

UDK: 631.524; 633.11

## TESTIRANJE REGENERACIONE SPOSOBNOSTI PROTOPLASTA IZOLOVANIH IZ RAZLIČITIH GENOTIPOVA GAJENOG SUNCOKRETA

VASIĆ DRAGANA, ŠKORIĆ D., ALIBERT G.<sup>1</sup>

*IZVOD: Protoplasti izolovani iz različitih genotipova gajenog suncokreta se razlikuju u svojoj sposobnosti da se dele i regenerišu u kulturi. Kako je regeneracija biljaka krajnji cilj kulture protoplasta i kako je sposobnost regeneracije u in vitro uslovima kod gajenog suncokreta ograničena na samo mali broj genotipova, poželjno je testirati genotipove u pogledu njihove regeneracione sposobnosti pre uključivanja u eksperiment. 16 genotipova gajenog suncokreta je testirano u pogledu njihove regeneracione sposobnosti. Protoplasti, izolovani iz hipokotila 5 dana starih biljaka, su stavljeni u kulturu u kapljicama agaroze. Određivan je procenat deoba nakon 7, 14 i 21 dan starosti kulture, kao i intenzitet kalusogeneze. Dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse. Značajna razlika u procentu deoba između različitih genotipova je uočena već sedmog dana kulture. Razlika u intenzitetu kalusogeneze se mogla uočiti četvrte nedelje kulture. Inbred linija CMS1-50A, se pokazala najboljom kako u pogledu procenta deoba, tako i u pogledu intenziteta kalusogeneze.*

**Ključne reči:** suncokret, protoplasti, regeneraciona sposobnost.

**UVOD:** Protoplasti izolovani iz različitih genotipova gajenog suncokreta (*Helianthus annuus* L.) se razlikuju u svojoj sposobnosti da se dele i regenerišu u kulturi. Regeneraciona sposobnost je ograničena na samo mali broj genotipova od kojih većina ima deo genoma poreklom iz divljih vrsta (Burrus i sar. 1991, Krasnyanski i Menczel 1993). Do danas je bilo samo nekoliko uspešnih pokušaja da se regenerišu biljke iz protoplasta gajenog suncokreta (Burrus i sar. 1991, Fischer i sar. 1992, Krasnyanski i Menczel 1993, Trabace i sar. 1995, Wingender i sar. 1996), s tim što je frekvencija regeneracija bila niska. Pored toga, korišćeni genotipovi su u većini slučajeva prethodno testirani u pogledu svoje regeneracione sposobnosti, osim u radu Wingender i sar. (1996) koji su uspeli da regenerišu biljke iz protoplasta genotipa sa niskim kapacitetom regeneracije.

Regeneracija biljaka je krajnji cilj kako kulture protoplasta tako i somatske hibridizacije. Kako je, kao što je ranije rečeno, sposobnost regeneracije u *in vitro* uslovima kod gajenog suncokreta ograničena na samo mali broj genotipova, poželjno je testirati genotipove u pogledu njihove regeneracione sposobnosti pre uvođenja u eksperiment.

U ovom radu određivan je regeneracioni kapacitet inbred i rekombinantnih linija gajenog suncokreta, u cilju izbora roditelja recipijenta za eksperimente sa somatskom hibridizacijom, a na osnovu procenta deoba i intenziteta kalusogeneze.

### Materijal i metod rada

U radu je korišćeno 16 inbred i rekombinantnih linija gajenog suncokreta (Tabela 1). Semena ispitivanih genotipova su površinski sterilisana i postavljana u staklene tegle na MS podlogu (Murashige i Skoog 1962) sa 5 g l<sup>-1</sup> saharoze, 8 g l<sup>-1</sup> Bakto-Agara, pH 5.8. Semena su naklijavana u mraku na 25°C.

Protoplasti su izolovani iz hipokotila pet dana starih klijanaca koji su sečeni uzdužno na dve polovine i stavljani u Petri posude prečnika 10 cm u kojima se nalazilo 10 ml rastvora za pranje (M podloga) (Krasnyanski i sar. 1992) sa 0,7 g l<sup>-1</sup> MES, pH 5,7. Nakon 90 min, M podloga je zamenjena sa 9 ml sveže M podloge i 1 ml smeše enzima (Tabela 2). Petri posude su ostavljene 13 h u mraku na 25°C. Protoplasti su prečišćeni suspendovanjem u 10% rastvoru Ficoll-a u M podlozi i centrifugirani 20 minuta na 1000 g, u skladu sa protokolom Chanabe i sar. (1989), a zatim dva puta oprani u 20 ml M podloge.

Protoplasti su stavljeni u kulturu u kapljice agaroze (Sea Plaque), u gustini od 5x10<sup>4</sup> protoplasta po ml, u skladu sa protokolom Trabace i sar. (1995). Kulture su držane u mraku na 25°C, a zamena L'4M podloge svežom je vršena svakih sedam dana do pojave mikrokalusa. Mikrokalusi su prebacivani na

<sup>1</sup> Izvorni naučni rad

<sup>1</sup> Dr DRAGANA VASIĆ, Prof. dr DRAGAN ŠKORIĆ, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad  
Prof. dr GILBERT ALIBERT, INP ENSAT, Tuluz, Francuska

Tab. 1. Genotipovi gajenog sunčketa korišćeni za ispitivanje regeneracione sposobnosti.  
Tab. 1. Genotypes of cultivated sunflower used of testing of regeneration capacity.

Naziv Name	Opis Description	Poreklo Origin
L-1	inbred linija	IFVC, Novi Sad
CMS <sub>1</sub> -I-32B	inbred linija	IFVC, Novi Sad
CMS <sub>1</sub> -8A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
CMS <sub>1</sub> -50A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
OCMS-3	inbred linija	IFVC, Novi Sad
Ha-26A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
CMS <sub>1</sub> -4A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
Ha-98H-A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
Ha-19B	inbred linija	IFVC, Novi Sad
PR-ST-28A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
PH-BC <sub>2</sub> -64A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
Ha-74A	inbred linija	IFVC, Novi Sad
LR-42	rekombinantna linija	INRA, Montpellier
C-77	rekombinantna linija	INRA, Montpellier
17-1	BC <sub>3</sub> -F <sub>4</sub> H am <sub>1</sub> x H am <sub>2</sub>	INRA, Montpellier
Ha-300B	inbred linija	Rustica, Mondonville

Tabela 2. Smeša enzima korišćena za izolaciju protoplasta gajenog sunčketa.

Table 2. Enzyme mixture used for isolation of protoplasts of cultivated sunflower.

Enzimi Enzymes	%
Caylase M2 <sup>1</sup>	0,750
Caylase M2 <sup>2</sup>	0,525
Caylase P <sup>1</sup>	0,225
Rastvoreno u S* podlozi Dissolved in S* medium	pH=5,7

<sup>1</sup>Cayla, Tuluz, Francuska

\*Lencee i Chupeau (1986)

podlogu za indukciju kalusa (KR podloga) (Krasnyanski i sar 1992) i držani na svetlu energije 34 μmol quanta m<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>, pri fotoperiodu 16:8 (svetlo:mrak) i temperaturi od 25°C. Subkulture su rađene svakih 10 dana.

Regeneracioni kapacitet je utvrđivan na osnovu procenta deobe protoplasta 7, 14 i 21 dan nakon stavljanja u kulturu i intenziteta regeneracije mikrokalusa. Procenat deoba je određivan brojanjem pod

inverznim mikroskopom. Brojano je 300 protoplasta po genotipu, odnosno 60 po Petri posudi. Ogled je rađen u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su statistički obrađeni primenom LSD testa.

### Rezultati

Linije Ha-19B i PR-ST-28A su isključene iz eksperimenta zbog loše klijavosti semena, a linije PH-BC<sub>2</sub>-64A, Ha-74A i Ha-300B zbog bakterijske infekcije koja se javljala sedam dana nakon stavljanja protoplasta u kulturu.

Sedmog dana kulture, linije CMS<sub>1</sub>-50A i CMS<sub>1</sub>-4A su imale značajno veći procenat deoba u odnosu na ostale ispitivane genotipove (Tabela 3). Najveći procenat deoba druge i treće nedelje kulture je imala linija Ha-26A, dok se CMS<sub>1</sub>-50A nalazila na četvrtom, odnosno drugom mestu. Najmanji procenat deoba u sva tri sučaja je imao genotip 17-1, zajedno sa linijom OCMS-3.

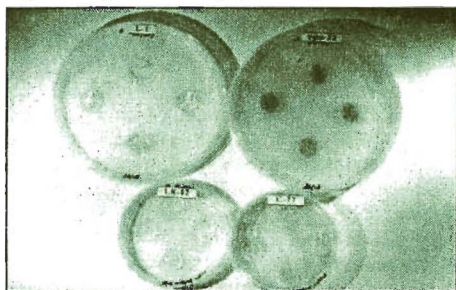
Razlika u intenzitetu kalusogeneze se kod ispitivanih genotipova mogla jasno uočiti već četvrte nedelje kulture (Slika 1). Kod genotipova LR-42 i

Tab. 3. Procenat deoba ispitivanih genotipova nakon 7, 14 i 21 dan kulture.

Tab. 3. Percentage of divisions of tested genotypes after 7, 14, and 21 days of culture.

Genotip Genotype	% deoba % of division		
	7 dana 7 days	14 dana 14 days	21 dan 21 days
L-1	26,33	62,67	70,00
cms-32	35,33	59,00	61,67
LR-42	42,33	64,00	75,00
C-77	35,00	55,33	75,00
17-1	25,67	50,33	51,33
CMS <sub>1</sub> -8A	37,37	56,53	78,83
CMS <sub>1</sub> -50A	47,43	60,07	81,57
OCMS-3	26,23	27,77	31,30
Ha-26A	41,40	74,70	92,90
CMS <sub>1</sub> -4A	46,93	57,77	68,10
Ha-98H-A	39,37	61,60	65,60
LSD <sub>0,05</sub>	5,351	9,117	8,114
LSD <sub>0,01</sub>	7,298	12,520	11,070

Shka 1. Različiti intenzitet kalusogeneze.  
Figure 1. Different intensity of callusogenesis.



C-77 formiranje mikrokalusa je uočeno tek u šestoj nedelji kulture, nakon prebacivanja na KR podlogu, dok su se kod ostalih genotipova mikrokalusi formirali u četvrtoj nedelji kulture. Protoplasti izolovani iz 17-1 su prestali da se dele nakon treće nedelje kulture, tako da je izostala regeneracija mikrokalusa.

Nakon prebacivanja na KR podlogu, mikrokalusi regenerisani iz protoplasta izolovanih iz inbred linija poreklom iz IFVC su nastavili da se razvijaju i dali kaluse. Mikrokalusi LR-42 i C-77 su nekrotirali nakon dve nedelje kulture.

Kalusogeneza je bila najintenzivnija kod linija CMS<sub>1</sub>-50A i Ha-26A, kako tokom kulture u kapljicama agaroze, tako i tokom kulture na KR podlozi.

### Diskusija

Fischer i sar. (1992) su utvrdili da na regeneracioni kapacitet protoplasta suncokreta značajan uticaj imaju genotip, uslovi kulture prilikom regeneracije kalusa, kao i sastav podloge. Do sličnih rezultata su došli Sarrafi i sar. (1996), koji su zaključili da regeneraciona sposobnost kod suncokreta zavisi od uslova kulture, genotipa i njihove interakcije.

Kod suncokreta, samo mali broj genotipova se odlikuje dobrom regeneracionom sposobnošću *in vitro*. Da bi prevazišli ovaj problem Krasnyanski i Menczel (1993) su pre izolacije protoplasta izvršili preskrining genotipova upotrebom protokola Paterson i Everett (1985) za indukciju organogeneze na eksplantatima hipokotila. I drugi autori (Burrus i sar. 1991, Fischer i sar. 1992, Krasnyanski i Menczel 1993, Trabace i sar. 1995, Wingender i sar. 1996) su za izolaciju protoplasta koristili genotipove poznatog kapaciteta regeneracije, mada nije navedeno na koji način je on utvrđen. Laparra i sar. (1997) smatraju da prisustvo amiloplasta u izolovanim protoplastima suncokreta može biti dobar indikator morfo-genetskog potencijala. Procenat deoba su kao indikator regeneracione sposobnosti koristili Biedinger i Schnabl (1991) kod eksperimenata sa elektrofuzijom protoplasta suncokreta.

Većina autora smatra da je najpouzdaniji pokazatelj dobrog regeneracionog kapaciteta nekog genotipa gajenog suncokreta prisustvo određene količine genetskog materijala nekog od divljih srodnika (Burrus i sar. 1991, Krasnyanski i Menczel 1993, Trabace i sar. 1995). Ovo je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim prilikom testiranja regeneracionog kapaciteta različitih genotipova, gde je genotip 17-1, koji u sebi nosi deo genoma divljeg *H. annuus*, imao značajno manji procenat deoba u odnosu na genotipove gajenog suncokreta. Inbred linija CMS<sub>1</sub>-50A, u čijem genomu nema gena od divljih srodnika, se pokazala najboljom kako u pogledu procenta deoba, tako i u pogledu intenziteta kalusogeneze. Fischer i sar. (1992) smatraju da prisustvo genetskog materijala divljih vrsta nije najbitniji faktor za regeneraciju, već da su to uslovi kulture koje treba prilagoditi svakom datom genotipu.

### Zaključak

Na osnovu procenta deoba tokom tri nedelje kulture kao i intenziteta kalusogeneze utvrđeno je da postoji razlika između ispitivanih genotipova gajenog suncokreta u pogledu kapaciteta regeneracije. Za razliku od rezultata velikog broja autora, genotip 17-1, koji u sebi nosi deo genoma divljeg suncokreta, je imao slab regeneracioni kapacitet. Inbred linija CMS<sub>1</sub>-50A je imala visok procenat deoba i zajedno sa linijom Ha-26 najveći intenzitet kalusogeneze, te je ona izabrana za dalji rad, odnosno za roditelja recipijenta prilikom somatske hibridizacije.

### LITERATURA

- BIEDINGER, U., SCHNABL, H.: Ethane production as an indicator of the regeneration potential of electrically fused sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* L.). J. Plant Physiol. 138: 417-420, 1991.
- BURRUS, M., CHANEBE, C., ALIBERT, G., BIDNEY, D.: Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Rep. 10: 161-166, 1991.
- CHANABE, C., BURRUS, M., ALIBERT, G.: Factors affecting the improvement of colony formation from sunflower protoplasts. Plant Sci. 64: 125-132, 1989.
- FISCHER, C., KLETHI, P., HAHNE, G.: Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L.): shoot regeneration and seed production. Plant Cell Rep. 11: 632-636, 1992.
- KRASNYANSKI, S., MENCZEL, L.: Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell Rep. 12: 260-263, 1993.
- KRASNYANSKI, S., POLGAR, Z., NEMETH, G., MENCZEL, L.: Plant regeneration from callus and protoplast cultures of *Helianthus giganteus* L. Plant Cell Rep. 11: 7-10, 1992.

- LAPARRA, H., BRONNER, R., HAHNE, G.: Histological analysis of somatic embryogenesis induced in leaf explants of *Helianthus smithii* Heiser. *Protoplasma* 196: 1-11, 1997.
- LENEE, P., CHUPEAU, Y.: Isolation and culture of sunflower protoplasts (*Helianthus annuus* L.): Factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts. *Plant Sci.* 43: 69-75, 1986.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, 1962.
- PATERSON, K. E., EVERETT, N. P.: Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci.* 42: 125-132, 1985.
- SARRAFI, A., ROUSTAN, J. P., FALLOT, J., ALIBERT, G.: Genetic analysis of organogenesis in the cotyledons of zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 92: 225-229, 1996.
- TRABACE, T., VISCHI, M., FIORE, M. C., SUNSERI, F., VANADIA, S., MARCHETTI, S., OLIVIERI, A. M.: Plant regeneration from hypocotyl protoplasts in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Genet. & Breed.* 49: 51-54, 1995.
- WINGENDER, R., HENN, H. J., BARTH, S., VOESTE, D., MACHLAB, H., SCHNABL, H.: A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L.) protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15: 742-745, 1996.

## TESTING OF REGENERATION ABILITY OF PROTOPLASTS ISOLATED FROM DIFFERENT GENOTYPES OF CULTIVATED SUNFLOWER

by

VASIĆ DRAGANA, ŠKORIĆ D., ALIBERT G.

### SUMMARY

Protoplasts isolated from different genotypes of cultivated sunflower differ in their ability to divide and regenerate in culture. Since plant regeneration is ultimate goal of protoplast culture and since regeneration ability in *in vitro* conditions of cultivated sunflower is limited to only a small number of genotypes, it is desirable to test genotypes for their regeneration capacity before their introduction into the experiment. 16 genotypes of cultivated sunflower were tested for their regeneration ability. Protoplasts, isolated from hypocotyls of 5-days old plants, were put in culture in agarose droplets. Percentage of divisions after 7, 14 and 21 days of culture, as well as intensity of callusogenesis were determined. Obtained results were analyzed by variance analysis. Significant difference in division percentage was observed as early as in 7<sup>th</sup> day of culture. Difference in intensity of callusogenesis could be observed in fourth week of culture. Inbred line CMS<sub>1</sub>-50A was found the best for division percentage as well as for intensity of callusogenesis.