

UDK 631.523'582.998.2

Asimetrična somatska hibridizacija između suncokreta (*Helianthus annuus* L.) i *Helianthus maximiliani* (Schrad.)

- Originalni naučni rad -

Ksenija TAŠKI i Dragana VASIĆ
Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Izvod: Ukrštanje gajenog suncokreta sa divljim srodnicima primenom klasičnih metoda ukrštanja se često završava neuspehom. Da bi se prevazišao ovaj problem protoplasti izolovani iz listova *Helianthus maximiliani*, otpornog prema *Sclerotinia sclerotiorum*, su fuzionisani sa protoplastima iz hipokotila *Helianthus annuus*. Protoplasti su fuzionisani primenom električnih pulseva. Produkti fuzije su stavljeni u kapljice agaroze i gajeni prema različitim regeneracionim protokolima. Najbolji rezultati su dobijeni prema protokolu *Trabace i sar.*, 1995. Protoplasti gajeni sa L₄ podlogom su se delili do mikrokalusa. Oni su oslobođeni iz kapljica agaroze i prebačeni na čvrstu regeneracionu podlogu.

Ključne reči: Elektrofuzija, *Helianthus annuus*, *Helianthus maximiliani*, protoplasti, somatska hibridizacija, suncokret.

Uvod

Suncokret (*Helianthus annuus* L.) je veoma značajna uljana kultura i zbog toga postoji veoma veliki interes za poboljšanje agronomski bitnih svojstava postojećih hibrida gajenog suncokreta. Suncokret je potencijalni domaćin preko 30 patogena čiji napad često dovodi do značajnog smanjenja prinosa. Jedan od najznačajnijih je bela trulež, koju izaziva *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, za koju nema efikasne hemijske zaštite, *Maširević i Gulya*, 1992. Jedini način borbe protiv ove bolesti je stvaranje otpornih genotipova. Izvori gena otpornosti mogu biti divlji srodnici suncokreta, *Georgieva-Todorova*, 1976, *Škorić i Rajčan*, 1992. Međutim, prenos željenih svojstava iz divljih srodnika u *H. annuus* veoma je težak zbog seksualne inkompatibilnosti i sterilnosti dobijenih hibrida, *Atlagić i sar.*, 1995.

Metoda koja može omogućiti transfer željenih osobina, iz divljih vrsta u gajene je somatska hibridizacija, *Krasnyanski i Menczel*, 1995, *Henn i sar.*, 1998. Primenom ove metode stvaraju se nove genske kombinacije uspešno zaobilazeći *J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 64, 225-226 (2003/1-2), 35-43

barijere seksualne inkompatibilnosti. Jedan od metoda somatske hibridizacije je elektrofuzija, koja omogućuje uspešno prenošenje genetičkog materijala fuzionisanjem protoplasta primenom električnih pulseva visoke voltaže, **Zimmermann** i **Scheurich**, 1981.

Materijal i metode

Biljni materijal. Seme inbred linija gajenog suncokreta Ha-74A, PH-BC₂-91A, PH-BC₂-92A i Ha-48A je površinski sterilisano 14% rastvorom komercijalnog izbeljivača u trajanju od 20 minuta. Seme je zatim tri puta isprano sterilnom destilovanom vodom i oljušteno. Oljušteno seme je ponovo sterilisano u 5% rastvoru komercijalnog izbeljivača (60 minuta), isprano sterilnom destilovanom vodom tri puta i stavljeno u termostat na 45°C u trajanju od 1 sat. Sterilisano seme je naklijavano na MS podlozi, **Murashige** i **Skoog**, 1962, sa dodatkom 2% saharoze i 0,8% agara. Hipokotili su gajeni na 25°C u mraku.

Helianthus maximiliani, populacija 1631, je dobijen iz kolekcije divljih vrsta suncokreta Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Umnožen je mikropropagacijom vrhova izdanaka, **Vasić i sar.**, 2001. Izdanci su sterilisani potapanjem u 14% rastvor komercijalnog izbeljivača, isprani sterilnom destilovanom vodom, uronjeni u 0,1% rastvor indol-3-buterne kiselina (IBA) 4 min i postavljeni na MS podlogu. Biljke su gajene pri fotoperiodu 16:8 (svetlo:mrak) na temperaturi od 24°C. Dobijene sterilne biljke su ciklično umnožavane.

Izolacija protoplasta. Protoplasti *Helianthus maximiliani* su dobijeni iz listova dve nedelje starih biljaka. Listovi su isečeni na trake i plazmolizirani u tečnoj M podlozi, **Vasić i sar.**, 2001. Nakon 90 minuta ona je zamenjena sa 8 ml sveže M podloge i 2 ml smeše enzima: 1% Celulaza R-10, 0,5% Maceroenzim R-10 (Onozuka Yakult Honsha Co. Ltd., Japan), 0,05% Pektolijaza (Seishin Pharmaceutical Co. Ltd., Japan) i 0,01% Driselaza (Sigma), **Vasić i sar.**, 2001. Digestija ćelijskog zida je izvođena 17 h u mraku na 25°C.

Etiolirani, 7 dana stari hipokotili su isečeni na uske trake koje su plazmolizirane u tečnoj M podlozi tokom 90 minuta. Zatim su prebačeni u 9 ml sveže M podloge i 1 ml rastvor enzima: 0,75% Caylase M2, 0,525% Caylase 345 0,225% Caylase P (Cayla, Toulouse, Francuska), **Aslane-Chanabe**, 1991, i inkubirani 17 sati u mraku na 25°C.

Oslobodeni protoplasti su sakupljeni filtriranjem kroz metalno sito sa porama promera 100 µm i centrifugiranjem 5 min na 70 g. Protoplasti su prečišćeni flotacijom u 10% (protoplasti gajenog suncokreta), odnosno 15% (protoplasti *H. maximiliani*) rastvoru Fikola u tečnoj M podlozi centrifugiranjem 20 minuta na 1000 g prema modifikovanom protokolu **Chanabe i sar.**, 1989

Protoplasti *H. maximiliani* su izloženi dejstvu UV zraka 15 minuta, **Vasić**, 1999.

Elektrofuzija. Protoplasti gajenog i divlje vrste suncokreta su resuspendovani u odnosu 1:1 u puferu za fuziju (TF pufer prema **Aslane-Chanabe**,

1991) i elektrofuzionisani primenom 3 električna impulsa dužine 30 μ s, intenziteta 1250 Vcm^{-1} indukovanih Eppendorf mikroporatorom. Fuzionisani protoplasti su ostavljeni preko noći u mraku na 25°C.

Kultura protoplasta. Fuzionisani protoplasti, gustine 10^5 po ml, su stavljeni u kulturu prema protokolu *Krasnyanski* i *Menczel*, 1993, *Wingender i sar.*, 1996, i *Trabace i sar.*, 1995.

Rezultati i diskusija

Donori protoplasta. Na regeneracioni kapacitet protoplasta suncokreta značajno utiču genotip, uslovi kulture tokom regeneracije, kao i sastav podloge, *Fisher i sar.*, 1992. Da bi se utvrdio genotip sa najboljim regeneracionim kapacitetom testirano je 27 genotipova gajenog suncokreta (neobjavljeni rezultati) prema protokolu *Paterson* i *Everett*, 1985, za indukciju organogeneze na eksplantatima hipokotila. Od testiranih genotipova najbolje rezultate je pokazivao genotip Ha-48A. Međutim, kod ove linije se javljala endogena bakterijska infekcija u prvoj nedelji kulture. Zbog toga je ovaj genotip izbačen iz daljih istraživanja. Sledeći genotipovi po uspešnosti regeneracije iz hipokotila su PH-BC₂-91A, PH-BC₂-92A i Ha-74A te su oni uključeni u dalje eksperimente. Kod genotipa PH-BC₂-92A postoji veliki problem sa dobijanjem hipokotila. Porast hipokotila je slab, a broj infekcija velik, te je i on izuzet iz daljih eksperimenata. Protoplasti linija PH-BC₂-91A i Ha-74A su formirali mikrokaluse. Kako je genotip Ha-74A pokazao bolji intenzitet kalusogeneze dalji eksperimenti su bili zasnovani na ovom genotipu. Isti princip izbora (na osnovu regeneracione sposobnosti hipokotila) genotipova gajenog suncokreta koristili su i *Krasnyanski i Menczel*, 1993, dok je procenat deoba protoplasta korišćen kao indikator regeneracione sposobnosti u radovima *Biedinger i Schnabl*, 1991 i *Vasić i sar.*, 2000.

H. maximiliani populacija 1631 je odabran kao donor genetičkog materijala, jer je utvrđeno da je otporan na belu trulež, *Škorić i Rajčan*, 1992. Dovoljne količine sterilnog biljnog materijala proizvedene su kulturom vrhova izdanaka. Na početku su biljke gajene na DV' podlozi, *Vasić i sar.*, 2001. Međutim, nakon određenog broja ciklusa mikropropagacije biljke su usporile rast, žutele i na kraju venule. Zbog toga je DV' zamenjena MS podlogom. Na ovoj podlozi biljke su nastavile intenzivan rast.

Izolacija protoplasta. Talog protoplasta, dobijen nakon odvajanja smeše enzima, je kontaminiran velikom količinom delova od popucalih ćelija. Takođe, dobijeni protoplasti su veoma različite veličine. Zbog toga su oni prečišćeni flotacijom u gradijentu Fikola prema preporuci *Chanabe i sar.*, 1989. Koncentracija fikola of 10% je pokazala zadovoljavajuće rezultate u prečišćavanju protoplasta dobijenih iz gajenog suncokreta. Međutim, protoplasti *H. maximiliani* prečišćeni ovim procentom fikola, *Vasić i sar.*, 2001, su bili veoma sitni. Zbog toga je koncentracija fikola povećana na 15%. Tako su dobijeni čisti protoplasti, ujednačene veličine.

Listovi *in vitro* gajenog *H. maximiliani* daju veliku broj protoplasta.

Prosečan prinos je bio oko 5×10^6 protoplasta po gramu tkiva (sveže mase). Ovo je u skladu sa rezultatima drugih autora. Tako su **Henn i sar.**, 1998, iz listova *H. giganteus* izolovali 3×10^6 , a iz *H. nuttallii* 2×10^6 protoplasta po gramu tkiva, dok je iz *H. maximiliani* izolovano 1.5×10^6 protoplasta po gramu tkiva, **Vasić**, 1999. Protoplasti izolovani iz listova *H. maximiliani* su sitni i sadrže veliki broj hloroplasta (Slika 1).



Slika 1. Protoplasti izolovani iz listova *Helianthus maximiliani*
Protoplasts isolated from *Helianthus maximiliani* leaves

Slika 2. Protoplasti izolovani iz hipokotila *Helianthus annuus*
Protoplasts isolated from *Helianthus annuus* hypocotyls

Prinos protoplasta izolovanih iz hipokotila gajenog suncokreta je $4-5 \times 10^5$ protoplasta po gramu tkiva (sveže mase). Isti rezultat pri izolaciji protoplasta iz hipokotila *H. annuus* su dobili **Schmitz i Schnabl**, 1989, dok su **Wingender i sar.**, 1996, i **Krasnyanski i Menczel**, 1993, dobili znatno veći prinos protoplasta 2 odnosno $2-3 \times 10^6$ protoplasta po gramu tkiva. Protoplasti izolovani iz hipokotila su veći od protoplasta izolovanih iz listova *H. maximiliani*, etiolirani su i sadrže veliki broj vakuola (Slika 2).

Simetričnom fuzijom protoplasta izolovanih iz divljih vrsta i gajenog suncokreta kombinuju se dva celokupna genoma, i pored poželjnih unose i nepoželjni geni. Kako se u većini slučajeva u gajeni suncokret želi uneti samo deo genoma divlje vrste neophodno je inaktivirati deo njenog genetičkog materijala, **Forsberg i sar.**, 1998. Jedan od načina inaktivacije protoplasta donora je ozračivanje UV zracima, **Forsberg i sar.**, 1998, **Vasić**, 1999. Na taj način se fragmentiše genom donora, te se mogu kreirati asimetrični somatski hibridi sa samo nekoliko svojstava roditelja donora.

Elektrofuzija. Elektrofuzija je često korišćena tehnika za fuziju protoplasta. Prema navodima nekih autora, **Rech i sar.**, 1987, **Barth i sar.**, 1993, električni tretman utiče na povećanje regeneracione sposobnosti protoplasta. Kako su protoplasti suncokreta veoma osetljivi na tretman PEG-om, **Krasnyanski i Menczel**,

1995, *Henn i sar.*, 1998, elektrofuzija je odabrana kao metoda za fuziju protoplasta. Korišćeni su impulsi različitog intenziteta. Takođe je variran njihov broj i vreme trajanja. Primena 3 električna impulsa, dužine 30 μ s, intenziteta 1250 Vcm^{-1} je davala najbolje rezultate. Ovako fuzionisani protoplasti su gajeni u kapljicama agaroze prema tri različita protokola.

Kultura protoplasta. Metod *Krasnyanski* i *Menczel*, 1993, nije davao rezultate. Fuzionisani protoplasti se nisu delili i nekrotirali su tokom prve nedelje kulture. Zbog toga je ovaj metod isključen iz daljih eksperimenata.

Prve deobe produkata fuzije stavljenih u kulturu agaroznih kapljica po metodi *Wingender i sar.*, 1996, bile su asimetrične. Dobijene su dve ćerke ćelije različite veličine (Slika 3). Druga deoba je bila deoba manje ćelije. Međutim ćelije se nisu delile i nakon izvesnog vremena su nekrotirale.

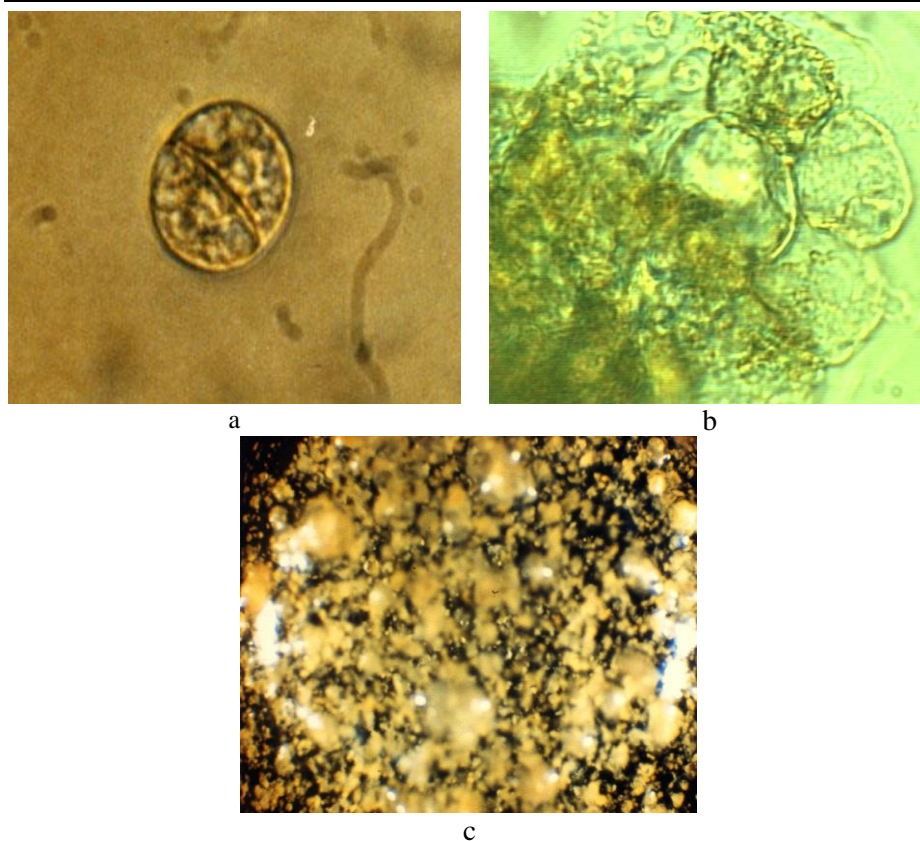


Slika 3. Asimetrična deoba produkata fuzije - *Asymmetric division of fusion products*

Jedan od uzroka prestanka deoba ćelija može biti njihova prevelika gustina, *Wingender i sar.*, 1996, te bi trebalo probati kulturu sa manjom gustinom protoplasta. Takođe bi trebalo varirati faktore koji takođe mogu uticati na deobu ćelije, kao što su vrsta i koncentracija hormona i šećera, uslova fuzije i dr.

Metoda prema *Trabace i sar.*, 1995, dala je najbolje rezultate te su ekperimenti bazirani na njoj. Tokom prve nedelje kulture uočene su prve simetrične deobe produkata fuzije (Slika 4a). Oni su se dalje delili dajući kolonije (Slika 4b), koje su tri do četiri nedelje od početka kulture dale mikrokaluse (Slika 4c). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili, *Guilley i Hahne*, 1989; *Trabace i sar.*, 1995, 1996.

Kalusi veličine 1-2 mm su dalje prebačeni na čvrstu, regeneracionu podlogu da bi se putem organogeneze ili somatske embriogeneze pokušalo s indukovanjem regeneracije biljke.



Slika 4. Organogeneza produkata fuzije: a) simetrična deoba; b) kolonija; c) mikrokalusi
 Organogenesis of fusion products: a) symmetric division; b) colony; c) microcalli

Zaključak

Utvrđeno je da je inbred linija gajenog suncokreta Ha-74A najpogodnija za eksperimente sa somatskom hibridizacijom. Od genotipova sa dobrom regeneracionom sposobnošću (Ha-48A, PH-BC₂-91A, PH-BC₂-92A i Ha-74A) ona je najbolji donor protoplasta i ima najveći procenat kalusogeneze. Metoda prema *Trabace i sar.*, 1995, je dala najbolje rezultate sa odabranim genotipom (dobijeni mikrokalusi). Na osnovu ovih rezultata genotip Ha-74 i metoda prema *Trabace i sar.*, 1995, su odabrani za dalje ekperimente kojima će se probati pronaći odgovarajuća regeneracija podloga kojom bi se putem organogeneze ili somatske embriogeneze pokušalo s indukovanjem regeneracije biljke.

Literatura

- Aslane-Chanabe, C.** (1991): Regeneration de plantes a partir de protoplastes chez le genre *Helianthus* et hybridation somatique entre le tournesol cultivate et les tournesols sauvages. Doktorska disertacija. INP, Toulouse, Francuska, str. 186.
- Atlagić, J., B. Dozet and D.Škorić** (1995): Meioses and pollen grain viability in *Helianthus molis*, *H. salicifolius*, *H. maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower. *Euphytica* 81: 259-263.
- Barth, S., D. Voeste, R. Wingender and H. Schnabl** (1993): Plantlet regeneration from electrostimulated protoplast of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Bot. Acta* 106: 220-222
- Biedinger, U. and H. Schnabl** (1991): Ethane production as an indicator of the regeneration potential of electrically fused sunflower protoplast (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Physiol.* 138: 417-420.
- Chanabe, C., M. Burrus and G. Alibert** (1989): Factors affecting the improvement of colony formation from sunflower protoplast. *Plant. Sci.* 64: 125-132.
- Fisher, C., P. Klethi and G. Hahne** (1992): Plants from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L.): shoot regeneration and seed production. *Plant Cell Rep.* 11: 623-636.
- Forsberg, J., U. Lagercrantz and K. Glimelius** (1998): Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassicca napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Theoret. and Applied Gen.* 96: 1178-1185.
- Georgieva-Todorova, J.** (1976): Interspecific Relationship in the Genus *Helianthus*, ed. Bulg. Acad. Sci., Sofia, Bulgaria.
- Guilley, E. and G. Hahne** (1989): Callus formation from isolated sunflower (*Helianthus annuus*) mesophyll protoplast. *Plant Cell Rep.* 8: 226-229.
- Henn H.-J., R. Wingender and H. Schnabl** (1998): Regeneration of fertile plants from *Helianthus nuttalli* T&G and *Helianthus giganteus* L. mesophyll protoplast. *Plant Cell Reports* 18: 288-291.
- Krasnyanski, S. and L. Menczel** (1993): Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls protoplast of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Rep.* 12: 260-263.
- Krasnyanski, S. and L. Menczel** (1995): Regeneration of fertile interspecific hybrids from protoplast fusions between *Helianthus annuus* L. and wild *Helianthus* species. *Plant Cell Reports* 18: 220-224.
- Maširević, S. and T.J. Gulya** (1992): *Sclerotinia* and *Phomopsis* - two devastating sunflower pathogens. *Field Crops Research* 30: 271-300.
- Murashige, T. and F. Skoog** (1962): A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Paterson, K.E. and N.P. Everett** (1985): Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants callus. *Plant Sci.* 42: 125-132.

- Rech, E.L., S.J. Ochat, P.K. Chad, J.B. Power and M.R. Davey** (1987): Electro-enhancement of division of plant protoplast-derived cells. *Protoplasma* 141:169-176.
- Schmitz, P. and H. Schnabl** (1989): Regeneration and evacuation of protoplast from mesophyll, hypocotyl and petioles from *Helianthus annuus* L. *J. Plant. Physiol.* 135: 223-227.
- Škorić, D. and I. Rajčan** (1992): Breeding for *Sclerotinia* resistance in sunflower. Book of Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy, pp. 1257-1262.
- Trabace, T., M.C. Fiore, C. D'Ambrosio, S. Vanadia and F. Sunseri** (1996): Sunflower cytoplasmic hybrids relevant by PCR assay using male sterility as selectable marker. *J. Genetic & Breed.* 50: 29-34.
- Trabace, T. M. Vischi, M.C. Fiore, F. Sunseri, S. Vanadia, S. Marchetti and A.M. Olivieri** (1995): Plant regeneration from hypocotyl protoplast in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. & Breed.* 49: 51-54.
- Vasić, D.** (1999) Asimetrična somatska hibridizacija između suncokreta (*Helianthus annuus* L.) i *Helianthus maximiliani* (Schrad.). Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd str. 107.
- Vasić, D., D. Škorić i G. Alibert** (2000): Testiranje regeneracione sposobnosti protoplasta izolovanih iz različitih genotipova gajenog suncokreta. *Selekcija i semenarstvo VII* (1-2): 117-120.
- Vasić, D., D. Škorić, G. Alibert and V. Miklič** (2001): Micropropagation of *Helianthus maximiliani* (Shrader) by shoot apex culture. *Helia* 24 (34): 63-68.
- Wingender, R., H.-J.Henn, S. Barth, D. Voeste, H. Machlab and H. Schnabl** (1996): A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15: 742- 745.
- Zimmermann, U. and P. Scheurich** (1981): High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta* 151: 26-32.

Primljeno: 19.04.2003.

Odobreno: 20.05.2003.

* *
*

Asymmetric Somatic Hybridisation between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* Schrad.

- Original scientific paper -

Ksenija TAŠKI and Dragana VASIĆ
Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

Summary

The transfer of interesting traits from wild *Helianthus* species into cultivated sunflower is limited by poor crossability or sterility of interspecific hybrids. To overcome this barrier, mesophyll protoplasts of *Sclerotinia sclerotiorum*-resistant clones of *Helianthus maximiliani* were electrically fused with hypocotyl protoplasts of *Helianthus annuus*. Fusion products were embedded in agarose and subjected to different regeneration protocols. The best result was obtained by the protocol of *Trabace et al.*, 1995. Protoplasts grown on the L₄ medium developed into microcalli. Subsequently they were released from the agarose and were transferred to the solid medium.

Received: 19/04/2003

Accepted: 20/05/2003

Adresa autora:

Ksenija TAŠKI
Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo
Maksima Gorkog 30
21000 Novi Sad
Srbija i Crna Gora
e-mail: ksenijat@EUnet.yu