

БАБИЧ В.О.^{1,3}✉, ХОМУТОВСЬКА С.В.², КУЛІШ О.Ю.¹, СМІРНОВА В.А.^{1,3}, ПАРІЙ Я.Ф.²,
 ПАРІЙ М.Ф.^{1,2}, СИМОНЕНКО Ю.В.³

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України,
 Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв оборони, 15, e-mail: viktoriababuch@ukr.net

² Всеукраїнський науковий інститут селекції,
 Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

³ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
 Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

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

РЕГЕНЕРАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ЛІНІЙ КУЛЬТУРНОГО СОНЯШНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) В УМОВАХ *IN VITRO*

Соняшник (*Helianthus annuus* L.) разом із соєю (*Glycine max* L.) та ріпаком (*Brassica napus* L.) є однією з трьох найважливіших олійних культур світу, а для України він є основною олійною культурою, що, в свою чергу, говорить про його важливе значення для сільського господарства та, зокрема, для української селекції.

Перед селекціонерами стоїть завдання створення нових сортів та гібридів, що мають 1) стійкість до негативних абіотичних та біотичних факторів; 2) високу продуктивність та технологічність; 3) насіння з високим вмістом олії і збалансований вміст жирних кислот і токоферолів [1]. Маючи незначне генетичне різноманіття соняшника, селекціонери залучають до методів класичної селекції біотехнологічні прийоми і методи, зокрема генетичну трансформацію і соматичну гібридизацію з дикими видами. Це дозволяє переносити в культурні форми такі ознаки та властивості, як: резистентність до бактеріальних та грибних інфекцій, стійкість до шкідників, збільшення вмісту ненасичених жирних кислот тощо [2]. Зменшення періоду створення нового сорту чи гібрида є основною метою селекціонерів [3].

Із використанням методів культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин можна скоротити селекційний процес та підвищити його ефективність. Працюючи з культурою *in vitro*, особливу увагу приділяють клітинній селекції, оскільки за її допомогою в контрольованих умовах можна відбирати з калусної тканини, що складається з мільярдів клітин, резистентні клітини, а потім з них отримувати рослини-регенеранти [4]. Таким чином, поєднанням класичної селекції та біотехнологічних прийомів та методів можна прискорити створення нових сортів та гібридів.

Дослідженнями регенераційної здатності соняшника займалися багато груп вчених (Shin D.-H. et al. (2000) [5], Михальська С.І. та ін. (2009) [6], Wang Y. et al. (2011) [7] та інші). Всі вони дійшли висновку, що під час роботи з соняшником необхідно враховувати генотип, тип експланта та склад живильного середовища. Вдосконалення соняшника буде максимальним за умов наявності ефективної системи регенерації в умовах *in vitro*, що дозволить оптимізувати процес отримання рослин із новими господарсько-цінними ознаками [8].

Під час культивування соняшника важким етапом є не тільки індукція пагоноутворення з експлантів, що легко формують калусну тканину, але й переведення їх зі стадії калусогенезу в стадію органогенезу [9, 10].

У більшості випадків протоколи методики, розробленої для конкретного генотипу, не завжди є дієвими для інших форм соняшника. Тому метою нашої роботи було дослідження та розробка ефективної системи регенерації для трьох генотипів однорічного соняшника української селекції.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Для проведення досліджень було використано три генотипи однорічного соняшника (0001в, 0002в та 006в) вітчизняної селекції, які були надані Всеукраїнським науковим інститутом селекції (ВНІС).

Стерилізація рослинного матеріалу. Зріле насіння стерилізували у 70 % етиловому спирті протягом 5 хв та 15 % розчині гіпохлориту натрію протягом 25 хв, після чого насіння п'ятикратно промивали стерильною дистильованою водою. Стерильне насіння переносили на агаризоване живильне середовище Мурасіга-Скуга

(МС) [11] з метою його пророщення, а в подальшому – для виділення з нього різних типів експлантів. Культивували насіння протягом 5 діб за температури 25–26 °С з 16годинним фотоперіодом та освітленням 3–4 клк.

Культивування *in vitro* та регенерація. Експланти виділяли з проростків соняшника на 5–7 день (залежно від генотипу). Експлантами служили: сім'ядолі, гіпокотиль, підсім'ядольне коліно та корені. Експланти культивували на кожному середовищі з різним співвідношенням 6-бензиламінопурину (БАП) та 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) до появи рослин-регенерантів. Для більшості генотипів цей період тривав близько двох тижнів, після чого проводилася статистична обробка отриманих результатів. Відсоток регенерації встановлювали співвідношенням кількості експлантів із регенерантами до загальної кількості експлантів.

Індукцію пагоноутворення здійснювали на модифікованому живильному середовищі МС з додаванням різних співвідношень регуляторів росту: 0,1 мг/л НОК, 0,2 та 1,0 мг/л БАП. Протягом двотижневого культивування за різних співвідношень БАП та НОК спостерігалася поява рослин-регенерантів.

Результати та обговорення

Використані нами генотипи раніше не застосовувались у дослідженнях регенераційної здатності в умовах *in vitro*.

Вивчаючи регенераційну здатність, ми відзначили відмінність при використанні різних експлантів соняшника і співвідношень концентрацій фітогормонів і регуляторів росту. Кожен тип експлантів та генотип формували калюсну ткани-

ну, що різнилася як за зовнішнім виглядом, так і за регенераційною здатністю. Частота регенерації соняшника в умовах *in vitro* варіює залежно від типу експланта, генотипу та складу живильного середовища. Частота утворення рослин-регенерантів за різних співвідношень регуляторів росту представлена в таблиці 1 та 2.

Аналізуючи отримані після двотижневого культивування на середовищі з БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л результати, можна зробити висновки, що для досліджуваних генотипів кращими типами експлантів є підсім'ядольне коліно та гіпокотиль, для яких частота формування рослин-регенерантів була в межах 4–14 %. Формування рослин-регенерантів із сім'ядоль та коріння помічено не було, проте спостерігалось утворення калюсної тканини. Однак у лінії 0002ВНІС спостерігалось незначне формування рослин-регенерантів (3,5 %) із сім'ядольних експлантів. Це може свідчити про те, що така концентрація фітогормонів для цього типу експланту та генотипу може бути ефективною або такий генотип є чутливим та позитивно відкликається на таке співвідношення регуляторів росту.

Регенераційну здатність у різних типів експлантів, де була використана концентрація фітогормонів БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л, можна спостерігати на рисунку 1. За використання концентрацій БАП 0,2 мг/л та НОК 0,1 мг/л утворення рослин-регенератів спостерігали з підсім'ядольного коліна та гіпокотіля, відсоток регенерації становив 6–12,5 %. Котиледонові та кореневі експланти за таких концентрацій БАП та НОК не формували рослин-регенерантів.

Багато груп учених вивчали регенераційну здатність у різних ліній та гібридів соняшника.

Таблиця 1

Результати дослідження регенераційної здатності на середовищі з БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л

Генотип	Тип експланту	Кількість експлантів	Кількість регенерантів	Відсоток регенерації
0002ВНІС	Сім'ядолі	200	0	0
	Підсім'ядольне коліно	200	23	11,5
	Гіпокотиль	200	11	5,5
	Коріння	200	0	0
0004ВНІС	Сім'ядолі	200	7	3,5
	Підсім'ядольне коліно	200	28	14
	Гіпокотиль	200	15	7,5
	Коріння	200	0	0
0007ВНІС	Сім'ядолі	200	0	0
	Підсім'ядольне коліно	200	25	12,5
	Гіпокотиль	200	8	4
	Коріння	200	0	0

Таблиця 2

Результати дослідження регенераційної здатності на середовищі з БАП 0,2 мг/л та НОК 0,1 мг/л

Генотип	Тип експланту	Кількість експлантів	Кількість регенерантів	Відсоток регенерації
0002ВНІС	Сім'ядолі	200	0	0
	Підсім'ядольне коліно	200	22	11
	Гіпокотиль	200	12	6
	Коріння	200	0	0
0004ВНІС	Сім'ядолі	200	0	0
	Підсім'ядольне коліно	200	22	11
	Гіпокотиль	200	12	6
	Коріння	200	0	0
0007ВНІС	Сім'ядолі	200	0	0
	Підсім'ядольне коліно	200	25	12,5
	Гіпокотиль	200	6	3
	Коріння	200	0	0



А



Б



В



Г

Рис. 1. Регенерація соняшника на середовищі з БАП 1 мг/л та НОК 0,1 мг/л (А – гіпокотильний експлант, Б – підсім'ядольне коліно, В – сім'ядолі, Г – справжні листки)

Так, Shin D-H. et al. (2000) прийшли до висновку, що важливим фактором для регенерації соняшника є вік експлантів, концентрація регуляторів росту, склад живильного середовища та генотип. У дослідженнях ними були використані в якості експлантів ембріональні меристеми та примор-

діальні листкові тканини, два типи основних середовищ (МС та Б5), а також ауксини та цитокініни. Найбільш ефективним середовищем було МС з додаванням 2 μM БАП та 1 μM НОК [5].

Wang Y et al. (2011) у своїй роботі оптимізували процес індукції калусоутворення, дифе-

ренціації та вкорінення рослин. Було встановлено, що оптимальним середовищем для індукції калусоутворення є МС з додаванням 2 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК та 1 мг/л кінетину. Найвищий рівень диференціації спостерігався на середовищі МС з 0,2 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК, 0,3 мг/л кінетину, 0,3 мг/л AgNO₃ та 0,2 мг/л активованого вугілля. Для укорінення експлантів найкращим було середовище ½МС з 0,6 мг/л індолилмасляної кислоти [6].

Михальська С.І. зі співробітниками (2009) досліджувала регенерацію лінії та гібридів соняшника в культурі *in vitro*, яка відбувалася шляхом прямого морфогенезу. Середовище МС, використане в дослідженнях, було модифіковане БАП 1 мг/л, НОК 0,1 мг/л та тіосульфатом натрію 20 мг/л. За результатами експериментів учених, частота регенерації становила 30–98 % для котиледонових та гіпокотильних експлантів [7].

Порівнюючи наші результати та результати інших груп дослідників, можна стверджувати, що соняшник належить до видів із низькою реге-

нераційною здатністю і під час роботи з ним необхідно розробляти ефективну систему регенерації для кожного конкретного генотипу [12].

Висновки

У результаті проведеного дослідження регенерації ліній культурного соняшника в умовах *in vitro* нами було встановлено, що відсоток регенерації є вищим у експлантів із підсім'ядольного коліна та гіпокотилія, ніж з котиледонових та кореневих експлантів. Однак у лінії 0002ВНІС спостерігалася регенерація з котиледонових експлантів. Це може свідчити про те, що цей генотип є чутливим та позитивно відкликається на співвідношення БАП та НОК з концентраціями 1 та 0,1 мг/л. Результати проведених нами досліджень підтверджують дані опрацьованих наукових джерел про те, що регенераційна здатність у однорічного соняшника є генотипзалежною, тому є необхідність у розробці ефективної системи регенерації для кожної конкретної лінії соняшника.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кириченко В. В. Селекція і семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). – Харків: Інститут растениеводства ім. В.Я. Юрьєва, 2005. – 385 с.
2. Dagustu N., Bayram G., Sincik M., Bayraktaroglu M. The short breeding cycle protocol effective on diverse genotypes of sunflower // *Turkish J. of field crops*. – 2012. – 17, N 2. – P. 124–128.
3. Davey R. Michael, Jun Masood Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Genetic improvement using conventional and *in vitro* technologies // *Journal of Crop Improvement*. – 24. – 2010. – P. 349–339.
4. Ozyigit I.I., Gozukirmizi B.D. Genotype dependent callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *Semiz African Journal of Biotechnology*. – 2007. – 6, N 13. – P. 1498–1502.
5. Dong-Ho Shin, Jin Sook Kim, In Jeong Yang, Soo Kyung Oh, Gab Chea Chung, Kyng-Hwan Han. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*. – 2000. – 36. – P. 273–278.
6. Михальская С.И., Комисаренко А.Г., Малина А.Э., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2009. – 41, N 3. – С. 255–262.
7. Wang Y, Li C., Zhang Y., Chen Y., Zhao L., Yue P., Teng X., Wang N. Establishing the regeneration system of sunflower // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. – 2011. – 27, N 9. – P. 1379–1389.
8. Davey R. Michael, Jun Masood Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Genetic improvement using conventional and *in vitro* technologies // *Journal of Crop Improvement*. – 2010. – 24. – P. 349–339.
9. Зузель Т.Г., Горбатенко Э.В., Ралдугина Г.Н. Регенерация *in vitro* растений подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) через соматический эмбриогенез // *Генетика*. – 1995. – 31, N 2. – С. 228–233.
10. Khalid M.B. Chraibi, Castelle J.-C., Latche A., Roustan J.-P., Fallot J. A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) The role of ethylene // *Plant Science*. – 1992. – 86. – P. 215–221.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant*. – 1962. – 15. – P. 473–497.
12. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Агропромиздат, 1990. – 384 с.

BABYCH V.O.^{1,3}, KHOMUTOVSKA S.V.², KULISH O.YU.¹, SMIRNOVA V.A.^{1,3}, PARIJ YA.F.², PARIJ M.F.^{1,2}, SYMONENKO YU.V.³

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine;
Ukraine, 03041, Kyiv, Heroyiv Oborony str., 15, e-mail: viktoriababuch@ukr.net

² Ukrainian Science Institute of Plant Breeding
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 30

³ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, 0314, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148

REGENERATIVE ABILITY OF SUNFLOWER CULTIVATED LINES (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) IN VITRO

Aim. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most important oil crops in the world. The application of biotechnological methods for the study and the improvement of the sunflower is mainly limited by the difficulty of regeneration of plants in a reproducible and efficient fashion. Therefore an efficient plant regeneration system is necessary for successful use and improvement of cultural sunflower. **Methods.** Cultivation of different types of sunflower explants *in vitro*. **Results.** The study of regeneration capacity of sunflower shows the difference between the ratio and concentration of phytohormones and type of explants that were used in our experiments. The regeneration frequency of sunflower *in vitro* varies depending on the type of explants, genotype and composition of the nutrient medium. **Conclusions.** In the study of different genotypes of sunflower we have shown that hypocotyls are better as explants than cotyledons and roots due to their regeneration capacity. Regeneration efficiency for this type of explants was 6–14%.

Keywords: Sunflower (*Helianthus annuus* L.), plant regeneration, hypocotyls, cotyledons.