

БАБИЧ В.О.^{1,2✉}, ВАРЧЕНКО О.І.^{1,2}, КУЧУК М.В.¹, ПАРИЙ М.Ф.^{2,3}, ПАРИЙ Я.Ф.², СИМОНЕНКО Ю.В.^{1,2}

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: viktoriababuch@ukr.net

² Всеукраїнський науковий інститут селекції (ВНІС),

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com

³ Національний університет біоресурсів і природокористування України,

Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15

✉ viktoriababuch@ukr.net, (093) 722-80-94

ВИКОРИСТАННЯ КУЛЬТУРИ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ СОНЯШНИКА *IN VITRO* ДЛЯ ШВИДКОГО СТВОРЕННЯ ВІДНОВНИКІВ ФЕРТИЛЬНОСТІ, СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ ТРИБЕНУРОН МЕТИЛУ

Мета. Прискорення гомозиготації ліній соняшника для виділення відновників фертильності, стійких до гербіциду трибенурон метилу, використовуючи технологію культивування незрілих зародків в культурі *in vitro*. **Методи.** Методи культивування незрілих зародків соняшника в культурі *in vitro*; методи класичного схрещування. **Результати.** В результаті роботи було гомозиготовано та виділено з трьох комбінацій (ВН0118xSURES-2, ВН0218xSURES-2 та ВН0318xSURES-2) по 10 батьківських ліній соняшника. **Висновки.** Використання технології культивування незрілих зародків соняшника в культурі *in vitro* ефективно прискорює гомозиготацію ліній соняшника для виділення відновників фертильності, стійких до гербіциду трибенурон метилу. Залучення методів культури незрілих зародків соняшника *in vitro* дозволяє скоротити вдвічі створення вихідних батьківських ліній.

Ключові слова: соняшник, незрілі зародки, культура *in vitro*, стійкість до гербіцидів, трибенурон метил.

Соняшник (*Helianthus annuus* L.) є однією з найбільш розповсюджених олійних культур світу, а також другою культурою після кукурудзи, в якій для створення гібридів використовують цитоплазматичну чоловічу стерильність (ЦЧС) [1].

Створення гібридів на основі ЦЧС включає в себе створення окремих компонентів, таких як: стерильний аналог (цит *Srff*), закріплювач стерильності (цит *Nrff*) та відновник фертильності пилку (цит *NRfRf*). У соняшника всі гібриди базуються на одній цитоплазматичній чоловічій стерильності, а саме ЦЧС РЕТ1 [2].

ЦЧС типу РЕТ1 була виявлена у гібрида, якого отримали в результаті міжвидової гібридизації *Helianthus petiolaris* Nutt. та *H. annuus* [3].

Створення одного з компонентів гібрида включає в себе багато років клопіткої праці з виділенням ліній із бажаними ознаками. Знаючи це, в селекційний процес все більше залучають нові методи та підходи, що дозволяють прискорити створення нового вихідного матеріалу. Так, наприклад, використання культури незрілих зародків *in vitro* дає можливість прискорити виділення ліній за певними маркерними ознаками (наприклад, стійкість до гербіциду трибенурон-метилу).

Вивчення у рослин спадкової стійкості до гербіцидів викликає великий інтерес зі сторони вчених не лише з метою з'ясування механізмів стійкості, а й має велике практичне значення, тому що є ефективним інструментом для вирощування гібридного насіння соняшника. Для використання стійкості рослин до групи гербіцидів сульфонілсечовин в системі агропромисловості використовують декілька назв, а саме – *ExpressSun*, *Express* та *СУМО*. Гербіцид трибенурон-метил з групи сульфонілсечовин є АНАС-інгібітором та ефективним інструментом проти однорічних дводольних бур'янів [4]. Крім того, при застосуванні гербіциду трибенурон метилу нема післядії після його використання (на відміну від гербіцидів групи імідазолінонів (ІМІ)).

Першими рослинами, що мали стійкість до гербіциду трибенурон метилу, були дикоростучі популяції соняшника. З 57 виділених природних популяцій соняшника – 47 належали до виду *H. annuus*, а три популяції – до виду *H. petiolaris*. У результаті роботи з дикоростучими популяціями в штаті Канзас (США) було

створено дві публічні лінії SURES-1 та SURES-2 [5,6]. Лінія SURES-1 є закріплювачем стерильності, що була виділена в результаті схрещувань лінії HA 424/3/ HA 406//HA 89/SU *res.* з *H. annuus*. З популяції SU *res.* був зібраний пилок та проведено схрещування з лінією HA 89. В подальшому було проведено схрещування з лініями HA 406 та HA 424/3. В результаті з покоління F₄ було виділено закріплювач стерильності SURES-1.

Лінія SURES-2 є відновником фертильності, якого отримали в результаті ряду схрещувань ліній RHA377/3/RHA 392//RHA 376/SU з *H. annuus*. Так, зібраний пилок з популяції дикого соняшника *H. annuus*, стійкого до гербіциду хлорсульфурону (SU), використовували при схрещуванні із лінією RHA 376. Після чого дана комбінація в подальшому була схрещена з RHA 392, а потім з RHA377/3. На кожному з етапів схрещувань було проведено контроль наявності гена стійкості до гербіциду трибенурон метилу за допомогою обробки гербіцидом *Express* в концентрації 0,24 г/л [7].

На даний момент з молекулярно-генетичної точки зору для соняшника ідентифіковані декілька мутантних генів *AHASL*. Так ген *AHASL 1* знаходиться на LG9, ген *AHASL 2* – на LG6, а ген *AHASL 3* – на LG2 [8]. Проте тільки чотири мутації в гені *AHASL 1* у соняшника призводять до стійкості до гербіцидів у рослин. Точкова мутація в кодоні 197 (*AHASL 1-2*) (відповідно до прийнятої номенклатури для *Arabidopsis*) надає рослинам SU толерантності. Ця транспозиція призводить до моноамінокислотної заміни проліну на лейцин у первинній структурі ферменту, а ця модифікація призводить до конформації білка та надає стійкості до гербіциду [4,9,10].

Враховуючи, що створення гібридів зі стійкістю до гербіциду трибенурон метилу є ефективним інструментом боротьби проти однорічних дводольних бур'янів, та з урахуванням довгого етапу створення батьківських ліній, важливим з практичної точки зору є використання незрілих зародків соняшника *in vitro* як одного з методів пришвидшення селекційного процесу, а саме для отримання двох-трьох поколінь соняшника за рік. Крім цього, культуру незрілих зародків *in vitro* вдало використовують для вивчення соматичного ембріогенезу, органогенезу, регенерації та генетичної трансформації соняшника [11–15].

Соняшник – основна олійна культура для України, ринок насіння якого все більше потребує урізноманітнення. Саме тому пошуки нового вихідного матеріалу для створення гібридів у соняшника є актуальним завданням. Метою нашої роботи було прискорити гомозиготацію ліній соняшника для виділення відновників фертильності, стійких до гербіциду трибенурон метилу, використовуючи технологію культивування незрілих зародків у культурі *in vitro*. Ці лінії в подальшому будуть включені в процес створення нових гібридів соняшника.

Матеріали і методи

У роботі було використано в якості донора стійкості до гербіциду трибенурон метилу лінію SURES-2. Ця лінія була отримана з генетичного банку США – GRIN (the Germplasm Resource Information Network). Лінія SURES-2 (PI 633750) є відновником фертильності, яку було отримано в результаті ряду схрещувань ліній RHA377/3/RHA 392//RHA 376/SU з *H. annuus* [7].

В якості реципієнта було використано три лінії відновників фертильності ВН0118, ВН0218 та ВН0318, що були люб'язно надані Всеукраїнським науковим інститутом селекції (ВНІС), та не містять у собі гени стійкості до гербіциду трибенурон метилу.

Наша робота була розпочата влітку 2017 року після ряду схрещувань лінії SURES-2 з лініями ВН0118, ВН0218 та ВН0318. З кожної комбінації було відібрано по 30 насінин. На 21-й день незрілі зародки були відібрані та перенесені на живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) з додаванням 6-бензиламінопурину (BAP) у концентрації 0,1 мг/л [14]. На 10-й день після введення в культуру *in vitro* спостерігали проростання зародків. Проростки, що сформували коріння, були висаджені в ґрунт для подальшої їх адаптації в умовах теплиці. При цьому спостерігалось неодноразове цвітіння, що розпочалося через 63 дні після перенесення в теплицю. Всі рослини були заізолювані для їх самозапилення. Через 35–40 днів рослини досягали господарської стиглості. Зріле насіння було зібране, обмолочене, та депоноване для посіву навесні 2018 року.

Отримане у теплиці насіння покоління F₂/F₃ навесні 2018 року висівалось на селекційному розсаднику та, у фазі чотирьох пар справжніх листків (V4), була проведена обробка подвійною дозою гербіциду в концентрації 100

г/га. Для цього ми використовували гербіцид суцільної дії Гранстар Голд 75 з діючою речовиною трибенурон-метил. Всі темно-зелені рослини повторно були самозапилені та проводився відбір 21-денних зародків з аналогічною послідовністю, а саме, введення в культуру *in vitro* на середовище MS плюс ВАР 0,1 мг/л. Проростки, що сформували коріння, були також висаджені в ґрунт, адаптовані та заізолювані для їх подальшого самозапилення. Зріле насіння було зібране, обмолочене та депоноване для посіву весною 2019 року. Покоління F₃/F₄ також висівалося на селекційному розсаднику та у фазі чотирьох пар справжніх листків (V4) була проведена обробка подвійною дозою гербіциду в концентрації 100 г/га.

Результати та обговорення

Перші згадки про використання культури незрілих зародків *in vitro* можна знайти починаючи з 80-х років минулого століття. З того часу культуру незрілих зародків почали використовувати для вивчення соматичного ембріогенезу, органогенезу, регенерації та генетичної трансформації у соняшника. Однією з перших таких досліджень є робота Finer J. (1987), який вивчав соматичний ембріогенез у соняшника використовуючи в якості експлантів культуру незрілих зародків [11]. Hewezi T. та співав. (2002) використовували 21-денні зародки для підбору оптимального методу генетичної трансформації соняшника (використовували як бомбардування, вакуумну інфільтрацію та дегідратацію з *Agrobacterium tumefaciens*) [16].

Виходячи з інформації, що з двох публічних ліній (SURES-1 та SURES-2), стійких до гербіциду трибенурон метилу, лінія SURES-1 є закріплювачем стерильності, а лінія SURES-2 – відновником фертильності, ми вирішили використовувати в якості донора – лінію SURES-2 [7]. Реципієнтами виступали три лінії відновників фертильності BH0118, BH0218 та BH0318, які люб'язно надано Всеукраїнським науковим інститутом селекції (ВНІС).

В 2017 році за допомогою механічного видалення пиляків (кастрація) у реципієнтів та штучного перенесення пилку з лінії SURES-2 ми отримали наступні комбінації: BH0118xSURES-2, BH0218xSURES-2 та BH0318xSURES-2. З кожної комбінації покоління F₀/F₁ було відібрано по тридцять 21-

денних зародка, які в подальшому були введені в культуру *in vitro*.

В роботі Lucas O. та співавт. використовували середовище MS, доповнене ВАР в концентрації 0,1 мг/л, для культивування незрілих зародків соняшника в умовах *in vitro* для подальшої розробки та застосування методів генетичної трансформації [14]. В наших експериментах ми також використовували дане середовище, доповнене ВАР.

На 10-й день після введення в культуру *in vitro* зародки почали проростання і формували корені. Проростки, що сформували нормальні корені, були висаджені в ґрунт для подальшої їх адаптації в умовах теплиці (рис. 1). На рис. 1 зображено етапи культивування незрілих зародків соняшника в культурі *in vitro*, адаптації та отримання насіння. Виходячи з першого закону Менделя про одноманітність гібридів першого покоління, нами отримано гетерозиготні за геном стійкості до гербіциду рослини, і тому ми не проводили обробку гербіцидом цих рослин в теплиці.

Отримане з культури *in vitro* насіння F₂/F₃ покоління було висіяно в селекційному розсаднику. У фазі чотирьох пар справжніх листків (V4) була проведена обробка подвійною дозою гербіциду в концентрації 100 г/га. Ми використовували гербіцид суцільної дії Гранстар Голд 75 з діючою речовиною трибенурон-метил, ефект від обробки яким можна побачити на рис. 2.

У результаті обробки гербіцидом Гранстар Голд 75 нами спостерігалось розщеплення за геном стійкості до гербіциду, відповідно до 2-го закону Менделя, де у другому поколінні спостерігається розщеплення за фенотипом 3:1, а за генотипом 1:2:1.

З кожної комбінації було взято по 30 насінин, які в теплиці було самозапилено, всі вони вдало пройшли акліматизацію, були висіяні, та в подальшому знову оброблялись гербіцидом. У таблиці представлені дані з розщеплення ознаки стійкості до гербіциду у рослин соняшника.

Після візуальної оцінки нами виділено темно-зелені рослини, що були гомозиготами за ознакою стійкості, вони в подальшому були взяті для повторного циклу вирощування в культурі *in vitro* незрілих зародків для гомозиготності за даною ознакою. Всі етапи були повторно виконані.

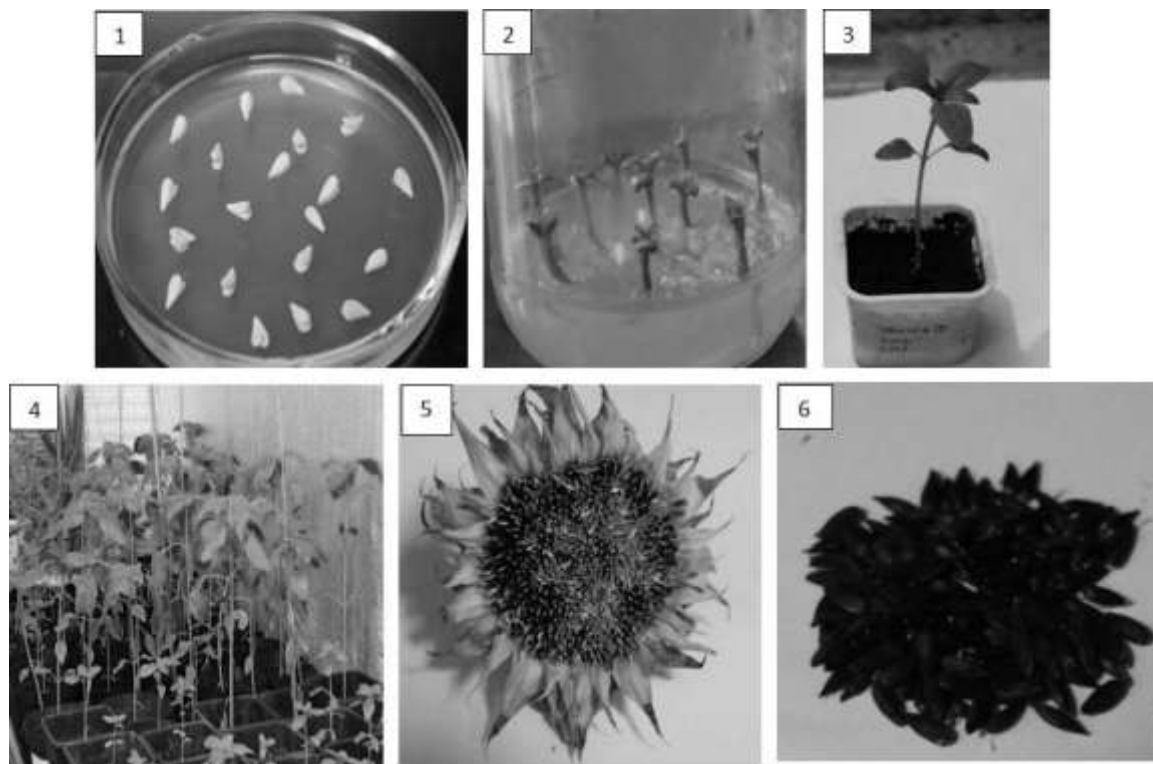


Рис. 1. Етапи культивування незрілих зародків соняшника в культурі *in vitro*, адаптації та отримання насіння: 1 – 21-денні зародки F_1/F_2 , 2 – проростання зародків на середовищі MS + BAP 0,1 мг/л, 3 – перенесений у ґрунт проросток, що проходить адаптацію, 4 – адаптовані рослини перед цвітінням, 5,6 – зрілий кошик та зібране насіння.

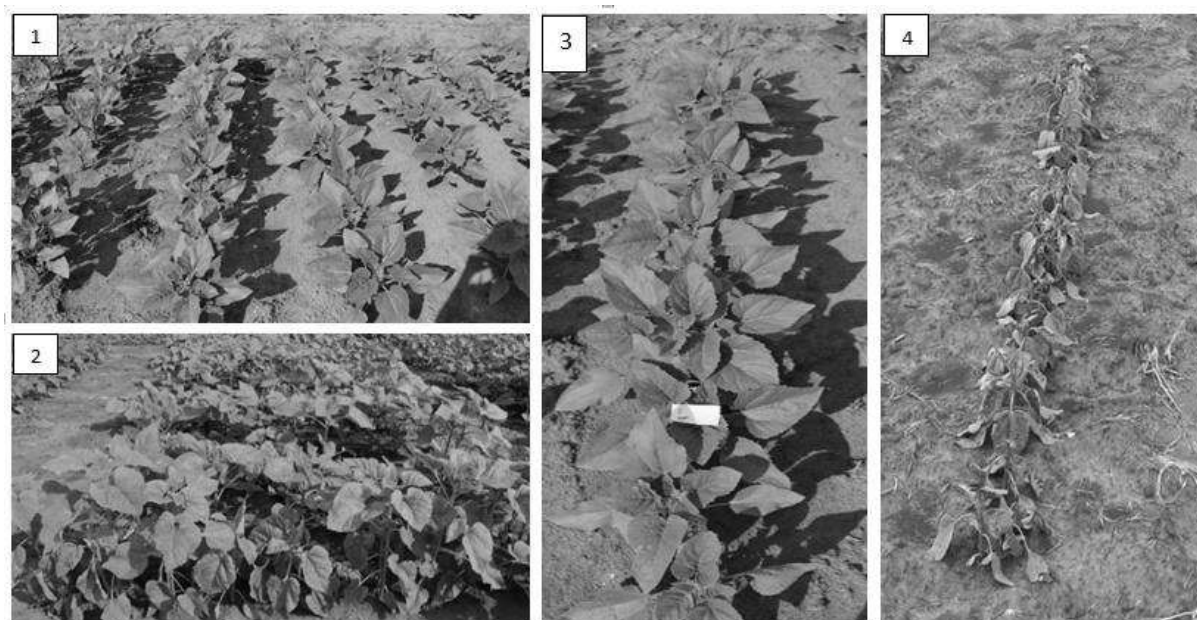


Рис. 2. Обробка гербіцидом Гранстар Голд 75 рослин F_2/F_3 покоління соняшника: 1 – ділянка рослин до обробки гербіцидом, 2 – гетерозиготні рослини по гену стійкості до гербіциду трибенурон метилу, 3 – стійкі гомозиготні рослини по гену стійкості, 4 – не стійкі гомозиготні рослини по гену стійкості до гербіциду.

Таблиця. Статистичний аналіз розщеплення за ознакою стійкості до трибенурон метилу трьох комбінацій схрещувань ліній соняшника

Комбінація	Стійка гомозигота (AA)	Гетерозигота по стійкості (Aa)	Нестійка гомозигота (aa)
BH0118xSURES-2	1120	2253	1127
BH0218xSURES-2	1123	2252	1125
BH0318xSURES-2	1121	2254	1125

Таким чином, в результаті роботи протягом двох років нам вдалось виділити з кожної з комбінації соняшника BH0118xSURES-2, BH0218xSURES-2 та BH0318xSURES-2 по 10 гомозиготованих ліній відновників фертильності, що мають стійкість до гербіциду трибенурон метилу. Виділені гомозиготовані лінії в подальшому будуть проаналізовані на предмет їх загальної та специфічної комбінаційної здатності цих генотипів та будуть використані в селекційному процесі для отримання гібридів F1 покоління.

Висновки

Використання технології культивування незрілих зародків соняшника в культурі *in vitro* дозволяє ефективно прискорювати гомозиготацію ліній соняшника для виділення відновників фертильності, стійких до гербіциду трибенурон

метилу. Проведена робота демонструє практичний результат використання культури незрілих зародків соняшника *in vitro*. Протягом проведеного дослідження, що зайняло 2 роки, нами було виділено з трьох генотипів по 10 ліній відновників фертильності, що мали стійкість до гербіциду трибенурон метилу. Ці лінії в подальшому будуть включені в процес створення нових гібридів соняшника. Використання незрілих зародків соняшника *in vitro* – один з методів пришвидшення селекційного процесу, що дозволяє отримувати два–три покоління соняшника за рік.

Робота виконувалась у рамках наукового проекту ІКБГ НАН України: III-1-15 "Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетерологічних генів в рослинних системах".

References

- Seiler G.J., Qi L.L., Marek L.F. Utilization of sunflower crop wild relatives for cultivated sunflower improvement. *Crop Sci.* 2017. Vol. 57. P. 1083–1101. doi: 10.2135/cropsci2016.10.0856.
- Vear F. Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *Oilseeds & fats crops and lipids (OCL)*. 2016. Vol. 23, № 2. D202, P. 1–8. doi: 10.1051/ocl/2016006.
- Leclercq P. Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* 1969. Vol. 19. P. 99–106.
- Demurin J.N., Pihjtjareva A.A., Tronin A.S. Peredacha gena ustoichivosti k tribenuron-metilu v selekcionniy material podsolnechnika VNIIMK. *Nauchno-technicheskiy bulletin Vserossiyskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnih kultur*. 2013. Vol. 1. P. 153–154. [in Russian] / Демури́н Я.Н., Пихтъя́ре ва А.А., Тронин А.С. Передача гена устойчивости к трибенурон-метилу в селекционный материал подсолнечника ВНИИМК. *Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*. 2013. Вып. 1. С. 153–154.
- Olson B.L.S., Al-Khatib K., Aiken R.M. Distribution of resistance to imazamox and tribenuron-methyl in native sunflower. *National sunflower association*. 2004. URL: <http://www.sunflowerusa.com/research/research-workshop/documents/158.pdf> (дата звернення: 25.03.2020).
- Miller J.F., Al-Khatib K. Registration of two oilseed sunflower genetic stocks, SURES -1 and SURES -2, resistant to tribenuron herbicide. *Crop Science*. 2004. Vol. 44. P. 1037–1038.
- Notice of release of two sulfonylurea herbicide resistant sunflower genetic stocks. URL: <https://www.ag.ndsu.edu/fss/ndsu-varieties/fact-sheets-and-brochures/SURES12.pdf> (дата звернення: 25.03.2020).
- Kolkman J.M., Slabaugh M.B., Bruniard J.M., Berry S., Bushman B.S., Olungu C., Maes N., Abratti G., Zambelli A., Miller J.F., Leon A., Knapp S.J. Acetohydroxyacid synthase mutations conferring resistance to imidazolinone or sulfonylurea herbicides in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 2004. Vol. 109. P. 1147–1159. doi: 10.1007/s00122-004-1716-7.
- Sala C.A., Bulos M., Echarte A.M., Whitt S.R., Ascenzi R. Molecular and biochemical characterization of an induced mutation conferring imidazolinone resistance in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 2008. Vol. 118, № 1. P. 105–112. doi: 10.1007/s00122-008-0880-6.
- Sala C.A., Bulos M., Alteri E., Ramos M.L. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia*. 2012. Vol. 35, № 57. P. 57–70. doi: 10.2298/HEL1257057S.
- Finer J. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium. *Plant Cell Reports*. 1987. Vol. 6, № 5. P. 372–374. doi: 10.1007/BF00269564.

12. Malone-Schoneberg J., Scelonge C.J., Burrus M., Bidney D.L. Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants. *Plant Science*. 1994. Vol. 103, № 2. P 199–207. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90208-9](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90208-9).
13. Montathong K., Machikowa T., Muangsan N. Cytological and food reserve changes in sunflower cotyledons *in vitro*. *Suranaree Journ. of Scien. & Technol.* 2019. Vol. 26, № 2. P. 141-150.
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. Vol. 6. P. 479–487. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1026583931327>.
15. Soroka A., Lyakh V. Genetic variability in sunflower after mutagen treatment of immature embryos of different ages. *Helia*. 2009. Vol. 32, № 51. P. 33–45. doi: 10.2298/HEL0951033S.
16. Hewezi T., Rerrault A., Alibert G., Kallerhoff J. Dehydrating immature embryo split apices and rehydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new method for genetically transforming recalcitrant sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2002. Vol. 20. P. 335–345. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02772121>.

BABYCH V.O.^{1,2}, VARCHENKO O.I.^{1,2}, KUCHUK M.V.¹, PARIJ M.F.^{2,3}, PARIJ J.F.², SYMONENKO Yu.V.^{1,2}

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: viktoriababuch@ukr.net

² Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 30, e-mail: biotechvnis@gmail.com

³ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Ukraine, 03041, Kyiv, Heroiv Oborony str., 15

USE OF SUNFLOWER IMMATURE EMBRYOS CULTURE IN *IN VITRO* FOR FAST CREATION OF FERTILITY RESTORER RESISTANT TO TRIBENURON METHYL HERBICIDE

Aim. Acceleration of the sunflower lines homozygosity for isolation of the fertility restorer resistant to tribenuron methyl herbicide using *in vitro* culture of sunflower immature embryos. **Methods.** Methods of immature sunflower embryos cultivation in *in vitro* culture; methods of classical crossing. **Results.** As a result, homozygous genotype was created and isolated from three combinations (BH0118xSURES-2, BH0218xSURES-2 and BH0318xSURES-2) for 10 parent sunflower lines. **Conclusions.** The use of the technology of sunflower immature embryos cultivation in *in vitro* culture effectively accelerates the sunflower lines homozygosity for the fertility restorer isolation resistant to tribenuron methyl herbicide. The involvement of immature sunflower embryos cultivation in *in vitro* culture methods can reduce time for creation of initial parental sunflower lines twice.

Keywords: sunflower, immature embryos, *in vitro* culture, herbicide resistance, tribenuron methyl.