

УДК 633.854.78:631.527

## АНДРОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* ГЕНЕТИЧЕСКИ МАРКИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Костина Е.Е., Лобачев Ю.В., Ткаченко О.В.

*ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет», Саратов, Россия (410012, Саратов, Театральная площадь, 1), e-mail: kostinaee@yandex.ru*

Изучены этапы морфогенеза в культуре пыльников *in vitro* генетически маркированных линий подсолнечника. Установлено, что в процессе андрогенеза могут быть реализованы два пути морфогенеза: формирование эмбриодов и органогенез почек, листьев и корней. Определено влияние углеводов в составе индукционной питательной среды и фитогормонов в среде для регенерации. Использование сахарозы по сравнению с мальтозой в среде для культивирования пыльников повышает эффективность каллусогенеза. Выявлена высокая способность к морфогенезу на питательной среде Мурасига-Скуга с добавлением 1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л ИУК и 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>. Введение в генофонд линии подсолнечника ЮВ-28Б четырех генов окраски язычковых цветков повышает способность клеток и тканей к каллусогенезу и морфогенезу в культуре *in vitro*. Наибольшее количество корней и листовидных структур формировалось на каллусах линии с геном *l*. Проведенные исследования позволяют расширить знания о регуляции процессов каллусогенеза и морфогенеза клеток и тканей подсолнечника *in vitro*.

Ключевые слова: подсолнечник, андрогенез, каллусогенез, генотип, маркеры, углеводы.

## ANDROGENESIS IN ANTHHER CULTURE IN VITRO GENETICALLY MARKED LINES OF SUNFLOWER

Kostina E.E., Lobachev Y.V., Tkachenko O.V.

*Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia (410012, Saratov, Theatre square, 1), e-mail: kostinaee@yandex.ru*

Studied the morphogenesis in anther culture *in vitro* genetically marked lines of sunflower. It is established that the process of androgenesis *in vitro* can be realized in two morphogenesis pathways: formation of embryoids or organogenesis of shoots, leafs and roots. The influence of carbohydrates in induction medium and growth hormones in the regeneration medium. The use of sucrose as compared with maltose in the culture medium for anther increases the efficiency of callusogenesis. Identified high ability to morphogenesis in regeneration M-S medium with the addition of 1 mg/l of kinetin, 0.1 mg/l IAA and 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>. Introduction four ray flowers coloring genes into the background of line sunflower YV-28B increase the ability of cells and tissues to the callusogenesis and morphogenesis *in vitro*. The greatest number of roots and leaf type forms were formed on the callus lines with gene *l*. The conducted research allows us to expand our knowledge about the regulation of the processes of callusogenesis and morphogenesis of cells and tissues of sunflower *in vitro*.

Keywords: sunflower, androgenesis, callusogenesis, genotype, markers, carbohydrates.

Перспективным направлением использования биотехнологических методов в селекции растений является получение гаплоидов в культуре пыльников и микроспор *in vitro*. Использование гаплоидов в селекции позволяет сократить продолжительность этапов селекционного процесса, увеличить спектр генетического разнообразия и повысить эффективность отбора. Культивирование *in vitro* изолированных пыльников и микроспор, неоплодотворенных завязей и семяпочек позволяет решить проблему массового получения гаплоидов у различных видов растений. Для многих сельскохозяйственных культур (пшеница, тритикале, ячмень, рис, кукуруза и другие) в этой области достигнуты существенные успехи [7]. Но при работе с культурой клеток и тканей *in vitro* подсолнечника эффективная методика получения растений-регенерантов не создана. Во всероссийском

научном институте масличных культур установлено, что методики культивирования клеток и тканей *in vitro*, разработанные на модельных видах из семейства пасленовых, не могут быть использованы на подсолнечнике, так как его клетки отличаются слабой регенерационной способностью, которая существенно зависит от генотипа донорного растения [2]. В работах зарубежных исследователей показана возможность регенерации растений в культуре пыльников некоторых дикорастущих видов подсолнечника или их межвидовых гибридов с культурным видом [4, 6, 8-10].

Решить проблему получения гаплоидных растений невозможно без глубокого изучения процесса морфогенеза гаплоидных клеток и тканей *in vitro*, влияющих на него факторов, в том числе генотипа донорных растений. Известно, что на процесс эмбриогенеза влияют генетические и физиологические факторы, стадии развития бутона, пыльника и микроспор, состав питательной среды и условия культивирования [4, 6, 8-10].

В селекции гетерозисных гибридов подсолнечника важное значение имеет использование маркерных генов. С этой целью применяют рецессивные гены, имеющие четкое фенотипическое проявление. Изучение эффектов таких генов проводят на основе почти изогенных или высоко беккроссных линий. Маркерные гены не должны существенно воздействовать на хозяйственно-ценные признаки, но могут оказывать плейотропные эффекты на другие признаки [1].

**Целью** данного исследования являлось изучение влияния маркерных генов и состава питательной среды на эффективность андрогенеза в культуре пыльников подсолнечника *in vitro*.

#### **Материал и методы исследования**

Объектами исследований служили самофертильная линия ЮВ-28Б и набор линий с генами *l*, *la*, *o*, *pa*, контролирующими нестандартную окраску язычковых цветков подсолнечника. Все линии созданы в генофоне линии ЮВ-28Б методом беккроссов.

Донорные растения исследуемых генотипов выращивали в полевых условиях. Корзинки срезали и стерилизовали в течение 15 минут 30 % хлорсодержащим препаратом «Белизна», затем промывали стерильной дистиллированной водой. С целью контроля соответствия морфологических критериев величины корзинки и размера цветков оптимальной стадии вакуолизированных одноядерных микроспор, проводили цитологический анализ под микроскопом на давленных препаратах, окрашенных ацетокармином по методике Паушевой З.П. [3].

В асептических условиях ламинар-бокса вычленили неокрашенные пыльники и помещали на питательную среду. Использовали среду Мурасиге-Скуга с увеличенным содержанием нитрата калия  $KNO_3$  до 3,1 г/л, гидролизата казеина 400 мг/л и добавлением

фитогормонов:  $\beta$ -индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 Д) 2 мг/л, 6-бензиламинопурина (6 БАП) 0,5 мг/л. Для изучения влияния углеводов добавляли мальтозу или сахарозу в концентрации 30 г/л.

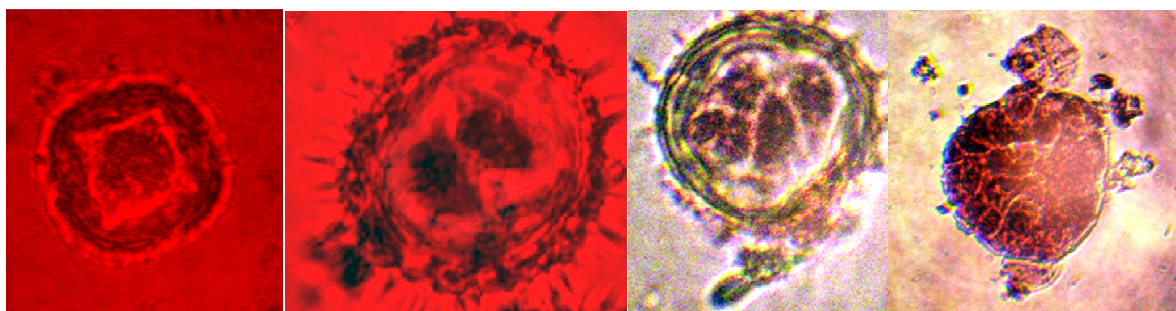
Опыт проводили в четырехкратной повторности по 100 пыльников каждая.

Анализ полученных на пыльниках новообразований проводили на 30 сутки культивирования. Полученные новообразования для регенерации переносили на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 6 БАП 0,5 мг/л, сахарозы 30 г/л, гидролизата казеина 500 мг/л, инозита 100 мг/л, глицин 2 мг/л и витамины: В<sub>1</sub> – 10 мг/л, В<sub>2</sub> – 5 мг/л, В<sub>6</sub> – 10 мг/л, В<sub>12</sub> – 0,015 мг/л, РР – 20 мг/л, С – 5 мг/л, фолиевая кислота – 5 мг/л, биотин – 2,5 мг/л. На следующем пассаже каллусы неоднородной структуры для инициации морфогенеза переносили на шесть вариантов сред, различающихся по составу гормонов: 1) 6 БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,1 мг/л; 2) 6 БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,1 мг/л + AgNO<sub>3</sub> 10 мг/л; 3) Кинетин 1 мг/л + ИУК 0,1 мг/л; 4) Кинетин 1 мг/л + ИУК 0,1 мг/л + AgNO<sub>3</sub> 10 мг/л; 5) 6 БАП 0,5 мг/л + ИУК 0,1 мг/л; 6) Кинетин 1 мг/л + ИУК 0,1 мг/л. Последующее пассирование каллусов и вновь образованных структур проводили на первоначальную среду для регенерации. В конце каждого пассажа подсчитывали количество каллусов с зонами морфогенеза, почками, листовидными структурами и корнями.

Полученные данные обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа с использованием пакета программ Agros 2.10.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

На других культурах выделяют два основных пути морфогенеза [5]. Первый путь – это прямой эмбриогенез через образование соматических эмбриоидов. Второй путь – вторичный эмбриогенез и органогенез через формирование каллуса, а затем вторичную дифференциацию эмбриоидов и почек. В ходе цитологических исследований наблюдали, что большинство микроспор оставались без изменения, у них утолщалась клеточная стенка, цитоплазма сжималась и ядро занимало весь объем (рис. 1а). У части микроспор наблюдался процесс деления ядра, были обнаружены двуядерные (рис. 1б) и многоядерные микроспоры (рис. 1в), а также проэмбриональные комплексы (рис. 1г).



а

б

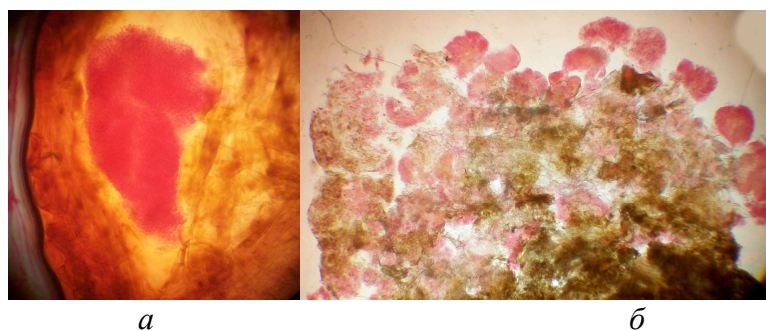
в

г

*Рис. 1. Анализ культуры пыльников подсолнечника на 30 сутки культивирования:*

*а- неразвивающиеся микроспоры, б- двуядерные микроспоры, в- многоядерные микроспоры, г- проэмбриональный комплекс*

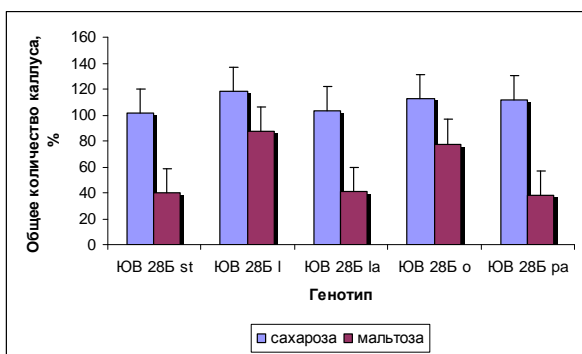
Наблюдалось формирование единичных и множественных эмбриоидов (рис. 2а, б) по форме схожих с эмбриоидами злаков [5], что соответствует прямому эмбриоидогенезу. Цитологический анализ каллусов показал, что в них формируются множественные эмбриоиды (рис. 2б). Это соответствует второму пути морфогенеза.



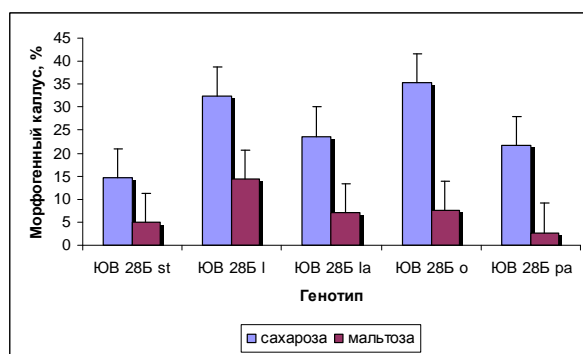
*Рис. 2. Формирование эмбриоидов: а- эмбриоид подсолнечника, б- множественное образование эмбриоидов в клетках каллусов*

На 30 сутки культивирования на пыльниках наблюдали большое количество каллусов двух типов – в основании пыльника на раневой поверхности соматический каллус и на боковой поверхности пыльника, предположительно андроклининого происхождения.

Эффективность каллусогенеза зависела от углеводного состава питательной среды и эффекта генотипа. Применение сахарозы в концентрации 30 г/л по сравнению с мальтозой в среднем за 3 года существенно повышало каллусогенез у изученных линий: у линии стандарта на 61%, у остальных линий от 31 до 62 %, в среднем почти на 42 %. Скрининг линий на среде с добавлением сахарозы 30 г/л показал, что все четыре линии достоверно превосходили линию стандарт по выходу каллуса от 7 до 21%, в среднем на 14%. На среде с добавлением мальтозы одна линия достоверно превосходила стандарт на 9,33 %, остальные линии находились на уровне стандарта (рис. 3а, б).



а



б

Рис. 3. Влияние углеводного состава и эффекта генотипа на процесс каллусогенеза подсолнечника *in vitro*: а - общий выход каллуса, б - выход эмбриогенного каллуса

При последующем культивировании каллусов на среде для регенерации происходило оводнение каллусов, они активно разрастались, легко делились на части. После нескольких пассирований такие каллусы темнели и некротировали. Часть каллусов имели неоднородную структуру, в процессе пассирования они зеленели и приобретали механическую плотность. В последствии, на них формировались корни и почки с листовидными структурами.

Способность каллусов к пассированию и морфогенезу зависела от генотипа донорных растений и состава питательной среды. Анализ результатов с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и сравнения частных средних по тесту Дункана позволили оценить влияние каждого из этих факторов.

Состав среды оказывал достоверное влияние на процесс роста и морфогенеза в каллусах. Достоверно более высокая жизнеспособность каллусов наблюдалась на средах 2, 3, 4 и 6 (рис. 4а). Максимальный выход морфогенных каллусов наблюдался на питательной среде 4, содержащей Кинетин, ИУК и нитрат серебра. Наименьший уровень данного показателя наблюдался на средах 1 и 5, содержавших 0,5 мг/л БАП. На остальных средах отмечен средний уровень морфогенеза в каллусах (рис. 4б).

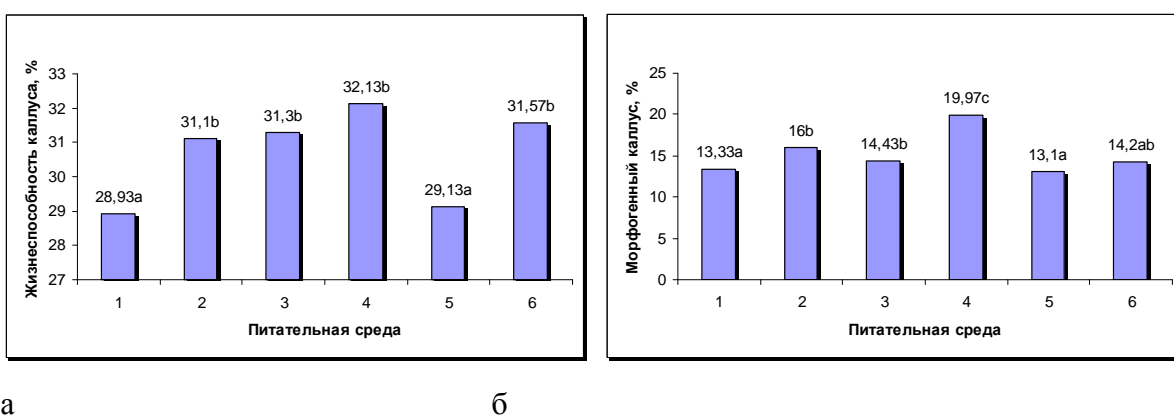
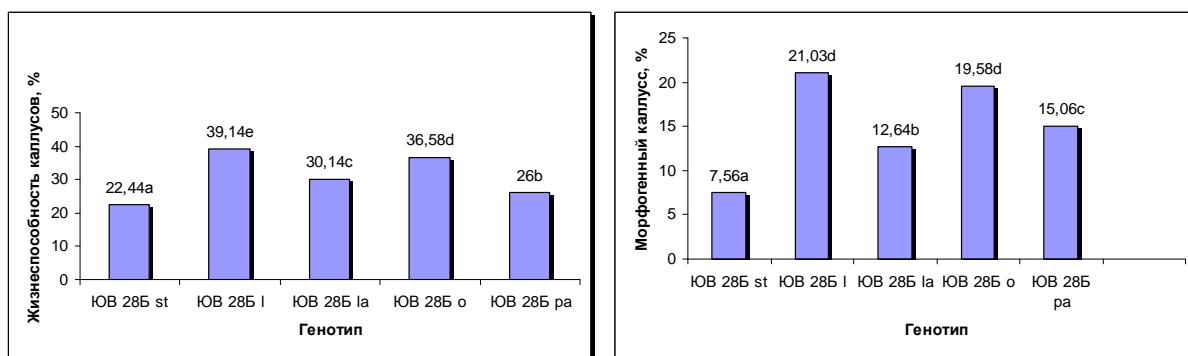


Рис. 4. Влияние состава питательной среды для регенерации на процесс морфогенеза подсолнечника *in vitro*: а - жизнеспособность каллуса на разных питательных средах, б - выход морфогенного каллуса на разных питательных средах

Установлен существенный эффект генотипа донорных растений на сохранность каллусов в процессе пассирования и формирование в них морфогенных зон (рис. 5а, б). По сравнению с линией-стандартом у всех линий, несущих маркерные гены окраски язычковых цветков, выход каллусов был достоверно выше, при этом максимальная сохранность каллусов наблюдалась у линии с геном *l*, следующими по данному признаку в порядке убывания были линии с генами *o*, *la* и *pa*. По показателю выход морфогенных каллусов у линий с генами *l* и *o* установлено достоверное превосходство по сравнению с линией-

стандартом и другими линиями. Линии с генами *la* и *pa* отличались средним уровнем выхода морфогенных каллусов: выше линии-стандарта, но ниже, чем у линий с генами *l* и *o*.



а

б

Рис. 5. Влияние эффекта генотипа на процесс морфогенеза подсолнечника *in vitro*: а - жизнеспособность каллуса разных генотипов, б - выход эмбриогенного каллуса разных генотипов

После пяти пассирований на каллусах формировались корни и почки. Линия-стандарт ЮВ-28Б и линия с геном *pa* формировали на каллусах только корни. У остальных линий наблюдалась регенерация почек. У линий с генами *l* до 90% каллусов формировали зеленые почки и корни в примерно равном соотношении. У линии с геном *o* около половины каллусов были способны к органогенезу. Образование альбиносных регенерантов, часто наблюдаемых в культуре пыльников *in vitro*, в данном исследовании не наблюдалось.

### Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что в процессе андрогенеза в культуре пыльников подсолнечника *in vitro* могут быть реализованы два пути морфогенеза: формирование эмбриодов и органогенез почек, листьев и корней.

Использование сахарозы по сравнению с мальтозой в среде для культивирования пыльников повышает эффективность каллусогенеза. Высокая способность к морфогенезу в каллусах всех изучаемых генотипов наблюдалась при добавлении 1 мг/л Кинетина, 0,1 мг/л ИУК и 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>.

Введение в генофонд линии ЮВ-28Б генов окраски язычковых цветков повышает способность клеток и тканей подсолнечника к каллусогенезу и морфогенезу в культуре *in vitro*. Наибольшее количество корней и листовидных структур формировалось на каллусах линии с геном *l*.

Проведенные исследования позволяют расширить знания о регуляции процессов каллусогенеза и морфогенеза клеток и тканей подсолнечника *in vitro*. Определено влияние сахаров в составе питательной среды для каллусогенеза и фитогормонов в среде для регенерации. Выявлены маркерные гены окраски язычковых цветков, способные оказывать

положительное влияние на морфогенез в культуре клеток и тканей *in vitro* подсолнечника, что позволяет предложить данный подход в качестве альтернативы традиционному способу оптимизации метода андрогенеза в культуре пыльников подсолнечника *in vitro* на основе подбора состава питательных сред. Полученные результаты позволят совершенствовать агротехнологии подсолнечника для нужд селекции.

### Список литературы

1. Барнашова Е.К. Использование маркерных генов в селекции сортов и гибридов подсолнечника / Е.К. Барнашова, Е.А. Константинова, Ю.В. Лобачев, В.М. Лекарев // Вопросы биологии, экологии, химии и методики обучения. Сб. науч. статей. Вып. 8. Саратов: СГУ. – 2005. – С. 36-39.
2. Дьяков А.Б. Физиология подсолнечника. – Краснодар: ВНИИМК, 2004. – С. 68-73.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
4. Чигрин Т.В., Задорожная О.А., Юшкина Л.Л. Способность к андрогенезу в культуре *in vitro* пыльников разных видов подсолнечника // Сборник VI международной конференции молодых ученых и специалистов. – ВНИИМК – 2011. – С. 357-361.
5. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
6. Bohorova N.E., Atanassov A.I. Sunflower (*Helianthus annuus*L.) *in vitro* production of haploids // Biotech. in Agric. And Forestry. (Ed.). Y.P.S. Bajaj. Berlin. – 1990.–Vol. 12. – P. 428–441.
7. Datta Swapan K. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement // Current science. – 2005. – Vol. 89. №11. – P. 1870-1878.
8. Saji K.V., Sujatha M. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annus L.*) // Euphytica. – 1998. – №103. – P. 1-7.
9. Vijaya Priya K. Androgenetic response of sunflower in diferent culture environments / K. Vijaya Priya, D. Sassikumar, R. Sudhagar et al. // Helia. –2003. – №38. – P. 39–50.
10. Zhong D. Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis: fact or artifact? Part 1: *in vitro* anther culture / D. Zhong, N. Michaux-Ferriere, M. Coumans // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1995. – № 41. – P. 91-97.

**Рецензенты:**

Дьячук Т.И., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории клеточной селекции ФГБНУ  
НИИСХ Юго-Востока, г. Саратов;

Антонюк Л.П., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУН ИБФРМ  
РАН, г. Саратов.