

# Індукований андрогенез

( Тези )

Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М.

Експериментальний індукований андрогенез – це спосіб отримання гаплоїдних рослин на живильних середовищах *in vitro* з ізольованих пиляків або мікроспор.

В умовах *in vitro* індукція утворення ембріодів може відбуватися двома шляхами – прямим – безпосередньо в культурі пиляків і мікроспор та непрямим шляхом – за рахунок утворення калусу та індукції соматичних зародків. Ембріод – це зародкоподібна біполярна структура, що утворюється асексуально. Цей термін було запропановано Везілом та Хільдебрантом для позначання зародкоподібних структур, які виникають як в умовах *in vivo* (“нуцеллярні” і “фоліарні” зародки), так і *in vitro*.

З точки зору селекції найбільш привабливим є прямий андрогенез, оскільки калус може утворюватися як з мікроспор, так і з соматичних клітин пиляків, а отримані регенеранти можуть мати різну плоїдність.

Відомо, що процес переходу мікроспор з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку визначається на генетичному рівні, але реалізується в залежності від конкретних фізіологічних умов та різних за дією індукуючих факторів. Це стадія розвитку мікроспор, на якій були ізольовані пиляки, температурним режим передобробки, склад живильних середовищ та умови культивування, які прискіпливо вивчалися на багатьох культурах.

Метод індукованого андрогенезу отримав широке розповсюдження. Його використовують більш ніж на 250 видів рослин для отримання гаплоїдів господарсько-цінних культур, в тому числі овочевих, плодових, зернових та інших. Це, наприклад, отримання гаплоїдів моркви, капусти, кукурудзи, ячменю, картоплі, пшениці, соняшнику. Найбільших успіхів в цьому досягли селекціонери Китаю, де створені нові високоврожайні та стійкі до негативних факторів навколишнього середовища сорти рису і пшениці, які вже

займають великі посівні площі: рис - 170000 га і пшениця- 70000 га. У нашій країні також створений андрогенний вихідний матеріал пшениці, кукурудзи, ячменю та деяких інших культур. рису, тютюну, картоплі.

Разом з тим спроби розробити метод прямого індукованого андрогенезу у цукрових буряків в культурі *in vitro* виявилися проблематичними.

### **Метод отримання гаплоїдів в культурі пиляків.**

Для індукції переходу на спорофітний напрям розвитку шляхом андрогенезу для передобробки експлантів в якості стресового фактора використовують знижені (2–8 °C ) або підвищені (30–35 °C) температури, осмотичний вплив, освітлення, хімічні реагенти, або комбінацію цих способів перед обробки. Застосування такої передобробки підвищує ефективність індукції – збільшує відсоток пиляків або мікроспор, які утворюють калус або ембріоїди.

Впливу температурних режимів піддають різні види експлантів (колоски, волоті, відрізки стебла з бутонами чи квітками, окремі бутони та пиляки). Способи температурної передобробки експлантів дуже різняться. Бутони та пиляки піддають температурному впливу на живильному середовищі, інші експланти, занурюють у воду, загортають в зволожений папір та поміщають в холодильну камеру.

Для підвищення андрогенетичної активності пиляків було проведено дослідження з обробки експлантів різними реагентами – нітратом срібла, гормональними речовинами: 6-БАП, гібереліном. Для зміни гормональних балансів донорних рослин були застосовані щеплення, наприклад, для стимуляції прямого андрогенезу картоплі її щеплювали з томатами, а також підвищували освітлення до 10–15 клк.

Відомо використання абсцизової кислоти (АБК) у дозах 0,1 та 0,5 мг/л у вигляді водного розчину для обробки пшениці (пагонів з колосками), що забезпечує отримання більшої кількості морфогенних пиляків та новоутворень та збільшення регенерації рослин.

Згідно даним літератури АБК – сесквітерпеноїд фітогормон з інгібуючою дією, регулює декілька важливих процесів, зокрема, накопичення елементів живлення, підсихання, передчасне проростання, за якими слідує структуроутворення ембріонів рослин .

Відомий також спосіб передобробки експлантів моркви, згідно якого бутони моркви культивують на агаризованому середовищі Мурасіге–Скуга (МС) з 0,2 мг/л 2,4-Д. протягом 2–4 тижнів в темряві в термостаті при 20–25 °С . Пиляки, що розрослися, вилучають з бутонів та переносять на свіже середовище того ж складу, культивують за температури 20–25 °С, освітленні 2–3 клк 16 годин до утворення ембріоїдів або ембріогенного калусу (5–6 тижнів).

Здатність до андрогенезу в значній мірі залежить від фази розвитку мікроспор в момент їх введення в культуру *in vitro*. Тому важливо визначити оптимальну фазу розвитку мікроспор, що найбільш сприятлива для інокуляції на живильні середовища. При аналізі літературних джерел визначено 5 основних фаз розвитку мікроспор: тетрада, невакуолізована мікроспора, слабовакуюлізована мікроспора, сильновакуюлізована мікроспора, трьохклітинний пилкок. Оптимальною фазою розвитку мікроспор для інокуляції може бути як невакуолізована мікроспора – наприклад, для капусти білокачанної, так і вакуолізована мікроспора – для пшениці, моркви , кукурудзи.

За результатами наших встановлено, що для цукрових буряків фаза вакуолізованої мікроспори є оптимальною для інокуляції пиляків на живильне середовище. Саме на цій фазі спостерігали ембріогенез і формування мікроклонів. Тоді як інокуляція пиляків з пилком на інших фазах розвитку не було результативним.

Визначено, що фаза одноядерної вакуолізованої мікроспори є оптимальною для інокуляції пиляків на живильне середовище при порівнянні з фазами невакуолізованої одноядерної мікроспори або три клітинним пилком.

## Непрямий андрогенез у цукрових буряків

В наших дослідженнях встановлено, що утворення калусних тканин на пиляках цукрових буряків в умовах *in vitro* відбувається на модифікованому середовищі Мурасіге-Скуга, що містить зменшену у 2 рази дозу макроелементів та повну дозу мікроелементів, додаванням регуляторів росту: 2,4-Д – 1,0-2,5 мг/л та БАП – 0,3-0,8 мг/л, вітамінів за Гамборгом і аскорбінової кислоти в дозі 1,0 мг/л, амінокислот: глютамінової – 250,0 - 500,0 мг/л, аспарагінової кислоти – 30,0-50,0 мг/л, тіроzinу – 1,0-10,0 мг/л, аргініну – 2,0-10,0 мг/л, гідроксипроліну – 2,0-4,0 мг/л. Подальший ріст калусів забезпечувало друге середовище – модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням БАП – 0,5-1,5 мг/л, вітамінів та амінокислот за схемою першого середовища, а появу первинних корінців та бруньок – третє середовище – модифіковане середовище Мурасіге-Скуга, з додаванням БАП – 1,0-5,0 мг/л, ІОК або НОК 0,2-0,6 мг/л, ГК – 0,2-1,0 мг/л, а вітамінів та амінокислот також за схемою першого середовища.

Для ініціації калусогенезу при культивуванні ізольованих пиляків та отримання більшої кількості калусів, стимуляції морфогенезу подальшу модифікацію складу базових середовищ проводили за факторами: регулятори росту, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни.

Найбільш суттєве значення має підбір оптимальних концентрацій гормональних компонентів живильного середовища. Встановлено, що саме вміст 2,4-Д (1-2,5 мг/л мг/л), як основного регулятора росту, за наявності б-БАП (0,3-0,8 мг/л) у складі першої серії живильних середовищ, сприяє проліферації калусів при культивуванні пиляків цукрових буряків. Тоді, як збільшення вмісту цитокінінів в другій серії середовищ та корегування їх співвідношення з 2,4-Д таким чином, що їх вміст був вищим за вміст 2,4-Д сприяло росту та морфогенній активності калусів, отриманню великої кількості їх різновидов, Стимуляції органогенезу, з появою первинних корінців та бруньок сприяли середовища третьої серії, з іншим вмістом та

співвідношення регуляторів росту, а саме - 6-БАП – 1,0-5,0 мг/л, ІОК або НОК– 0,2-0,6 мг/л, ГК – 0,2-1,0 мг/л, кінетину – 0,1-1,0 мг/л.

З літературних джерел відомо, що збільшення в живильному середовищі кількості цукру при культивуванні недозрілих зародків цукрових буряків майже вдвічі збільшує частоту утворення проростків.

Згідно отриманих нами даних, при культивуванні пиляків цукрових буряків збільшення кількості цукру в середовищі суттєво не вплинуло на кількість новоутворень. Заміна сахарози мальтозою також не вплинула на кількість калусів, що утворилися, але сприяла значному збільшенню розмірів висаджених пиляків. Так, розмір пиляків на середовищі з мальтозою був майже в 2-2,5 рази більший від такого, який був при культивуванні пиляків на середовищі з сахарозою.

Спостереження показали, що перші новоутворення з'являлися через 6-7 діб від початку культивування (рис. 1, 2). Калуси розвивалися із різних структур: з поверхні пиляка, з залишків тичинкової нитки за рахунок її видовження та розвитку ініціюючих калусні тканини структур на їх кінчиках, з пилку. Калуси були переважно білого кольору або напівпрозорі і мали гомогенну структуру (рис. 3, 4).



Рис. 1. Пиляк цукрових буряків *in vitro*

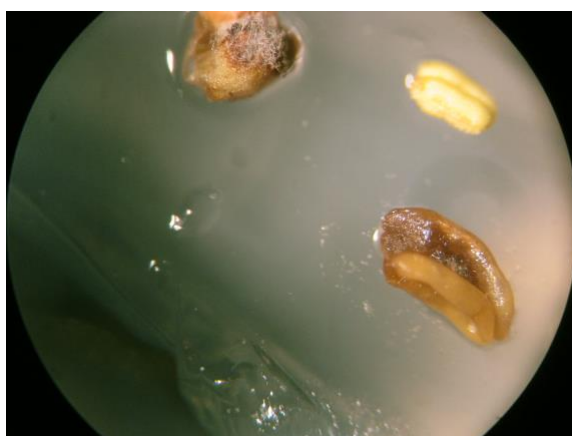


Рис.2. Проліферація калусу

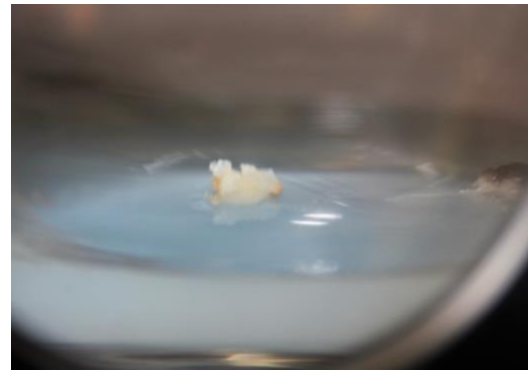


Рис. 3, 4 Різновиди первинного андрогенного калусу.

У залежності від етапу культивування отримані калуси було умовно поділено на первинні, вторинні і третинні. Первинні калуси, які утворилися при культивуванні пиляків за відсутності освітлення в термостаті після перенесення в умови культуральної кімнати з освітленням на протязі 18 годин, набували більш насиченого кольору та збільшувались у розмірах. Через 1-3 тижні для забезпечення подальшого росту і розвитку, калуси пасивували на другу серію живильних середовищ, яка сприяла збільшенню розмірів калусів та зміні кольору та структури. Пасивування калусів та третю серію середовищ сприяло їх подальшої диференціації за кольором та структурою та наявністю первинних морфогенних утворень - первинних корінців та бруньок.

На різних етапах культивування калусів під впливом різних діючих речовин у складі живильних середовищ були отримані вторинні (рис. 5, 6) і третинні калуси (рис. 7, 8). Дифереція калусів відбувалася не тільки за розміром, консистенцією – тверді, пухкі, напівтверді; кольором - білі, зелені, коричневі, різнокольорові; структурою тканин – гомогенні, гетерогенні; за структурою поверхні – бугорчата, зерниста, вузловата, гладка; в залежності від здатності до подальшого морфогенезу – морфогенні і неморфогенні. Морфогенні з зеленими меристематичними центрами, корінцями, паростками та розеткою листків (рис. 9, 10).

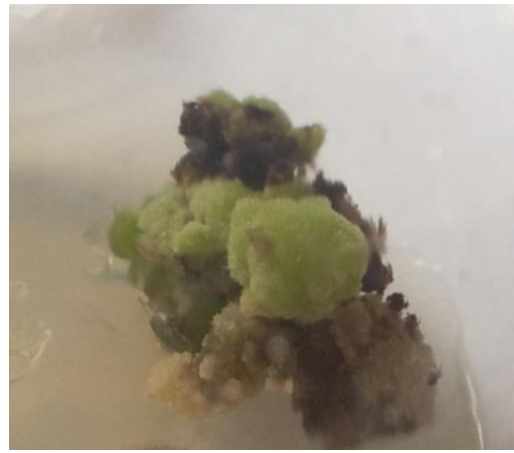
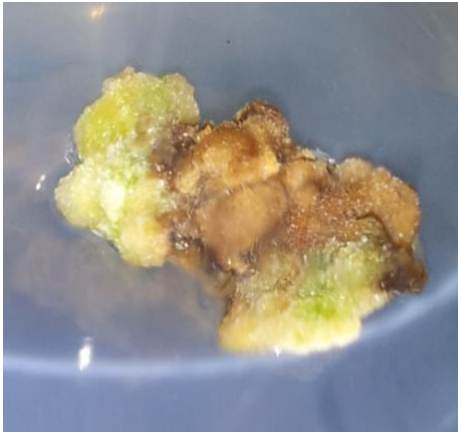


Рис. 5, 6. Різновиди вторинних андрогенних калусів

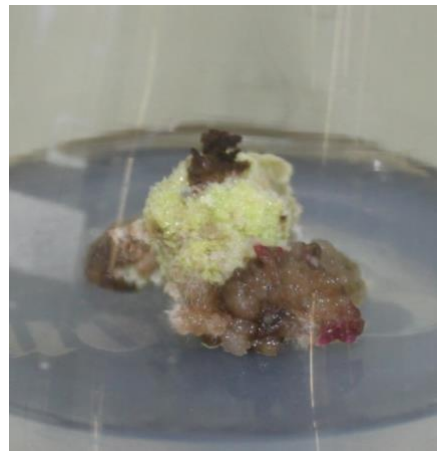
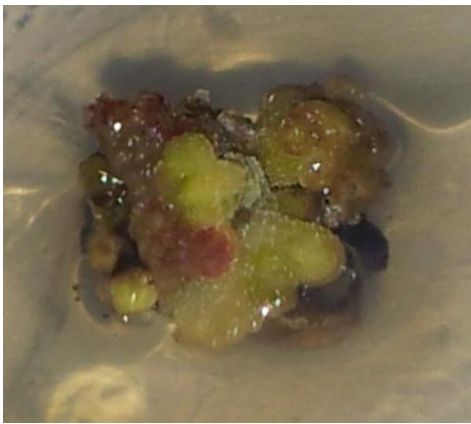


Рис. 7, 8. Різновиди третинних андрогенних калусів

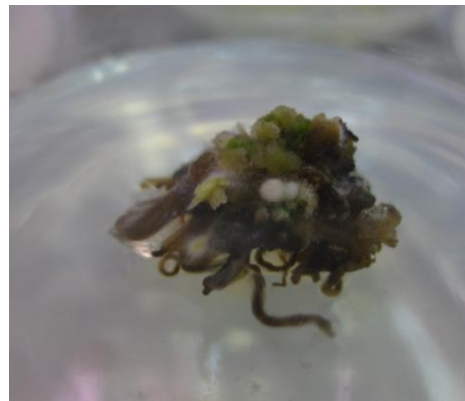
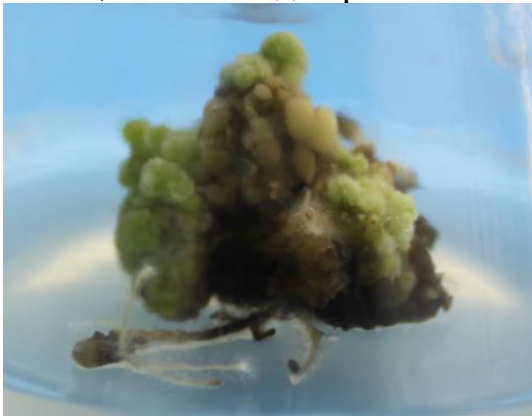


Рис. 9, 10. Різновиди третинного андрогенного калусу (морфогенні)

### **Прямий андрогенез у цукрових буряків**

Для отримання ембріодів з пиляків цукрових буряків нами було протестовано понад 60 різних прописів живильних середовищ, які відрізнялися за наявністю та складом вітамінів, амінокислот, вуглеводів та перш за все регуляторів росту. Прописи найбільш ефективних середовищ:

- живильне середовище – М–С  $\frac{1}{2}$  дози макроелементів + вітаміни: В<sub>1</sub> – 10,0 мг/л; В<sub>6</sub> – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; С – 1,0 мг/л + амінокислоти: глютамінова – 250,0–500,0 мг/л, аспарагінова – 1,0–10,0 мг/л, тірозин – 1,0–10,0 мг/л, аргінін – 2,0–10,0 мг/л, гідроксипролін – 2,0–4,0 мг/л + регулятори росту: полістимулін А–6 – 1,0–3,0 мг/л за д.р., 6–БАП – 0,3–0,8 мг/л;

- те саме + регулятори росту: 2,4–Д – 1,0–2,0 мг/л, 6–БАП – 0,3–0,8 мг/л, АБК – 0,3–1,0 мг/л;

- те саме + регулятори росту: 6–БАП – 0,1–0,6 мг/л

Низьку частоту виходу ембріодів та гаплоїдних рослин, а також спонтанність ембріогенезу відмічали в культурі пиляків *in vitro* різних сортів моркви (0,75–0,78%), капусти (1–4%). Згідно спостережень початок розвитку ембріодів візуально відмічали на 7–21 добу після їх інокуляції, які за жовтувато-зеленим або зеленим кольором забарвлення відрізняються від іншої частини пиляка. Через 30–35 діб спостерігали формування мікроклонів.

В наших експериментах з індукованого андрогенезу виявлена ідентичність фаз морфогенезу ембріодів *in vitro* та морфогенезу зиготичного зародка цукрових буряків *in vivo*.

Відомо, що у цукрових буряків поділ зиготи відбувається наприкінці першої доби після запліднення. В результаті цього поділу утворюється апікальна та базальна клітини. Після другого ділення утворюється чотирьохклітинний, а потім восьмиклітинний проембріо з лінійним розташуванням клітин. На третю добу у диплоїдів та на 5–7 добу у тетраплоїдів форма зародків стає булавоподібною. Форми кулі зародки диплоїдів досягають на п'яту добу, тетраплоїдів – на 8–10 добу. Серцеподібної форми зародки диплоїдів досягають на восьму добу, тетраплоїдів – на дванадцяту. На дванадцяту добу у диплоїдів та на шістнадцяту у тетраплоїдів витягуються сім'ядолі. На шістнадцяту добу у диплоїдів та на двадцяту добу у тетраплоїдів ріст зародка зупиняється, але фізіологічна зрілість у диплоїдів настає тільки на 26–30 добу, а у тетраплоїдів



– дещо пізніше після накопичення зародком білкових та жироподібних речовин, а периспермом – крохмалю.

Специфіка морфогенезу андрогенного ембрію *in vitro* полягає в більш тривалих строках формування та проходження основних етапів: восьмиклітинного проембрію з лінійним розташуванням клітин, булавоподібного ембрію у формі кулі, серцеподібного, формування та витягування сім'ядолей (рис. 11 - 12)..

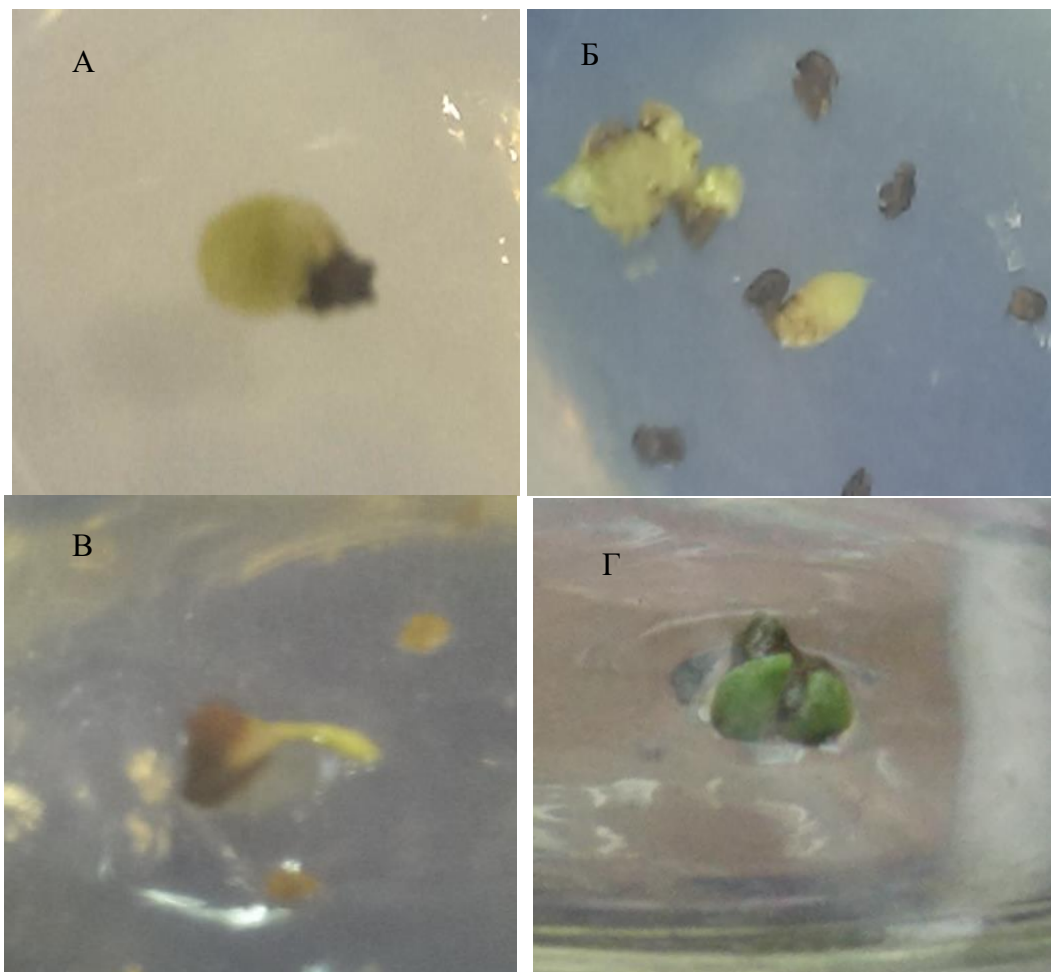


Рис. 11. Різновиди ембрію: а) шароподібний ембрію, б) формування булаво подібного ембрію, в) торпедоподібний ембрію, г) розвиток сім'ядолей



Рис. 12. Мікроклони, що отримані за методом прямого андрогенезу

Таким чином, ембріональні структури генеративних органів цукрових буряків, як і інших рослинних організмів, є найбільш консервативними, відносно постійними та менш мінливими у порівнянні з вегетативними органами і тому в більшій ступені є відображенням загального напрямку еволюційного процесу.

Використання гаплоїдів в селекції дозволяє вирішити такі задачі: швидко отримати константний, гомозиготний за усіма алельними генами, селекційний матеріал та інцухт лінії для гетерозисної селекції, найбільш ефективно проводити відбір мутантів, оскільки експресія рецесивних генів в них має фенотиповий прояв, а також завдяки елімінації рослин, що несуть летальні та напівлетальні гени та загалом скоротити селекційний процес на 3-4 роки.