

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ГОРМОНАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ГАПЛОИДОВ У РАПСА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

А.И. Сорока

Институт масличных культур Национальной академии аграрных наук Украины

На трех сортообразцах рапса озимого и ярового селекции Института масличных культур изучено действие фитогормонов класса цитокининов и ауксинов на процессы индукции новообразований при получении гаплоидов в искусственных условиях *in vitro*. Показано, что индукция развития микроспор по спорофитному пути может вызываться как цитокининами, так и ауксинами, а также их сочетанием. Наиболее эффективным оказалось совместное действие цитокинина БАП и ауксина 2,4-Д, а также действие одного цитокинина. Использование ауксина НУК было менее результативным по сравнению с 2,4-Д. Состав базовой среды (МС или В₅) оказывал незначительное влияние на частоту индукции новообразований у изученных генотипов.

Ключевые слова: ауксин, цитокинин, морфогенное образование, питательная среда, пыльник, микроспора, рапс.

Введение. Технологии получения константного гомогенного материала, основанные на методах экспериментальной гаплоидии, используются у целого ряда культур. На сегодня такие технологии разработаны более чем для 250 видов растений, принадлежащим к разным семействам (Maluszynski et al 2003). Широкий интерес к подобным технологиям обусловлен тем, что применение клеток с одинарным набором хромосом для создания выровненных линий позволяет сделать это существенно быстрее, чем традиционными полевыми методами. Фактически полная гомозиготность достигается в течение всего одного семенного поколения, что позволяет экономить значительные силы и ресурсы, направляя их на решение других проблем. Более того, у видов с четко выраженным проявлением самонесовместимости или вегетативно размножаемых, гаплоидия может быть единственным реальным методом получения инбредных линий. Одним из общепризнанных способов для создания константных коммерческих линий сельскохозяйственных культур является метод культуры пыльников и микроспор, при котором используется явление андрогенеза *in vitro*. При этом в работу берут пыльники, в которых микроспоры находятся на определенной стадии развития, поскольку известно, что способность клеток менять тип развития с гаметофитного на спорофитный сохраняется лишь в течение некоторого времени, когда микроспоры находятся, преимущественно, во временном интервале первого пыльцевого митоза (Тоугаев et al 1997).

Однако, несмотря на очевидные преимущества гаплоидной технологии, в промышленном масштабе она применяется для весьма ограниченного числа

видов. Это связано с рядом причин, как биологического (длительность цикла развития, уровень пloidности, способ размножения, базовый набор хромосом и прочее), так и технического характера (специальное оборудование, сложности стерилизации, особенности методик культивирования и т.п.). Кроме того, эффективность имеющихся методик формирования новообразований из гаплоидных клеток часто зависит не только от вида используемого растения, но и от особенностей конкретного генотипа, что говорит о, как минимум, неоднозначном влиянии генов на процесс индукции гаплоидных структур. Так, достаточно хорошо известна различная реакция генотипов на культивирование *in vitro* у представителей целого ряда семейств, таких, например, как паслёновые, злаковые, капустные, бобовые и многих других (Zagorska 1998; Ghasemi Bezdi et al 2007).

Процессы морфогенеза и регенерации в культуре *in vitro* подвержены влиянию ряда факторов. Одними из наиболее важных из них являются состав питательной среды и набор используемых фитогормонов (Escandon & Nahne 1991; Chen & Dribnenki 2002).

Регуляторы роста, фитогормоны, как натуральные, так и искусственные, являются главным средством управления онтогенезом растений. Они участвуют в регулировании процессов дифференцировки клеток и клеточных делений, образования тканей и органов, изменения темпов роста и развития, длительности прохождения тех или иных этапов онтогенеза. Поэтому фитогормоны широко применяются при разработке и внедрении самых разных биотехнологических методик, включая процессы, инициирующие формирование гаплоидных структур из генеративных клеток высших растений.

Основными классами фитогормонов, используемыми в биотехнологии растений, в частности при индукции образования гаплоидов, являются ауксины и цитокинины. Другие группы фитогормонов, такие как гибберелины, брассиностероиды, жасмонаты, этилен и т.п., применяются значительно реже.

Механизм действия фитогормонов на клетку достаточно сложен и может иметь различный характер. Во-первых, показано, что фитогормональный сигнал воспринимается специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клеточной мембраны. Это изменяет конформационную структуру рецепторного белка, таким образом, передавая сигнал внутрь клетки. В дальнейшем, через ряд последовательных изменений пространственной структуры, активации или ингибирования цепи ферментов, гормональный сигнал достигает генетического аппарата, где вызывает высокоспецифичное изменение активности определенных генов, запускающих те или иные генетические программы.

Не менее важным механизмом можно считать изменение электрического потенциала клеток при действии фитогормонов. Так, они оказывают влияние на электрическую полярность мембран, в частности, на системы первичного активного транспорта, например, посредством изменения активности H^+ -АТФазы (Opritov et al 1991). Кроме прямого регуляторного влияния это может в значительной степени изменять и сам характер действия фитогормонов.

Понимание особенностей действия фитогормонов осложняется тем, что система гормональной регуляции процессов жизнедеятельности растений многокомпонентна. Это проявляется в том, что на один и тот же физиологический процесс чаще всего оказывает влияние не один, а несколько

фитогормонов, охоплюючи широкий ряд аспектів метаболізму клітки. Змінення можуть затрагувати біохімічні, біофізичні, фізіологічні сторони морфогенеза, викликаючи структурні перетворення самої різної направленості.

В зв'язі з вищесказаним, метою нашої роботи було на матеріалі селекції Інституту масличних культур протестувати набір поживних серед з різним базовим складом і різним співвідношенням фітогормонів для вивчення закономірностей їх впливу на процеси індукції новоутворень в культурі пильників рапса.

Матеріал і методи досліджень

В якості матеріалу використовували два сортообразці рапса озимого (№ 1 і № 2) і один зразок рапса ярового, надані лабораторією селекції рапса Інституту масличних культур. Відокремлені суцвіття утримували на фоні пониженої температури 6-8°C декілька днів, а потім в асептичних умовах відокремлювали пильники з незрілими пильцевими зернами і висаджували на поживні середовища. Пильники сортообразців озимого рапса культивували на середовищах, що відрізняються як базовим складом, так і складом фітогормонів. В якості базових серед використовували середовища МС (Murashige & Skoog 1962) і В₅ (Gamborg et al 1968). В базові середовища на основі МС і В₅ додавали фітогормони в наступних концентраціях – 0,6 мг/л БАП (6-бензиламінопурін), 0,6 мг/л 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиацетична кислота), 0,3 мг/л БАП + 0,3 мг/л 2,4-Д. Пильники ярового рапса висаджували на поживні середовища одного базового складу МС, що відрізняються складом фітогормонів. В якості фітогормонів використовували 0,6 мг/л БАП, 0,6 мг/л 2,4 Д, 0,4 мг/л БАП і 0,4 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л НУК (α -нафтилуксусна кислота) і 0,1 мг/л 2,4-Д. В кожному варіанті культивували до 300 пильників. Кількість новоутворень різного типу на пильниках враховували впродовж 30-40 днів культивування. Відмінності між варіантами оцінювали, використовуючи стандартний t-критерій.

Результати досліджень і їх обговорення

Проведені дослідження показали, що в культурі пильників рапса на випробованих поживних середовищах відбувається формування морфогенних структур різного (ембріониди і каллус) типу (табл. 1 і 2). Як видно з даних табл. 1, склад базової середовища не мав суттєвого впливу на індукцію новоутворень. Це стосувалося обох досліджених зразків озимого рапса.

Введення в склад поживної середовища фітогормонів різного виду дозволило виявити деякі закономірності їх дії. Так, синтетичний ауксин 2,4-Д, незалежно від складу базової середовища, викликає формування новоутворень у вигляді каллусів або ембріонидів, хоча і з невисокою частотою. Схоже діє фітогормон БАП цитокинінового ряду. В даному випадку частота новоутворень була декілька вище, а самі новоутворення частіше були представлені ембріонідами. Однак, найбільш сприятливим для ініціації морфогенних структур виявилось спільне діє цитокиніну з ауксином. Дане поєднання фітогормонів викликало утворення цих структур з частотою 24,5-14,7% у різних генотипів рапса озимого.

Очевидно, специфика действия цитокинина и ауксина на клеточный метаболизм обуславливает синергизм их влияния на процессы морфогенеза.

Это подтверждается данными и других авторов, обнаруживших еще в первых экспериментах на культуре тканей *in vitro*, что только добавление цитокининов в среду с ауксином вызывало регенерацию побегов при культивировании каллусов табака (Skoog & Miller 1957).

Таблица 1

Влияние базовой среды и состава фитогормонов на количество новообразований у рапса озимого (2015-2016 гг.)

Базовая среда	Состав фитогормонов	Количество пыльников с новообразованиями разного типа, %
<i>Образец № 1</i>		
МС	БАП	8,8±1,65
	2,4-Д	3,1±0,66
	БАП+2,4-Д	24,5±4,40*
В ₅	БАП	7,1±2,15
	2,4-Д	2,0±0,44
	БАП+2,4-Д	17,2±3,50*
<i>Образец № 2</i>		
МС	БАП	5,2±1,67
	2,4-Д	1,8±0,50
	БАП+2,4-Д	21,7±4,15*
В ₅	БАП	2,4±0,57
	2,4-Д	0,0
	БАП+ 2,4-Д	14,7±3,39*

* - различия между вариантами с добавлением либо цитокинина, либо ауксина и вариантами с добавлением обоих фитогормонов существенны при $p < 0,05$

Наличие в среде фитогормонов лишь одного типа в нашем эксперименте было менее эффективным.

Эксперимент по влиянию фитогормонов на индукцию развития новообразований в культуре пыльников был проведен еще на яровом рапсе. В данном случае использовали единую базовую среду МС. Опыт включал варианты, в которых фитогормоны отсутствовали (контроль), а также различные сочетания ауксина и цитокинина. Результаты представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, при добавлении веществ гормонального действия, таких как 2,4-Д, НУК, БАП и их комбинации, наблюдается развитие новообразований различного происхождения. В контрольном варианте формирования новообразований не отмечали.

Относительно действия фитогормонов, то оно, в общем, согласуется с данными таблицы 1, где наблюдали формирование некоторого количества новообразований при наличии в среде ауксина либо цитокинина и гораздо более высокую частоту формирования таких структур при совместном действии цитокинина БАП с ауксином 2,4-Д. Однако в данном случае достаточно эффективной оказалась также среда, в которой присутствовал лишь один цитокинин. Вариант, в котором действие ауксина 2,4-Д сочеталось с действием другого ауксина – НУК, оказался практически неэффективным. Вероятно, количество обоих ауксинов оказалось недостаточным, чтобы выявить определенное стимулирующее влияние на процессы морфогенеза.

Таблица 2

Влияние типа фитогормонов на формирование новообразований у образца № 1 рапса ярового (2015-2016 гг.)

№ среды	Тип среды	Состав фитогормонов	Пыльников с новообразованиями разного типа, %
1	Контроль	Без гормонов	0
2	Ауксин	2,4-Д	0,6±0,12*
3	Цитокинин	БАП	6,1±1,14* [@]
4	Ауксин + цитокинин	2,4-Д + БАП	8,5±1,58* [@]
5	Ауксин + ауксин	2,4-Д + НУК	0,3±0,07*

* - различия между контролем и вариантами 2-5 существенны при $p < 0,05$;

[@] - различия между вариантами 3, 4 и 2, 5 существенны при $p < 0,05$

Таким образом, установлено, что для индукции новообразований из микроспор в культуре пыльников рапса на испытанных генотипах лучшее действие оказывало сочетание цитокинина с ауксином, либо использование только одного цитокинина БАП без сочетания с другими изученными фитогормонами. Заметная эффективность одного цитокинина может быть связана с изменением под его влиянием активности определенного набора генов, стимулирующих компетентный ответ данного типа клеток и вызывающих, в частности, синтез специфических регуляторных белков. Добавление к питательной среде еще одного ауксина НУК мало влияло на процессы формирования гаплоидных структур или ингибировало их образование.

Выводы

На примере материала селекции Института масличных культур показано, что для индукции новообразований в культуре пыльников рапса эффективными являются фитогормоны класса цитокининов и ауксинов, причем их сочетание действует значительно результативнее.

В качестве цитокининов рекомендуется использовать бензиламинопури (БАП), а в качестве ауксинов – 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д).

References

- Chen Y, Dribnenki P (2002) Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Repts* 21(3):204–207
- Escandon AS, Nahne G (1991) Genotype and composition of culture medium are factors important in the selection for transformed sunflower (*Helianthus annuus*) callus. *Physiol Plant* 81(3):4–5
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Ghasemi Bezdi K, Karlov G, Ahmadikhah A (2007) Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot in vitro organogenesis. *African Journal of Biotechnology* 6(7):861-867
- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds.) (2003) *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Murashige J, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497
- Oprytov VA, Pyatygin SS, Retivin VG (1991) Bioelektrogeenez u vysshikh rasteniy (Bioelectrogenesis in higher plants) (In Russian). M, Nauka
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11:118–131
- Touraev A, Stoger E, Voronin V, Heberle-Bors E (1997) Plant male germ line transformation. *Plant Journal* 12(4):949-956
- Zagorska NA, Shtereva AA, Dimitrov BD, Kruleva MM (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Influence of genotype on androgenetic ability. *Plant Cell Reports* 17(12):968–973

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ГОРМОНАЛЬНИХ КОМПОНЕНТІВ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ІНДУКЦІЮ НОВОУТВОРЕНЬ ПРИ ОТРИМАННІ ГАПЛОЇДІВ У РІПАКА В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

А.І. Сорока

Інститут олійних культур Національної академії аграрних наук України

Регулятори росту, фітогормони, як натуральні, так і штучні, є головним засобом управління онтогенезом рослин. Вони беруть участь в регулюванні процесів диференціювання клітин і клітинних поділів, утворення тканин і органів, зміни темпів росту та розвитку, тривалості проходження тих чи інших етапів онтогенезу. Основними класами фітогормонів, використовуваними в біотехнології рослин, зокрема при індукції утворення гаплоїдів, є ауксини і цитокиніни. Механізм дії фітогормонів на клітину досить складний і може мати різний характер. Розуміння особливостей дії фітогормонів ускладнюється тим, що система гормональної регуляції процесів життєдіяльності рослин багатокомпонентна. Це проявляється в тому, що на один і той же

фізіологічний процес найчастіше впливає не один, а кілька фітогормонів, охоплюючи широкий ряд аспектів метаболізму клітини. У зв'язку з вищесказаним, метою нашої роботи було на матеріалі селекції Інституту олійних культур протестувати набір поживних середовищ з різним базовим складом і різним набором фітогормонів для з'ясування закономірностей їх впливу на процеси індукції новоутворень в культурі пиляків ріпака у штучних умовах *in vitro*. У кожному варіанті культивували до 300 пиляків.

На трьох сортосразках ріпака озимого і ярого було показано, що індукція розвитку мікроспор по спорофітному шляху може викликатися як цитокінінами, так і ауксинами, а також їх поєднанням. Найбільш ефективним виявилось спільна дія цитокініну БАП і ауксину 2,4-Д, а також дія одного цитокініну. Використання ауксину НУК було менш результативним у порівнянні з 2,4-Д. Склад базового середовища (МС або В₅) виявляв незначний вплив на частоту індукції новоутворень у вивчених генотипів.

Ключові слова: ауксин, цитокінін, морфогенне утворення, поживне середовище, пиляк, мікроспора, ріпак.

SOME INFLUENCE OF THE HORMONAL COMPONENTS IN NUTRIENT MEDIUM ON THE INDUCTION OF NOVEL STRUCTURES WHEN OBTAINING RAPESEED HAPLOIDS THROUGH *IN VITRO* CULTURE

Soroka A.I.

Institute of Oilseed Crops of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

Growth regulators, phytohormones, both natural and artificial, are the main means to control plant ontogenesis. They are involved in regulating the processes of cell differentiation and cell divisions, the formation of tissues and organs, the changes in the rate of growth and development, the duration of the certain stages of ontogenesis. The main classes of phytohormones used in plant biotechnology, in particular, in the induction of haploid structures, are auxins and cytokinins. The mechanism of action of phytohormones on a cell is rather complicated and may have a different character. Understanding the characteristics of the action of phytohormones is complicated by the fact that the system of hormonal regulation of plant life is multicomponent. This is manifested in the fact that the same physiological process is most often influenced not by one, but by several phytohormones, covering a wide range of aspects of cell metabolism.

In connection with the foregoing, the purpose of our work was to test a set of nutrient media with different basic composition and different proportions of phytohormones to determine the patterns of their influence on the processes of haploid structure induction in rape anther culture using accessions, developed at the Institute of Oilseed Crops NAAS.

The material used was two accessions of winter rapeseed (No. 1 and No. 2) and one sample of spring rapeseed, provided by the Rapeseed Breeding laboratory of the Institute of Oilseed Crops. Incised inflorescences were kept against the background of low temperature of 6–8 ° C for several days, and

then, under aseptic conditions, anthers with unripe pollen grains were isolated and planted on nutrient media differing in both basic mineral composition and content of phytohormones. MS (Murashige & Skoog 1962) and B5 (Gamborg et al 1968) media were used as basic media. Phytohormones were added to the basic media in various combinations – BA, 2,4-D, NAA at the concentrations of 0.1-0.6 mg/l. In each treatment up to 300 anthers were cultivated. Differences between treatments were evaluated using standard t-test.

Studies have shown that in the anther culture of rapeseed on the tested nutrient media, morphogenic structures of different types (embryoids and callus) were originated. Synthetic auxin 2,4-D, regardless of the composition of the basic medium, caused the formation of structures of both types, though with a low frequency. Phytohormone BA of the cytokinin type had a similar effect. In this case, the frequency of structures was slightly higher, and the developed structures were represented mainly by embryoids. The joint action of cytokinin and auxin was the most favorable for the initiation of morphogenic structures. Such combination of phytohormones caused the formation of these structures with a frequency of 24.5-14.7% in the studied genotypes of winter rape.

A similar effect of phytohormones on the induction and development of morphogenic structures was also observed in spring rape. In this case, a single basic MS medium was used. The experiment included treatments where phytohormones were absent (control), as well as various combinations of auxin and cytokinin. In the control treatment, the formation of new structures was not noted. In treatments with phytohormones, in addition to the medium with the combination of auxin and cytokinin, the medium in which only cytokinin was present was also rather effective. The treatment in which the action of auxin 2,4-D was combined with the action of another auxin, NAA, turned out to be practically ineffective.

Thus, it was found that for the induction of morphogenic structures from microspores in rape anther culture of the tested genotypes, the combination of cytokinin with auxin, or the use of only single cytokinin BA without other phytohormones, had the most positive effect.

Key words: auxin, cytokinin, morphogenic formation, nutrient medium, anther, microspore, rapeseed.