

УДК 575.224.234:633.854.78

Т. В. Чигрин, Л. Л. Юшкіна, О. А. Задорожна

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* ГІБРИДІВ СОНЯШНИКУ ЗА УЧАСТЮ ДИКОРΟΣЛИХ ВИДІВ

Проаналізовано здатність до андрогенезу у 25 гібридів соняшнику, створених за участю культурних ліній *Helianthus annuus* і дикорослих диплоїдних видів *H. decapetalus*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii*. Диференційовано вплив на кількість новоутворень генотипу та середовища культивування. Переважного впливу одного фактора на кількість новоутворень у більшості зразків не знайдено. Встановлено зразки з найвищою андрогенною здатністю: гібриди за участю ліній X114В, X762В і видів *H. decapetalus*, *H. divaricatus*.

Т. В. Чигрин, Л. Л. Юшкіна, О. А. Задорожная

Інститут растениеводства им. В. Я. Юрьева НААН Украины

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* ГИБРИДОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА ПРИ УЧАСТИИ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ

Проанализирована способность к андрогенезу гибридов подсолнечника, созданных при участии культурных линий *Helianthus annuus* и дикорастущих диплоидных видов *H. decapetalus*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii*. Дифференцировано влияние на количество новообразований генотипа и среды культивирования. Преимущественного влияния одного фактора на количество новообразований у большинства образцов не найдено. Установлены образцы с высокой способностью к андрогенезу: гибриды при участии линий X114В, X762В и видов *H. decapetalus*, *H. divaricatus*.

T. V. Chigrin, L. L. Yushkina, O. A. Zadorozhna

V. Y. Yuriev Plant Production Institute NAAS of Ukraine

SUNFLOWER HYBRIDS ANDROGDENESIS *IN VITRO* UNDER WILD DIPLOID SPECIES SHARING

Androgenesis ability of sunflower hybrids bred with sharing cultured lines *Helianthus annuus* L. and wild specieses *H. decapetalus*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii* was analyzed. The influence of genotype and cultivation medium on the quantity of new formation is differentiated. The primary influence of one factor on new formations quantity in most samples is not found. Samples with high ability to androgenesis are determined: hybrids of lines X114В, X762В and species *H. decapetalus* and *H. divaricatus*.

Вступ

Для прискорення селекції рослин досить перспективне застосування подвоєних гаплоїдів, створення яких дозволяє подвоювати гаметофітну кількість хромосом бажаного генотипу. Створення подвоєних гаплоїдів проводиться різними методами. Найпоширеніший метод їх одержання – метод андрогенезу [6]. Створенням подвоєних

гаплоїдів займаються понад 30 років. Вони відомі для ячменю, пшениці, кукурудзи, ріпаку, гірчиці, льону, цукрового буряку, деяких овочевих та інших культур [4]. Дані про андрогенез соняшнику дуже обмежені [5; 9; 10].

У проведених раніше дослідженнях зі здатності до андрогенезу різних видів соняшнику спостерігали вплив як генотипу, так і середовища культивування [4]. Відомі труднощі при створенні міжвидових гібридів соняшнику [1]. Нам вдалося створити міжвидові гібриди соняшнику за участю культурних ліній як материнських форм: X114В/*H. decapetalus*, X114В/*H. divaricatus*, X114В/*H. giganteus*, X114В/*H. microcephalus*, X114В/*H. nuttallii*, X526В/*H. decapetalus*, X526В/*H. divaricatus*, X526В/*H. giganteus*, X526В/*H. microcephalus*, X526В/*H. nuttallii*, X526В, X711В/*H. decapetalus*, X711В/*H. divaricatus*, X711В/*H. giganteus*, X711В/*H. microcephalus*, X711В/*H. nuttallii*, X720В/*H. decapetalus*, X720В/*H. divaricatus*, X720В/*H. giganteus*, X720В/*H. microcephalus*, X720В/*H. nuttallii*, X762В/*H. decapetalus*, X762В/*H. divaricatus*, X762В/*H. giganteus*, X762В/*H. microcephalus*, X762В/*H. nuttallii*. Для прискорення селекції форм за участю диких видів перспективний метод створення подвоєних гаплоїдів. При створенні подвоєних гаплоїдів важливий початковий етап індукції андрогенезу. У зв'язку із цим мета нашої роботи – з'ясувати здатність до андрогенезу міжвидових гібридів соняшнику.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом досліджень були гібриди, створені за допомогою ліній культурного соняшнику (*Helianthus annuus* L.) (♀) селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (X114В, X526В, X711В, X720В, X762В) і диких диплоїдних видів соняшнику ($2n = 34$): *H. divaricatus* L., *H. giganteus* L., *H. microcephalus* Torrey & Gray, *H. nuttallii* Torrey & Gray, *H. decapetalus* L. (♂). Рослини вирощували у польових умовах на території наукової сівозміни Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва (Харківська обл.).

Для отримання пиляків використовували кошики діаметром у середньому 5,5 см, що відповідало наявності стадії одноядерних вакуолізованих мікроспор. При однаковій стадії розвитку мікроспор діаметр кошика варіював залежно від культурної лінії. Фазу розвитку пилку визначали під світловим мікроскопом із використанням цитологічних методів на тимчасових препаратах, забарвлених ацетокарміном [3]. У подальшому для підготовки пиляків до висадження на середовище фрагменти кошиків піддавали стерилізації шляхом поверхневої обробки детергентом, потім 96 % етанолом (Артемівський спиртзавод, Україна) (30 с), 50 % розчином комерційного засобу «Доместос» (ООО Юнілевер СНГ, Росія), що містив гіпохлорит (20 хв.). Після цих етапів фрагменти кошиків промивали чотири рази дистильованою водою. Пиляки, що були на відповідній стадії, ізолювали з квіток під біокуляром (МБС-10, СРСР) в асептичних умовах ламінар-бокса (КПП-1М, СРСР), розміщували у пробірках на індукційному живильному середовищі. Основу індукційного живильного середовища складали макрота мікросолі, вітаміни середовища Murashige & Skoog (MS) [8]. Пиляки у кількості 150 шт. на один зразок висівали на чотири індукційні живильні середовища. У I середовищі додавали 250 мг/л гідролізату казеїну (ОХФЗ, Латвія), 1,0 мг/л НОК (SERVA, Німеччина), 2 мг/л 2,4Д (SERVA, Німеччина), 0,5 мг/л БАП (SERVA, Німеччина), 40 г/л цукрози, 8 г/л агару; у середовище II – 0,5 мг/л кінетину (SERVA, Німеччина), 1 мг/л БАП (SERVA, Німеччина), 1,0 мг/л НОК (SERVA, Німеччина), 60 г/л цукрози, 8 г/л агару; у середовище III – 2 мг/л 2,4Д, 0,5 мг/л ІМК, 360 мг/л глутаміну, 60 г мальтози, 7 г/л агару.

Культивування проводили у темряві за температури +24 °С протягом 7 діб. Після цього пробірки з новоутвореннями переносили в кімнати зі штучним кліматом і про-

довжували культивувати за температури $+24 \pm 2$ °С, 16-годинного світлового періоду та освітлення 3 000 лк.

Частоту формування новоутворень визначали шляхом підрахунку кількості пиляків із новоутвореннями відносно загальної кількості уведених в умови *in vitro* пиляків через 28 діб із моменту введення. Аналіз показників андрогенезу проводили за допомогою методів варіаційної статистики [2].

Результати та їх обговорення

При культивуванні пиляків на індукційних живильних середовищах спостерігали різну кількість новоутворень у різних генотипів на різних середовищах культивування (табл.). На пиляках утворювались калуси зі щільними сугорбиками (рис. 1). На кількість впливали як генотипи, так і середовище культивування.

Таблиця

Андрогенез гібридів F₁ соняшнику (%) за участю дикорослих видів

Лінія	Середовище	<i>H. decapetalus</i>	<i>H. divaricatus</i>	<i>H. giganteus</i>	<i>H. microcephalus</i>	<i>H. nuttallii</i>
X114В	I	94,7 ± 1,8	89,3 ± 2,5	18,0 ± 3,1	92,7 ± 2,1	70,7 ± 3,7
	II	98,7 ± 0,9	100,0 ± 0,0	54,0 ± 1,1	78,7 ± 3,3	100,0 ± 0,0
X526В	I	52,0 ± 4,1	52,7 ± 4,1	2,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0	22,0 ± 3,4
	II	80,7 ± 3,2	85,3 ± 2,8	26,0 ± 3,6	0,0 ± 0,0	93,3 ± 2,0
X711В	I	94,0 ± 1,9	24,0 ± 3,5	88,7 ± 2,6	96,7 ± 1,5	71,3 ± 3,7
	II	94,0 ± 1,9	17,3 ± 3,1	100,0 ± 0,0	32,0 ± 3,8	18,7 ± 3,2
X720В	I	78,7 ± 3,3	90,0 ± 2,4	1,3 ± 0,9	4,7 ± 1,7	100,0 ± 0,0
	II	94,7 ± 1,8	100,0 ± 0,0	75,3 ± 3,5	15,3 ± 2,9	100,0 ± 0,0
X762В	I	92,7 ± 2,1	100,0 ± 0,0	81,3 ± 3,2	92,7 ± 2,1	9,3 ± 2,4
	II	77,3 ± 3,4	98,7 ± 1,0	82,0 ± 3,2	100,0 ± 0,0	43,3 ± 4,1



I II III

Рис. 1. Новоутворення гібриду X762/*H. divaricatus* на середовищах I, II, III

У більшості випадків не спостерігали достовірної переваги середовища або генотипу дикорослого виду, який застосовано у схрещуваннях. Для гібридів за участю X114В, X762В спостерігали тенденцію переважного впливу генотипу. Для гібридів, де

материнською формою була лінія X114В $F_{гтп} = 3,54$, $F_{сер} = 0,70$, лінія X526В – $F_{гтп} = 6,22$, $F_{сер} = 7,42$, лінія X711В – $F_{гтп} = 4,50$, $F_{сер} = 4,80$, лінія X762В – $F_{гтп} = 5,40$, $F_{сер} = 0,05$. Для всіх ліній досліджено однакову кількість генотипів (5 – за кількістю використаних видів) та II середовища, тому $F_{кр}$ однакове для всіх варіантів досліду ($F_{кр гтп} = 6,4$, $F_{кр сер} = 7,7$). Для лінії X720В $F_{гтп} = 7,2$, $F_{сер} = 2,8$, що свідчить про достовірно переважний вплив середовища.

При підрахунку кількості новоутворень у межах одного середовища встановлено, що середня кількість новоутворень на I середовищі складає 60,8 %, на II – 70,6 %, тобто кількість новоутворень на II середовищі достовірно перевищує кількість на I середовищі ($t = 9,8$). На III середовищі істотних новоутворень не спостерігали, тому в подальшому обговоренні III середовище не згадується.

Середня здатність до андрогенезу гібридів, створених за допомогою різних ліній як материнських форм достовірно відрізняється на I та на II середовищі (рис. 2). Різниця між кількістю новоутворень між гібридами, створеними однією материнською лінією, у межах одного середовища в окремих випадках складала до 50 %. Це свідчить про важливість у формуванні андрогенної відповіді не тільки виду соняшнику, а й культурної лінії.

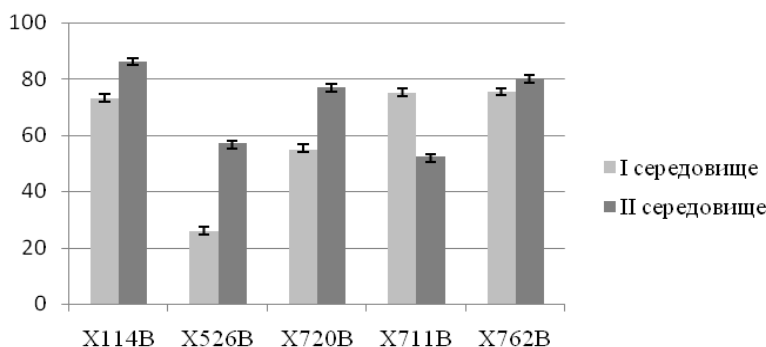


Рис. 2. Частота новоутворень пиляків (%) гібридів соняшнику за участю різних ліній як материнських форм

Найвищою андрогенною здатністю характеризувались лінії X114В, X762В, найнижчою – X526В. Важливо також дослідити андрогенну здатність гібридів за участю різних дикорослих видів (рис. 3).

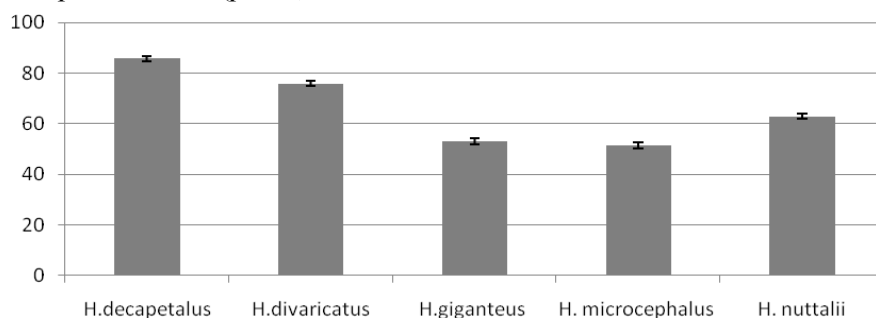


Рис. 3. Частота новоутворень (%) у гібридів, створених за участю різних видів

Гібриди, створені за участю різних дикорослих видів, достовірно відрізнялись один від одного. Найкраще андрогенез відбувався у гібридів за участю *H. decapetalus* (85,7 %), найгірше – *H. microcephalus* (51,3 %).

Висновки

Результати досліджень свідчать про різну здатність до андрогенезу гібридів соняшнику, створених за участю культурних ліній *Helianthus annuus* L. і дикорослих диплоїдних видів соняшнику *H. decapetalus*, *H. divaricatus*, *H. giganteus*, *H. microcephalus*, *H. nuttallii*. Переважного впливу генотипу або живильного середовища на кількість новоутворень у більшості зразків не знайдено. Найвищою андрогенною здатністю серед вивчених гібридів характеризувалися гібриди за участю ліній X 114В, x 762В та видів *H. decapetalus*, *H. divaricatus*.

Бібліографічні посилання

1. **Біорізноманіття** соняшнику та його застосування в сучасній селекції / О. А. Задорожна, О. В. Кривошеєва, Л. Л. Юшкіна, Т. В. Чигрин // Каразінські природознавчі студії. Матер. Міжнар. наук. конф. – Харків : ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2011. – С. 175–176.
2. **Вольф В. Г.** Статистическая обработка опытных данных. – М. : Колос, 1966. – 255 с.
3. **Паушева З. П.** Практикум по цитологии растений. – М. : Агропромиздат, 1988. – 271 с.
4. **Чигрин Т. В.** Особенности андрогенеза видов подсолнечника / Т. В. Чигрин, О. А. Задорожная, Л. Л. Юшкіна // Инновационные направления исследований в селекции и технологии возделывания масличных культур. Матер. VI Междунар. конф. молодых ученых и специалистов. – Краснодар : ВНИИМК, 2011. – С. 357–361.
5. **Androgenetic** response of sunflower in diferent culture environments / K. Vijaya Priya, D. Sassikumar, R. Sudhagar, A. Gopalan // *Helia*. – 2003. – Vol. 26, N 38. – P. 39–50.
6. **Hristova-Cherbadzi M.** Characterization of hybrids, forms and lines, obtained from interspecific hybridization of cultivated sunflower *Helianthus annuus* L. with wild species of genus *Helianthus* // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2009. – Vol. 23, N 2. – P. 112–116.
7. **Maraschin S. F.** Androgenic switch: An example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective / S. F. Maraschin, W. de Priester, H. P. Spanik // *Journal of Experimental Botany*. – 2005. – Vol. 56. – P. 1711–1726.
8. **Murashige T.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
9. **Thengane S. R.** Anther culture in *Helianthus annuus* L., influence of genotype and culture conditions on embryo induction and plant regeneration / S. R. Thengane, M. S. Joshi, S. S. Khuspe // *Plant Cell Rep.* – 1994. – Vol. 13. – P. 222–226.
10. **Zhong D.** Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis / D. Zhong, N. Michaux-Ferriere, M. Coumans // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1995. – Vol. 41, N 2. – P. 91–97.

Надійшла до редколегії 26.08.2012