

УДК 579.254.2

ВЛИЯНИЕ ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ И УЛЬТРАЗВУКА НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*)

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

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина, 0302,
Киев, ул. Васильковская, 31/17 e-mail: oltyko@gmail.com

Исследовали влияние тиосульфата натрия и ультразвука на реализацию морфогенетического потенциала инбредных линий подсолнечника. Показано, что эти факторы оказывают позитивный эффект на индукцию регенерации, которая осуществляется путём прямого органогенеза из сегмента 3–4-дневных проростков. Установлена генотипическая зависимость частоты побегообразования от концентрации тиосульфата натрия и продолжительности действия ультразвука. Комплексное применение тиосульфата натрия и ультразвука повышало частоту регенерации инбредных линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 в 1,88, 2,41 и 3,58 раза, соответственно.

*Ключевые слова: подсолнечник (*Helianthus annuus L.*), регенерация *in vitro*, ультразвук, тиосульфат натрия.*

Введение. Прогресс в генетическом улучшении элитных линий и гибридов подсолнечника биотехнологическими методами ограничен по двум основным причинам — отсутствию рутинной системы регенерации и низкой эффективностью стабильной трансформации [1]. В связи с этим представляет интерес поиск факторов, которые могут оказывать позитивное влияние и на реализацию морфогенетического потенциала, и на интродукцию рекомбинантных молекул ДНК в геном *H. annuus*.

При разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника внимание исследователей главным образом сконцентрировано на *Agrobacterium*-опосредованной трансформации как направлении биотехнологии, при которой наиболее часто наблюдается стабильная экспрессия трансгенов [2]. Вместе с тем, несмотря на компетентность *H. annuus* к агробактериальной инфекции, он с трудом поддается *Agrobacterium*-опосредованной трансформации классическим способом. Решению этого вопроса способствовала разработка способа поранения эксплантатов бомбардировкой микрочастицами вольфрама до инокуляции с агробактерией [3]. Предложено ряд других приёмов: гидратация с последующей дегидратацией, инфильтрация, использование пектиназ [4,5].

Для повышения частоты переноса Т-ДНК в клетки растений применяется также метод SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium*—mediated transformation), который заключается в кратковременной обработке ра-

стительных тканей ультразвуком в присутствии агробактерий [6, 7, 8, 9, 10]. Позитивный эффект этого метода является результатом образования значительного количества репарируемых микропоранений на поверхности растительных тканей, что увеличивает колонизацию агробактерий и компетентность эксплантатов к их инфекции [7]. Восприимчивость к агробактериальной инфекции повышает также тиосульфат натрия [11, 12]. В качестве одного из основных механизмов действия ультразвука рассматриваются акустическая кавитация и потоки жидкой фазы, что может приводить к изменениям в клетках и тканях, связанных, в частности с повышением уровня проницаемости мембран, переноса реагентов в клетку, активизацией метаболических процессов [10].

Другая сторона обсуждаемой методологии касается индукции регенерации *in vitro*. Показано, что реализация морфогенетического потенциала подсолнечника может осуществляться путём прямого/непрямого как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [1, 13–16]. При этом отмечается зависимость от типа эксплантата, а также генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Кроме того, имеются сведения и о генотипическом контроле показателей — количество побегов на общее количество эксплантатов и на регенерирующий эксплантат [17, 18]. На индукцию регенерации оказывают влияние регуляторы роста, углеводы, в ряде случаев повышению побегообразования способствуют органические и неорганические компоненты, в частности аминокислоты, гидролизат казеина, KNO_3 [13, 16]. По нашим предварительным данным при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации наблюдается снижение

морфогенетического потенциала инбредных линий подсолнечника. В связи с этим, целью данной работы было изучение влияния тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации инбредных линий подсолнечника при использовании в качестве эксплантата сегмента проростка.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии 96А/3, 16А/3, 70А/3 подсолнечника (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН). Ядра зрелых семян стерилизовали последовательно 96% этанолом (2 мин) и 15% раствором хлорамина (30–40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду Мурашиге-Скуга (МС) [19]. Культивировали 3–4 дня при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещённости 3–4 клк.

3–4-дневные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного эксплантата использовали сегмент проростка, состоящий из ~1/2 нижней части семядоли с расщеплённой верхней частью гипокотилия размером 1–2 мм. Для индукции регенерации *in vitro* эксплантаты (по 20 штук на чашку Петри) высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (МСМ) и среду МСМ дополненную тиосульфатом натрия (МСМТ), в концентрациях 10, 20, 30, 50 и 100 мг/л. рН питательной среды до автоклавирования составлял 5,7 — 5,8. Культивирование проводили при условиях, указанных выше. Укоренение осуществляли на МСМ-среде без фитогормонов.

Ультразвуковую обработку проводили на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С в течение 5, 15 и 30 с.

Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали как отношение количества регенерантов к общему числу эксплантатов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6 — 10-кратных повторностей опыта. При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одним из важных факторов, определяющих эффективность индукции регенерации *in vitro* подсолнечника, является природа эксплантата, а также стадия развития растений, из которого он вычлняется. Предварительный скрининг показал, что органогенез *in vitro* анализируемых линий на модифицированной нами среде МСМ надёжно и воспроизводимо происходит при использовании сегмента проростка, состоящего из нижней части семядоли совместно с верхней частью гипокотыля. При этом максимальная частота регенерации, которая осуществляется через прямой органогенез, наблюдается для эксплантатов, полученных от 3–4-дневных проростков подсолнечника. Появление первых побегов было чётко различимо уже на 6–7 день культивирования на средах для индукции регенерации МСМ. Частота регенерации инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3 и 16А/3 составила $31,3 \pm 2,0 \%$, $20,2 \pm 4,6 \%$ и $13,9 \pm 2,0 \%$, соответственно. Отметим, что регенерация путём прямого органогенеза была характерна для ряда генотипов подсолнечника, где использовали другие эксплантаты, в частности, половинки семядоли 2-дневных про-

ростков [17], гипокотыль с первичным корешком незрелых зародышей [14], меристему побега и примордии листьев 2-дневных проростков [16], незрелые зародыши [20].

Для повышения частоты побегообразования анализируемых инбредных линий подсолнечника варьировали количественным и качественным составом органических и неорганических добавок в питательной среде. Среди них интерес вызвал тиосульфат натрия. На рис.1 приведены результаты сравнительного изучения индукции регенерации инбредных линий подсолнечника при разных концентрациях этого компонента. Полученные данные свидетельствуют о том, что для всех тестируемых линий происходит повышение частоты регенерации при культивировании на МСМТ, однако ответная реакция эксплантата на этот фактор питательной среды была неоднозначной: наблюдаются как количественные различия, так и изменения в динамике реализации морфогенетического потенциала. Так, достоверное увеличение частоты регенерации у всех инбредных линий имеет место при одной и той же концентрации тиосульфата натрия, равной 20 мг/л. Однако у линии 96А/3 наблюдается максимум в диапазоне 10 — 30 мг/л и снижение частоты побегообразования при 100 мг/л тиосульфата натрия приблизительно в 2 раза. В то же время у линий 70А/3 и 16А/3 статистически достоверная разница устанавливается при меньшей концентрации (10 мг/л) этого компонента в питательной среде, и в дальнейшем она практически не меняется. В целом, присутствие тиосульфата натрия в питательной среде привело к повышению частоты побегообразования инбредных линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 приблизительно в 1,33, 1,71 и 2,69 раза, соответственно. Мож-

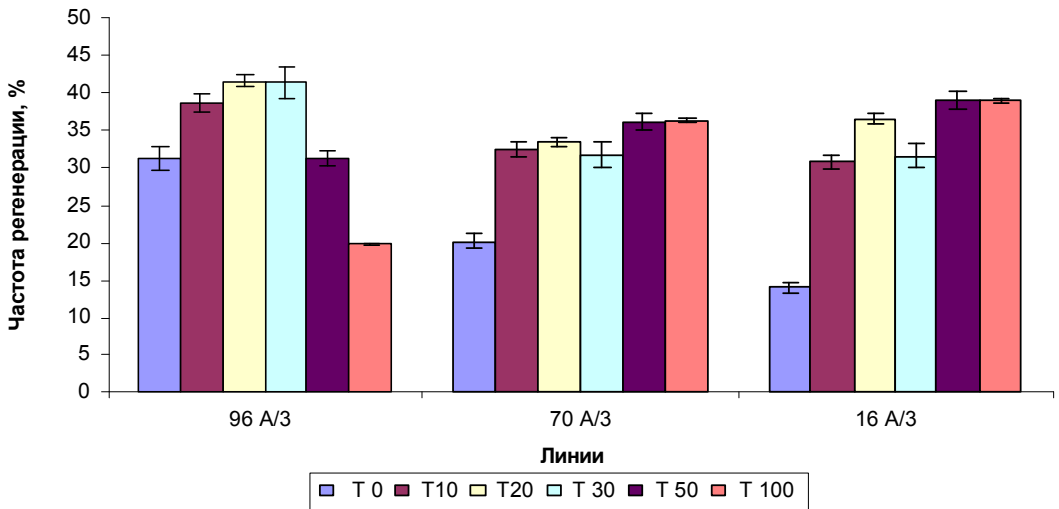


Рис. 1. Влияние тиосульфата натрия на частоту регенерации из эксплантатов инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3, 16А/3. Т0, Т10, Т20, Т30, Т50, Т100 — концентрации тиосульфата натрия, равные 0, 10, 20, 30, 50, 100 мг/л, соответственно

но предположить, что этот фактор стимулирует пролиферацию эпидермальных и/или субэпидермальных клеток гипокотыля, способных к последующей дифференцировке, возможно за счёт изменения электрохимического потенциала. Различное влияние тиосульфата натрия на реализацию морфогенетического потенциала анализируемых линий свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования подсолнечника от этого компонента питательной среды.

Изучение влияния ультразвука на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника проводили на среде МСМ, содержащей 20 мг/л тиосульфата натрия, варьируя продолжительностью озвучивания (рис.2). В целом, при ультразвуковой обработке происходило увеличение частоты регенерации, максимум которого для всех тестируемых инбредных линий наблюдался при длительности озвучивания, равной 15 с. Более того, относительно контроля — частоты регене-

рации при культивировании на среде МСМТ — количество побегов увеличилось приблизительно одинаково, а именно в 1,42, 1,37 и 1,45 раза для линий 96А/3, 70А/3, 16А/3, соответственно. Реализация морфогенетического потенциала осуществлялась путём прямого органогенеза. Отметим, что для инбредной линии 96А/3 частота регенерации при озвучивании в течение 5 с резко снижалась и была меньше, чем в контроле, однако при увеличении длительности действия этого фактора она повышалась ~ 2,6 раза. Аналогично Мюллер и соавт. [15] показали, что для инбредной линии подсолнечника НА300В происходит значительное уменьшение процента побегообразования, однако эти авторы проводили ультразвуковую обработку только в течение 1 с и при других условиях. Таким образом, при комплексном применении тиосульфата натрия и ультразвука наблюдается повышение индукции регенерации линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 в 1,88, 2,41 и 3,58 раза, соответственно.

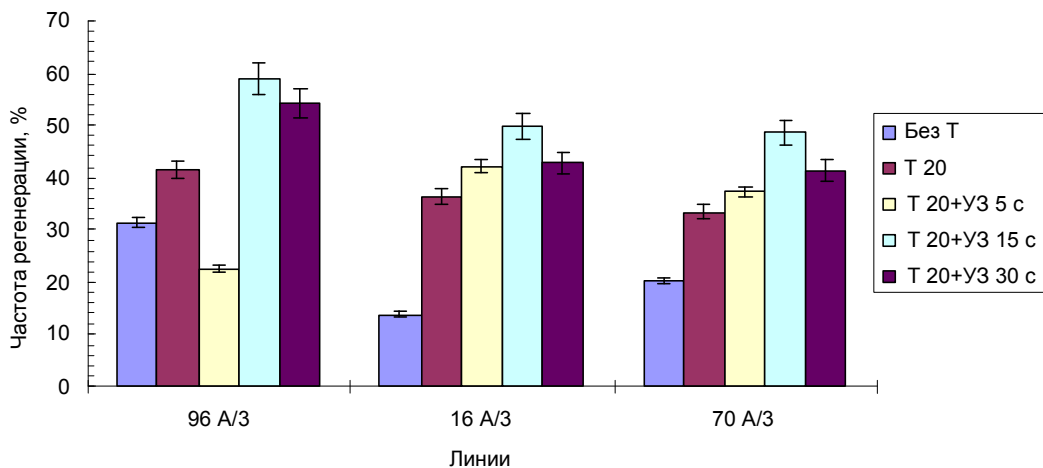


Рис. 2. Влияние ультразвука (УЗ) на частоту регенерации из explantов инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3, 16А/3, культивируемых на среде, содержащей 20 мг/л тиосульфата натрия. Продолжительность озвучивания 5 с, 15 с, 30 с

При культивировании на среде МСМТ индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Для всех генотипов в среднем было характерно наличие 2–3-х побегов на регенерирующий explантат (появление 4 — 5 регенерантов было редким событием), однако на среде МСМ этот показатель составлял преимущественно 1. Ультразвуковая обработка не приводила к изменению характера множественного побегообразования.

Выводы

Комплексное применение тиосульфата натрия и ультразвука оказывает позитивное влияние на реализацию морфогенетического потенциала инбредных линий подсолнечника 96А/3, 70А/3, 16А/3. Показана генотипическая зависимость индукции регенерации подсолнечника, осуществляемой через прямой органогенез, как от тиосульфата натрия, так и от совместного действия этого фактора с ультразвуком. Установлено, что тиосульфат натрия

способствует усилению процессов множественного побегообразования. При совместном воздействии этого фактора с ультразвуком изменений в частоте побегообразования на регенерирующий explантат не происходит.

Список литературы

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. — Vol. 85, № 1–3. — P.63–74.
3. Bidney D., Scelonge C., Martich J., Burrus M., Sims L., Huffman G. Microprojectile bombardment of plant tissue increases transformation frequency by *Agrobacterium tumerfaciens* // Plant Mol. Biol. — 1992. — Vol. 18. — P.301–313.
4. Hewezi T., Perrault A., Alibert G., Kallerhoff J. Dehydrating immature embryo split apices and re hydrating with *Agrobacterium tumerfaciens*: A new methods for

- genetically transforming recalcitrant sunflower // *Plant Mol Biol Rep.* — 2002. — Vol. 20, № 4. — P.335–345.
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 β -glucuronidase expression // *Physiology Plantarum.* — 1999. — Vol. 106. — P.232–237.
 6. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. A simple and general method for transferring genes in to plants // *Science.* — 1985. — Vol. 227. — P. 1229–1231.
 7. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation // *Transgenic Res.* — 1997. — № 6. — P. 29–336.
 8. Weber S., Friedt W., Landes N., Molinier J., Himber C., Rousselin P., et al. Improved *Agrobacterium* — mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication // *Plant Cell Rep.* — 2003. — Vol. 21. — P. 475–482.
 9. Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation // *Plant Cell Rep.* — 2003. — Vol. 21. — P. 552–562.
 10. Liu Y., Yang H., Sakanishi A. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cell by sonoporation // *Biotech. Advan.* — 2006. — Vol. 24. — P. 1–16.
 11. Olhoft P.M., Lin K., Galbraith J., Neisen N.C., Somers D.A. The role of thiol components in increasing *Agrobacterium* — mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // *Plant Cell Rep.* — 2001. — Vol. 20. — P. 731–737.
 12. Сахно Л.А., Гочева Е.А., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса // *Цитология и генетика.* — 2008. — № 1. — С. 21–28.
 13. Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology // *Plant Physiol. Biochem.* — 1994. — Vol. 32. — P.31–44.
 14. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // *Molecular Breeding.* — 2000. — № 6. — P. 479–487.
 15. 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 // *Transgenic Research.* — 2001. — № 10. — P. 435–444.
 16. Dong-Ho Shin D.-H., Kim J.S., Yang J., On S.K., Chung G.C., Han K-H. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* — 2000. — Vol. 36. — P. 273–278.
 17. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Safari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* — 1997. — Vol. 48. — P. 127–130.
 18. Flores Berrious E, Gentzittel 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. — Vol. 101. — P.1299–1306.
 19. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — Vol. 15. — P.473–497.
 20. Sujatha M., Prabakaram A.J. High frequency of embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* — 2001. — Vol. 65. — P. 23–29.

Представлена С.С. Малютой
Поступила 30.03.2009

**ВПЛИВ ТІОСУЛЬФАТУ НАТРІЮ
ТА УЛЬТРАЗВУКУ НА ІНДУКЦІЮ
РЕГЕНЕРАЦІЇ IN VITRO ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ
СОНЯШНИКА**

*А.Г. Комісаренко, С.І. Михальська,
А.Є. Малина, О.М. Тищенко*

Інститут фізіології рослин і генетики
Національної академії наук України,
Україна, 03022 Київ, ул. Васильковська,
31/17 e-mail: oltyko@gmail.com

Досліджували вплив тиосульфату натрію та ультразвуку на реалізацію морфогенетичного потенціалу інбредних ліній соняшника. Встановлено, що дані фактори мають позитивний ефект на індукцію регенерації, яка здійснюється шляхом прямого органогенезу із сегментів 3–4-денних проростків. Встановлена генотипічна залежність частоти пагоноутворення від концентрації тиосульфату натрію та терміну дії ультразвуку. Комплексне використання тиосульфату натрію та ультразвуку підвищувало частоту регенерації інбредних ліній 96А/3, 70А/3, 16А/3 в 1,88, 2,41 і 3,58 рази, відповідно.

Ключові слова: соняшник (Helianthus annuus L.), регенерація in vitro, ультразвук, тиосульфат натрію.

**THE EFFECT OF THIOSULFATE NA AND
ULTRASOUND ON REGENERATION
INDUCTION IN VITRO OF INBRED LINES
OF SUNFLOWER (HELIANTHUS ANNUUS L.)**

*A. G. Komisarenko, S.I. Mykhalska, A.E.,
Malina A.E., O.M. Tishchenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska St., 31/17
e-mail: oltyko@gmail.com

The influence of thiosulfate Na and ultrasound on morphogenetic possibility of inbred lines (*Helianthus annuus* L.) are studied. It has been shown that these factors have positive affect on regeneration induction by direct organogenesis from segment of seedling 3–4–days after germinating. Regeneration frequency was depend on from genotype as well as both thiosulfate Na concentration and long-term usage of ultrasound. Using thiosulfate Na and ultrasound, the increase of regeneration frequency of inbred lines 96A/3, 16A/3 и 70A/3 were averaged in 1,88, 2,41 и 3,58 time over, correspondingly.

Key words: Helianthus annuus L., regeneration in vitro, ultrasound, sodium thiosulphate.