

УДК 633.854.78:631.527

## МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА В КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ *IN VITRO*

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

*ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет, Саратов, e-mail: kostinaee@yandex.ru*

Для ускорения и повышения эффективности селекционного процесса в настоящее время активно используют методы культуры тканей растений *in vitro*. У многих сельскохозяйственных растений эти методы применяют для создания новых сортов и гибридов с новыми улучшенными признаками. Применение биотехнологических методов для улучшения характеристик подсолнечника ограничивается слабой регенерационной способностью большинства генотипов в культуре тканей *in vitro*. Эффективность каллусогенеза и частота регенерации *in vitro* у подсолнечника зависит от типа использованного экспланта, генотипа растения-донора и состава питательных сред. Нами изучен в культуре соматических тканей *in vitro* на среде для инициации морфогенетический потенциал короткостебельных линий подсолнечника в зависимости от наличия агар-агара в питательной среде. В качестве эксплантов использовали незрелые зародыши семян десяти короткостебельных линий подсолнечника. На этапе инициации каллусогенеза использовали два варианта среды Мурасиге-Скуга (жидкую без агар-агара и твердую с содержанием агар-агара 8 г/л) с добавлением гидролизата казеина 400 мг/л, фитогормонов 6-бензиламинопурина 4 мг/л и нафтилуксусной кислоты 2 мг/л. Консистенция питательной среды и эффект генотипа оказали достоверное влияние на каллусогенез и регенерацию в культуре соматических тканей *in vitro* подсолнечника. На жидкой питательной среде преобладал каллусогенез, а на твердой среде образовывались почки и побеги. Достоверный положительный эффект на процессы каллусогенеза и регенерации на среде для инициации в культуре тканей *in vitro* установлен у короткостебельных линий, несущих гены *dw 1*, *dw 3*, *dw 5*, *dw 6*, *dw 7* и *dw 10*.

Ключевые слова: подсолнечник, гены короткостебельности, морфогенез, каллусогенез, регенерация, *in vitro*.

## THE MORPHOGENETIC POTENTIAL OF THE DWARF LINES OF SUNFLOWER IN THE SOMATIC TISSUES CULTURE *IN VITRO*

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

*Saratov State Agrarian University, Saratov, e-mail: kostinaee@yandex.ru*

Nowadays the plant tissues culture techniques *in vitro* are actively used in order to accelerate and improve the efficiency of the breeding process. In many crop plants, these methods are used to create new varieties and hybrids with new and improved features. The use of biotechnological methods improving the characteristics of sunflower is limited by weak regenerative capacity of most genotypes in tissues culture *in vitro*. The efficiency of callus formation and frequency of regeneration *in vitro* in sunflower depends on the type of explant, plant genotype of the donor and the composition of culture medium. We studied in the culture of somatic tissues *in vitro* in the medium for initiation the morphogenetic potential of sunflower dwarf lines depending on the presence of agar-agar in the culture medium. Immature embryos of achene of ten dwarf lines of sunflower were explants. In the initiating stage of callusogenesis there were used two variants of Murashige-Skoog medium (liquid without agar-agar and solid containing agar-agar 8 g/l) with casein hydrolyzate (400 mg/l), the phytohormone of 6-benzylaminopurine (4 mg/l) and naphthaleneacetic acid (2 mg/l). The consistency of a culture medium and the effect of genotype had a significant effect on callusogenesis and regeneration in the somatic tissues culture *in vitro* of sunflower. In liquid medium callusogenesis prevailed, and in solid medium shoots and buds were formed. Significant positive effect on the processes of callusogenesis and regeneration in the medium for initiation in the tissues culture *in vitro* was set in dwarf lines with genes *dw 1*, *dw 3*, *dw 5*, *dw 6*, *dw 7* and *dw 10*.

Keywords: sunflower, dwarf genes, morphogenesis, callusogenesis, regeneration, *in vitro*.

В настоящее время у растений методы культуры тканей *in vitro* применяются для ускорения и повышения эффективности селекционного процесса [1, 7].

Морфогенез клеток растений *in vitro* может происходить различными путями – от дифференцировки отдельных клеток до развития целого растения. Регенерация растений *in vitro* может осуществляться путем эмбриогенеза непосредственно из соматических клеток экспланта или каллуса, или путем формирования почек в процессе органогенеза [5, 6]. Регенерация растений из каллуса может осуществляться через органогенез [9, 12] или через соматический эмбриогенез [1, 3, 10].

Применение биотехнологических методов для улучшения характеристик подсолнечника ограничивается слабой регенерационной способностью большинства генотипов в культуре тканей *in vitro* [1, 7]. Многими авторами показано, что частота регенерации *in vitro* у подсолнечника варьирует в зависимости от типа использованного экспланта, генотипа растения-донора и состава питательных сред [1-3, 5-7, 9, 10, 12]. В то же время не достаточно информации о влиянии конкретных генетических систем или отдельных генов на этапы морфогенеза соматических клеток подсолнечника в культуре тканей *in vitro*. Гены короткостебельности оказывают существенное влияние на морфологические, физиологические и биохимические признаки растений, они связаны с балансом эндогенных фитогормонов [11] и, следовательно, могут детерминировать морфогенетические процессы клеток и тканей, в том числе в культуре *in vitro*.

Целью данного исследования является изучение влияния генотипа и консистенции питательной среды на процессы каллусогенеза и регенерации растений на инициальной питательной среде в культуре соматических тканей *in vitro* подсолнечника.

#### **Материал и методы исследований**

Объектами исследований являлись самофертильная высокорослая линия-реципиент ЮВ-28Б и десять экспериментальных короткостебельных линий подсолнечника, созданных в генофоне линии ЮВ-28Б методом беккроссов на основе использования разных *dw*-генов. Высота растений у разных короткостебельных линий снижена *dw*-генами на 35–50 % по сравнению со стандартной линией ЮВ-28Б [4].

Донорные растения исследуемых генотипов выращивали в полевых условиях. Корзинки подсолнечника срезали через две недели после начала цветения. Выбирали семечки из крайних рядов корзинки, стерилизовали 30 % раствором хлорсодержащего препарата «Белизна» в течение 15 минут, промывали стерильной дистиллированной водой не менее 3–4 раз. Незрелые зародыши в стерильных условиях вычленили и помещали на питательную среду.

На этапе инициации каллусогенеза использовали два варианта среды Мурасиге-Скуга (жидкую без агар-агара и твердую с содержанием агар-агара 8 г/л) с добавлением гидролизата казеина 400 мг/л, фитогормонов 6-бензиламинопурина (6 БАП) 4 мг/л и

нафтилуксусной кислоты (НУК) 2 мг/л. Экспланты, высаженные на питательные среды, культивировали в течение 4 недель в темноте при температуре 25 °С.

Полученные тканевые культуры для регенерации переносили на твердую питательную среду Мурасиге-Скуга с содержанием агар-агара 8 г/л с добавлением 6 БАП 0,5 мг/л, гидролизата казеина 500 мг/л и инозита 100 мг/л. Культивирование проводили на свету при температуре 25 °С. Регенерировавшие побеги пересаживали для корнеобразования на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением индолилуксусной кислоты (ИУК) 0,2 мг/л, кинетина 0,5 мг/л, гидролизата казеина 500 мг/л и инозита 500 мг/л.

Эксперименты проводили в течение 2008–2010 гг., каждый вариант имел четырехкратную повторность. Полученные данные обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа с использованием пакета программ Agros 2.09 [8].

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Из тканей экспланта в процессе дедифференциации формировался каллус, к концу четвертой недели на нем выделялись плотные окрашенные зоны меристематической активности, в которых во множестве формировались эмбриониды. Эти зоны, выделенные из морфогенных каллусов, после переноса на среду для регенерации дифференцировались в почки от 1 до 10 штук на одном каллусе. Другим вариантом морфогенеза являлась прямая регенерация почек и побегов с листьями непосредственно из тканей зародыша, содержащих меристематические клетки.

Часть сформировавшихся побегов на среде с добавлением ИУК 0,2 мг/л, кинетина 0,5 мг/л образовывали корни и после пересадки в почву укоренялись. Вторая часть почек имела аномалии развития: утолщение гипокотыля, отсутствие роста эпикотыля, витрификация побегов, раннее зацветание с образованием одной или нескольких корзинок. Такую особенность развития почек *in vitro* у подсолнечника отмечают многие авторы [1, 3, 5-7, 9, 12].

Анализ экспериментальных данных показал, что на жидкой среде клетки активно делились без дифференциации и формировалась масса каллусных клеток неокрашенных и активно пролиферирующих. На твердой среде преимущественно наблюдалась прямая регенерация побегов из клеток эксплантов. На раневых поверхностях некоторых эксплантов образовывался каллус плотный меньшего объема.

Анализ результатов экспериментов с помощью двухфакторного дисперсионного анализа позволил оценить влияние факторов А (консистенция питательной среды, 2 градации фактора) и В (генотип изучаемых линий подсолнечника, 11 градаций фактора).

По показателю «выход каллусов от общего количества эксплантов» нулевые гипотезы для изучаемых вариантов, фактора А, фактора В и взаимодействия АВ отвергались.

Достоверные различия между вариантами установлены для консистенции питательной среды. На жидкой питательной среде показатель «выход каллусов от общего количества эксплантов» на 22,8 % достоверно больше, чем на твердой питательной среде. На жидкой питательной среде линии с генами *dw 1*, *dw 3*, *dw 4*, *dw 5*, *dw 6*, *dw 7*, *dw 8* и *dw 10* достоверно превосходили стандарт на 6,7–58,3 %, а линии с генами *dw 2* и *dw 9* находились на уровне линии-стандарта ЮВ-28Б. На твердой питательной среде линии с генами *dw 1*, *dw 3*, *dw 5*, *dw 6* и *dw 7* достоверно превышали линию-стандарт на 12,5–44,2 %, линии с генами *dw 2*, *dw 4*, *dw 8*, *dw 9* и *dw 10* находились на уровне линии-стандарта. В среднем на двух питательных средах линии с генами *dw 1*, *dw 3*, *dw 4*, *dw 5*, *dw 6*, *dw 7*, и *dw 10* достоверно превосходили стандарт на 22,5–37,1 %, а линии с генами *dw 2*, *dw 8* и *dw 9* находились на уровне линии-стандарта ЮВ-28Б (табл. 1).

Таблица 1

**Влияние генотипа и консистенции питательной среды на выход каллусов от общего количества эксплантов в культуре *in vitro* соматических клеток и тканей подсолнечника (2008–2010 гг.), %**

Градации фактора А	Градации фактора В											Средняя по фактору А
	ЮВ - 28Б st	ЮВ - 28Б dw 1	ЮВ - 28Б dw 2	ЮВ - 28Б dw 3	ЮВ - 28Б dw 4	ЮВ - 28Б dw 5	ЮВ - 28Б dw 6	ЮВ - 28Б dw 7	ЮВ - 28Б dw 8	ЮВ - 28Б dw 9	ЮВ - 28Б dw 10	
Жидкая питательная среда	15,0	73,3	17,5	71,7	23,3	45,0	60,8	66,7	21,7	16,7	59,2	42,8
Твердая питательная среда	10,8	25,0	11,7	23,3	11,7	55,0	28,3	27,5	7,5	7,5	11,7	20,0
Средняя по фактору В	12,9	49,2	14,6	47,5	17,5	50,0	44,6	47,1	14,6	12,1	35,4	-
Варианты	F <sub>факт.</sub>	92,232*										
	НСР <sub>0,5</sub>	6,5										
Фактор А	F <sub>факт.</sub>	517,387*										
	НСР <sub>0,5</sub>	2,0										
Фактор В	F <sub>факт.</sub>	102,407*										
	НСР <sub>0,5</sub>	4,6										
Взаимодействие АВ	F <sub>факт.</sub>	39,540*										
	НСР <sub>0,5</sub>	6,5										

\* – здесь и далее  $F_{факт.} \geq F_{теор.}$

По показателю «выход регенерантов от общего количества эксплантов» нулевые гипотезы для вариантов, фактора А, фактора В и взаимодействия АВ отвергались. Достоверные различия между вариантами установлены для консистенции питательной

среды. На твердой питательной среде показатель «выход регенерантов от общего количества эксплантов» на 22,7 % достоверно больше, чем на жидкой питательной среде. На жидкой питательной среде линии с генами *dw 3*, *dw 5*, *dw 6*, и *dw 7* достоверно превосходили стандарт на 7,5–44,2 %, линии с генами *dw 1*, *dw 2*, *dw 4*, *dw 8*, *dw 9* и *dw 10* находились на уровне линии-стандарта ЮВ-28Б. На твердой питательной среде линии с генами *dw 1*, *dw 3*, *dw 6* и *dw 7* достоверно превышали линию-стандарт на 16,7–25,8 %, линии с генами *dw 5* и *dw 8* на уровне линии-стандарта, а линии с генами *dw 2*, *dw 4*, *dw 9* и *dw 10* значимо уступили на 15,8–27,5 % стандарту. В среднем на двух питательных средах независимо от концентрации питательной среды линии с генами *dw 1*, *dw 3*, *dw 5*, *dw 6* и *dw 7* достоверно превосходили стандарт на 12,0–23,3 %, линия с геном *dw 8* находилась на уровне линии-стандарта ЮВ-28Б, а линии с генами *dw 2*, *dw 4*, *dw 9* и *dw 10* значимо уступили на 9,6–10,9 % стандарту (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние генотипа и консистенции питательной среды на выход регенерантов от общего количества эксплантов в культуре *in vitro* соматических тканей подсолнечника (2008–2010 гг.), %**

Градации фактора А	Градации фактора В											Средняя по фактору А
	ЮВ-28Б st	ЮВ-28Б dw 1	ЮВ-28Б dw 2	ЮВ-28Б dw 3	ЮВ-28Б dw 4	ЮВ-28Б dw 5	ЮВ-28Б dw 6	ЮВ-28Б dw 7	ЮВ-28Б dw 8	ЮВ-28Б dw 9	ЮВ-28Б dw 10	
Жидкая питательная среда	12,5	15,8	15,8	28,3	19,2	56,7	32,5	20,0	11,7	15,0	9,2	21,5
Твердая питательная среда	45,0	67,5	20,0	64,2	17,5	47,5	70,8	61,7	39,2	23,3	29,2	44,2
Средняя по фактору В	28,8	41,7	17,9	46,3	18,3	52,1	51,7	40,8	25,4	19,2	19,2	-
Варианты	F <sub>факт.</sub>	56,836*										
	HCP <sub>0,5</sub>	7,5										
Фактор А	F <sub>факт.</sub>	390,604*										
	HCP <sub>0,5</sub>	2,3										
Фактор В	F <sub>факт.</sub>	53,297*										
	HCP <sub>0,5</sub>	5,3										
Взаимодействие АВ	F <sub>факт.</sub>	26,999*										
	HCP <sub>0,5</sub>	7,5										

**Заключение**

На инициальной питательной среде наблюдалось два варианта морфогенеза тканей эксплантов в культуре тканей *in vitro* подсолнечника: каллусогенез и прямая регенерация побегов по отдельности или одновременно. Установлено достоверное влияние консистенции питательной среды на направление морфогенеза. Использование жидкой питательной среды стимулировало каллусогенез, а на твердой питательной среде преобладала прямая регенерация побегов.

Достоверный положительный эффект на процессы каллусогенеза и регенерации на среде для инициации в культуре тканей *in vitro* отмечен у короткостебельных линий, несущих гены *dw 1*, *dw 3*, *dw 5*, *dw 6*, *dw 7* и *dw 10*. Установлено достоверное взаимодействие между консистенцией питательной среды и генотипом изучаемых линий.

### Список литературы

1. Антонова Т. С., Боровков А. Ю., Зезуль Т. Г., Краснянский С. Ф. Соматический эмбриогенез в каллусе от незрелых зародышей подсолнечника // Сельскохозяйственная биология. – 1992. – № 1. – С. 36-42.
2. Биология, селекция и возделывание подсолнечника / О. И. Тихонов, Н. И. Бочкарев, А. Б. Дьяков и др. – М.: Агропромиздат, 1991. – 281 с.
3. Зезуль Т. Г., Горбатенко Э. В., Ралдугина Г. Н. Регенерация *in vitro* растений подсолнечника через соматический эмбриогенез // Генетика. – 1995. – Т. 31. – № 2. – С. 228-233.
4. Коваленко А. В., Лобачев Ю. В. Характеристика короткостебельных линий подсолнечника // Вавиловские чтения – 2005. Материалы конференции, посвященной 118-й годовщине со дня рождения академика Н. И. Вавилова. – Саратов, 2005. – С. 27-28.
5. Костина Е. Е., Лобачев Ю. В., Ткаченко О. В. Влияние генотипа на морфогенез в культуре соматических клеток и тканей подсолнечника *in vitro* // Вестник Саратовского государственного аграрного университета им. Н. И. Вавилова. – Саратов, 2013. – № 5. – С. 21-24.
6. Лобачев Ю. В., Костина Е. Е., Ткаченко О. В. Влияние консистенции питательной среды и генетических факторов на морфогенез подсолнечника *in vitro* // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 3 (часть 2). – С. 60-61.
7. Нескородов Я. Б., Мишуткина Я. В., Гапоненко А. К., Скрыбин К. Г. Метод регенерации *in vitro* побегов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) из асептических семян, как эксплантов для генетической трансформации // Биотехнология. – 2007. – № 6. – С. 27-33.

8. Основы научных исследований в растениеводстве и селекции: учебное пособие / А. Ф. Дружкин, Ю. В. Лобачев, Л. П. Шевцова, З. Д. Ляшенко // ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2013. – 264 с.
9. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop Sci. – 1989. – V. 29. – P. 201-205.
10. Freyssinet M., Freyssinet G. Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos // Plant Sci. – 1988. – V. 56. – P. 177-181.
11. Ross J.J. Recent advances in the study of gibberellin mutants // Plant Growth Regulation. – 1994. – V. 15. – P. 193-206.
12. Witrzens B., Scowcroft W. R., Downes R. W., Larkin P. J. Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* x *H. annuus*) // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1988. – V. 13. – P. 61-76.