за последние 10 – 20 лет предложено ряд протоколов регенерации, которые могут быть использованы при разработке системы методов генетической трансформации, важным фактором при этом является природа и стадия развития эксплантата [8]. Проведенный нами скрининг 11 сортов и гибридов подсолнечника отечественной селекции показал, что для индукции регенерации путём прямого органогенеза наиболее удачным эксплантатом являлся сегмент побега (часть семядоли с гипокотилем) этиолированных проростков на ранних стадиях их роста и дифференцировки, тогда как органогенез из семядолей, гипокотилей, сегментов листьев, зрелых зародышей наблюдался очень редко. Оптимальной для тотипотентности была модифицированная нами среда МС, при использовании которой регенерационная способность изменялась в пределах  $\sim 20 \div 95$  %.

Нами введено в культуру *in vitro* и при аналогичных условиях проанализирован регенерационный потенциал инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3 и 16А/3, частота регенерации которых составила  $31,3 \pm 2,0$ ,  $20,2 \pm 4,6\%$  и  $13,9 \pm 2,0$ , соответственно (рис.). Индукция побегообразования осуществлялась путём прямого органогенеза, что желательно для снижения уровня соматической изменчивости при генетической трансформации. Дополнительное введение в питательную среду химического агента, содержащего сульфгидрильную группу, повышало эффективность регенерации приблизительно в 1,3, 1,6 и 2,4 раза, где частота регенерации линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 составляла  $41,5 \pm 2,3$ ,  $31,7 \pm 1,7$ ,  $32,9 \pm 4,0$ , соответственно.

Следует отметить, что в литературе имеются сведения о генотипической зависимости признаков - количество побегов на общее количество эксплантатов (S/E) и на регенерирующий эксплантат (S/RE) [9]. При идентификации генетических факторов, контролирующих органогенез подсолнечника по признакам S/E и S/RE, установлено 13 QTLs. Наличие как общих, так и специфических QTLs позволяет объяснить различия по каждому из анализируемых признаков органогенеза (S/E, S/RE) среди отдельных генотипов [10]. Что касается S/E тестируемых нами инбредных линий подсолнечника, культивируемых на питательных средах МСК и МСХ, то по этому параметру среди них наблюдаются статистически достоверные различия. Это свидетельствует о различном влиянии химического агента, содержащего сульфгидрильную группу, на морфогенетический потенциал линий 96А/3, 70А/3, 16А/3.



**Рис.** Влияние ультразвуковой обработки на морфогенетический потенциал инбредных линий подсолнечника

Изучение влияния ультразвука на частоту регенерации из эксплантатов, культивируемых на среде МСХ, показало увеличение частоты побегообразования приблизительно в 1,3 раза для всех изученных генотипов, где значения S/E составили для линий 96А/3, 70А/3, 16А/3  $54,2 \pm 3,4$ ,  $41,3 \pm 2,5$ ,  $42,7 \pm 5,1$ , соответственно (рис.). Однако достоверные различия наблюдали только для генотипа 70А/3 и 96А/3, что свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования под влиянием ультразвуковой обработки эксплантатов.

В отличие от контроля при культивировании на питательной среде МСХ без и с ультразвуковой обработкой индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Количество побегов на регенерирующий эксплантат варьировало от 1 до 5, где доля первых составляла около 90 - 95 %. Среди оставшихся 5 – 10 % чаще всего индуцировалось по 2 побега на эксплантат, а появление 4 – 5 регенерантов было редкое событие. При биологических повторностях опыта различия по признаку S/RE между всеми тестируемыми линиями были не достоверны. То есть четко выраженной генотипической зависимости множественного побегообразования от ультразвука при выбранных условиях культивирования не наблюдается. Это означает, что определяющим фактором, оказывающим влияние на реализацию морфогенетического потенциала, представленного в виде нескольких побегов, является химический агент с SH-группой.

Таким образом, под влиянием ультразвука для культурного подсолнечника наблюдается тенденция к повышению частоты индукции регенерации, однако на процессы множественного побегообразования этот физический фактор, видимо, не оказывает существенного влияния. Однако, несмотря на генотипическую зависимость реализации морфогенетического потенциала, который по крайней мере может не снижаться при ультразвуковой обработке, как и для других культур, следует ожидать увеличение интродукции Т-ДНК в геном *H. annuus*. Такое допущение основывается на предположениях [цит. по 7], согласно которым микропоранение клеток тканей может приводить к более глубокому проникновению агробактерий, чем при обычных условиях кокультивирования, таким образом повышая её колонизацию и способность к инфицированию. Кроме того, в результате активного деления клеток, сопровождающегося синтезом ДНК, возможно повышение вероятности включения Т-ДНК в ядерный геном.

#### Литература

1. Тищенко Е.Н., Михальская С.И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – т.38, №3. С.187-196.
2. Lappara H., Burrus M., Hunold R., Damm B., Bravoangel A.M., Bronner R., Hahne G. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus*) – evaluation of 3 gene-transfer methods // Euphytica. – 1995. – 85, N1-3. – P.63-74.
3. Михальская С.И. Усовершенствование методики регенерации подсолнечника *Helianthus annuus in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів – К.: Аграрна наука, 2003. – С. 425-427.
4. Bidney D., Scelonge C., Martich J., Burrus M., Sims L., Huffman G. Microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Mol. Biol. – 1992. – 18. –P.301-313.
5. 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  $\beta$ -glucuronidase expression // Physiology Plantarum. – 1999. – 106. – P.232-237.
6. Hewezi T., Perrault A., Alibert G., Kallerhoff J. Dehydrating immature embryo split apices and re hydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new methods for genetically transforming recalcitrant sunflower // Plant Mol Biol Rep. – 2002. – 20, N4. – P.335-345.

7. Amoah B.K., Wu. H. Sparks, C., Jones H.D. Factors influencing Agrobacterium – mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue // *Jorn. of Exper. Botany.* – 2001. - V. 52. – N. 358. – P. 1135-1142
8. 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.
9. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1997. – 48. – P. 127-130.
10. Flores Berrious E, Gentzbittel L., Kayyal H., Alibert G., Sarrafi A. 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.

#### **Резюме**

Исследовали влияние ультразвука на регенерационную способность инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Показано, что повышение частоты регенерации путём прямого органогенеза зависит от генотипа и что ультразвуковая обработка не оказывает существенного влияния на процессы множественного побегообразования.

Досліджували вплив ультразвуку на регенераційну здатність інбредних ліній соняшника (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3. Встановлено, що підвищення частоти регенерації шляхом прямого органогенезу залежить від генотипу та що ультразвукова обробка не має значного впливу на процеси множинного пагануотворення.

The ultrasound affect on regeneration possibility of inbred lines (*Helianthus annuus* L.) 96A/3, 16A/3 и 70A/3 are studied. It has been shown that increase of regeneration frequency by direct organogenesis depends on genotype, as well as the sonication don't influence on processes of multiply shoot formation.

#### **КОРМИЛЬЦЕВ Б.Ф.**

*Институт сельского хозяйства Полесье УААН*

*Киевское шоссе 131, Житомир, 10007, Украина, E-mail: isgpo@polesye.net*

#### **КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ХМЕЛЯ (HUMULUS LUPULUS L)**

Хмель является важной технической культурой незаменимой для пивоварения, продукция которого также используется в фармакологии и парфюмерии.

Биотехнологические исследования, проводимые с этой культурой, касались в основном разработки методов культуры апикальных меристем с целью оздоровления растений от вирусных болезней [1,2] и созданию технологий микрклонального размножения [3,4,5].

Работам по изучению каллусогенеза в культуре тканей хмель уделялось мало внимания. Известны лишь отдельные публикации, в которых авторы частично затрагивают некоторые аспекты индукции каллусогенеза в контексте разработки методов размножения [6,7].

Известно, что каллусная ткань может служить источником генетического разнообразия и применяться для создания новых генотипов, а также доработки и улучшения сортов. На основе каллусной ткани разрабатываются биотехнологии для получения различных незаменимых для промышленности и фармакологии органических соединений вторичного метаболизма [8,9].