

БІЛИНЬСЬКА О. В.^{1✉}, ЛЮТЕНКО В. С.¹, ДУЛЬНЄВ П. Г.², БЕЗПАРТОЧНА В. П.¹

¹ Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, Україна, 61060, м. Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

² Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Україна, 02160, м. Київ, Харківське шосе, 50, e-mail: dulnev@bpci.kiev.ua

✉ bilinska@ukr.net, (068) 566-03-20

ЧОЛОВІЧА СТЕРИЛЬНІСТЬ СОНЯШНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*), ІНДУКОВАНА НОВИМИ ГАМЕТОЦИДНИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Мета. Визначення впливу нових гаметоцидних препаратів на стерильність пилку і життєздатність гінецею соняшника. **Методи.** Суцвіття соняшника було оброблено дев'ятьма новими гаметоцидними препаратами у концентрації від 1,0 мл/л до 15,0 мг/л маточного розчину. Контролем слугував гіберелін (50 мг/л). Гаметоцидну активність оцінювали за зав'язуванням насіння за контрольованого самозапилення; життєздатність жіночого гаметофіту – за вільного запилення. **Результати.** Встановлено, що препарати ДГК-2 і ДГК-3 вже за мінімальної концентрації – 1 мл/л – мали високу гаметоцидну активність. Найбільш ефективним виявився препарат ДСК-10 у концентрації 5 мл/л, обробка яким дозволила досягти 100 %-го стерилізуючого ефекту. Із збільшенням концентрації гаметоцидних препаратів посилювався їх негативний вплив на жіночу генеративну сферу, але нові гаметоцидні препарати у деяких варіантах дослідження чинили менший негативний вплив, ніж гіберелін. **Висновки.** Препарати ДГК-2, ДГК-3 та ДСК-10 є перспективними для подальших досліджень із хімічної кастрації соняшника для проведення гібридизації на фертильній основі.

Ключові слова: соняшник (*Helianthus annuus L.*), стерильність пилку, гаметоциди, гіберелін, зав'язування насіння.

З огляду на більш високу урожайність гібридів, пов'язану з ефектом гетерозису, та їх комплексну стійкість до несприятливих чинників довкілля, впродовж багатьох років спостерігається стабільний попит із боку виробників продукції рослинництва саме на гібридне насіння як потужний засіб підвищення рентабельності та прибутковості галузі [1]. При цьому має місце істотне розширення видового складу сільськогосподарських рослин, на основі яких створено гетерозисні гібриди, зокрема за рахунок

залучення рослин з облігатним самозапиленням [2].

На сьогодні відомо два методичних підходи, застосування яких дозволяє отримати гібридне насіння: системи генетично детермінованої чоловічої стерильності (генна стерильність, цитоплазматична, комбінування цих типів стерильності) та індукована стерильність, яка охоплює у тому числі й хімічну кастрацію – обробку суцвіття на певній стадії розвитку речовинами, що спричиняють порушення нормального перебігу мейозу, спорогенезу або гаметогенезу і призводять до стерильності пилку чи аномального розвитку тканин пиляків [3]. Численними дослідженнями, проведеними у 50–70-х роках минулого століття, було виявлено сполуки з гаметоцидним ефектом серед природних фітогормонів та синтетичних регуляторів росту, сполук аліфатичного ряду, арсенідів, ретардантів [4, 5]. Гаметоцидний ефект було встановлено і для багатьох гербіцидів, включаючи сучасні комерційні препарати, причому цей ефект проявлявся у значно нижчих дозах, аніж ті, що використовують для знищення бур'янів [6].

Слід, зазначити, що у розробці методів індукованої чоловічої стерильності на основі застосування гаметоцидних препаратів досягнуто значних успіхів. Так, встановлено видові та генотипні особливості реакції культур на обробку певними гаметоцидами, доведено вплив стадії розвитку рослини та погодних умов у момент обробки [4, 7, 8]. На світовому ринку є гібриди пшениці, тритикале та інших культур, отримані за допомогою хімічної кастрації [4, 7].

У науковій літературі детально описано не лише переваги, а й обмеження і недоліки застосування хімічної кастрації для виробництва гібридного насіння. На основі узагальнення експериментальних даних сформульовано вимоги до гаметоцидних препаратів [4, 9], які слід враховувати у дослідженнях із добору оптима-

льного препарату для індукування стерильності пилку. Зокрема, препарати, які використовують для стерилізації, повинні забезпечувати 100 %-ву стерильність чоловічої репродуктивної сфери з чітким морфологічним проявом на пиляках і мати мінімальний негативний вплив на жіночу репродуктивну сферу; їх ефективність мусить бути високою в різних кліматичних зонах, на різних стадіях розвитку рослин та не залежати від генотипу. Також гаметоциди не повинні чинити негативний вплив на навколишнє середовище, а їх застосування мусить бути економічно вигідним [5, 9].

У соняшника – основної олійної культури України – для виробництва гібридного насіння розроблено і успішно використовуються у виробництві генетичні системи ЦЧС [10]. Але за гібридизації на фертильній основі з метою отримання нового вихідного матеріалу у селекції соняшника або генетичних дослідженнях виникає необхідність у механічному видаленні тичинок, що є досить трудомісткою і малопродуктивною процедурою, яка, до того ж, мусить бути проведена строго у ранішні часи (до шостої години ранку).

Найбільшого поширення для отримання рослин соняшника з хімічно індукованою чоловічою стерильністю набув метод, який ґрунтується на обробці суцвіть водним розчином гібереліну у концентрації 0,005 % (50 мг/л) на стадії розетки за шести-восьми пара листків, тобто під час закладання генеративних органів [11]. При цьому стерильність андроцею досягає 100 %,

хоча спостерігається значне зниження таких ключових показників, як насіннева продуктивність, лабораторна схожість насіння, енергія проростання, вміст олії [12]. Тому створення нових препаратів із гаметоцидною активністю, позбавлених вище зазначених недоліків, та їх випробування на придатність для застосування в селекції та генетичних дослідженнях є актуальним завданням.

З огляду на це метою досліджень було оцінювання впливу нових гаметоцидних препаратів на стерильність пилку і життєздатність гінцею соняшника та удосконалення методики хімічної кастрації.

Матеріали і методи

Як матеріал для досліджень використано лінії, дібрані після обробки мутагенами ліній соняшника X 808 Б, X 1002 Б та Од. 973 Б, надані к. с.-г. наук В. О. Васько.

Польові досліди було закладено у відповідності до розробленої схеми експерименту. Сівбу проведено на дослідному полі лабораторії селекції і генетики соняшника ІР ім. В. Я. Юр'єва ручною сівалкою у другій декаді травня (відстань між рядками – 70 см, між рослинами – 25 см і 50 см). Для обробки було застосовано дев'ять гаметоцидних препаратів, синтезованих в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України. Діапазон концентрації було визначено відповідно до рекомендацій виробника (табл. 1). Контролем слугував гіберелін у концентрації 0,005 %.

Таблиця 1. Препарати для хімічної кастрації соняшника та їх концентрації

№ з.п.	Назва препарату	Кількість випробуваних концентрацій	Концентрація (мг/л маточного розчину)		
			1	2	3
1	ДГК-2	3	1,0	2,5	5,0
2	ДГК-3	3	1,0	2,5	5,0
3	ДСК 1А	3	1,0	2,5	5,0
4	ДСК-10	3	1,0	2,5	5,0
5	Д 75 КУ*	4	1,0	5,0	10,0
6	ДГК-4	3	1,0	2,5	5,0
7	ДСКМЕА	3	1,0	2,5	5,0
8	ДЕИДНЗП8БЕГ-1	3	1,0	2,5	5,0
9	Д10ЗСКМЕ-2	3	1,0	2,5	5,0
10	ГК (контроль)	1	мг/л		

Примітка. *Досліджено також концентрацію 15,0 мг/л.

Нанесення препаратів гаметоцидів було проведено за допомогою пульверизатора, коли рослини соняшника знаходилися у фазі шести-восьми справжніх листків. Обробка дворазова з інтервалом 24 години. Розмір суцвіть становив 10–15 мм, що відповідало так званій фазі «зірочки» (рис. 1).

Через три тижні після обробки корзинки було закрито пергаментними або тканинними ізоляторами. Для оцінки можливого негативного впливу гаметоцидів на гінецей частину оброблених корзинок було залишено для вільного запилення. Вплив гаметоцидів на андроцей оцінювали за морфологією суцвіть, пиляків і пилку після обробки препаратами, а також за відсотком насіння, яке зав'язалося за контрольованого самозапилення у порівнянні з необробленими суцвіттями. Для оцінки впливу на жіночу генеративну сферу визначали зав'язування насіння за вільного перехресного запилення у порівнянні з необробленими суцвіттями.

Фенологічні спостереження, аналіз морфологічних ознак та ознак продуктивності було проведено відповідно до рекомендацій, викладених у виданні «Методические указания по изучению мировой коллекции масличных куль-

тур. Подсолнечник» [13]. Статистичну обробку цифрового матеріалу здійснювали за допомогою дисперсійного аналізу за використання пакету програм Microsoft Office (Excel 2003).

Результати та обговорення

Спостереження, проведені впродовж трьох тижнів перед ізолюванням оброблених кошиків, засвідчили, що за обробки суцвіть гібереліном, препаратами ДГК-2, ДГК-3 та ДСК-10 між контрольними (рис. 2) і обробленими рослинами (рис. 3) були чіткі відмінності за морфологією квіток, які відповідали результатам раніше проведених досліджень [13].

Окрім цього, обробка впливала на строки цвітіння, зокрема прискорювала настання цієї фази в середньому на п'ять діб. Також спостерігалися деформація квітколожа і зменшення ширини пелюсток язичкових квіток. Виявлено асинхронність цвітіння, яка полягала в тому, що окремі квіточки з ярусів, розташованих ближче до центру суцвіття, зацвітали одночасно з квіточками першого і другого ярусів. На діаметр кошика та висоту рослин впливу досліджених гаметоцидних препаратів не помічено.



Рис. 1. Суцвіття лінії соняшника, відібраної з Х808 Б, в оптимальній для обробки гаметоцидами фазі «зірочки» (розмір – 1,5 см).

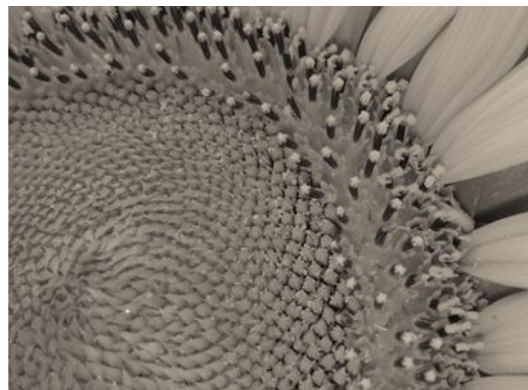
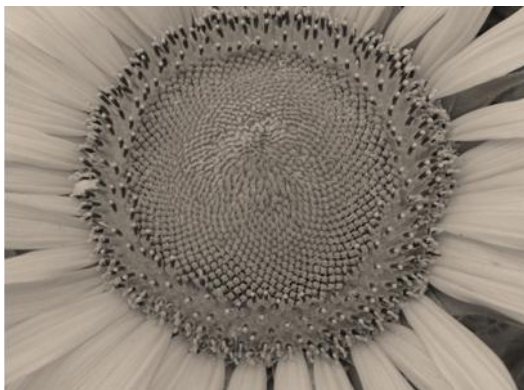


Рис. 2. Суцвіття соняшника (лінія, дібрана з Х 808 Б) з нормальними фертильними квітками (контроль).



Рис. 3. Суцвіття соняшника (лінія, дібрана з Х 808 Б) після обробки гаметоцидним препаратом.

Встановлено (табл. 2), що препарати ДГК-2 і ДГК-3 вже за мінімальної концентрації – 1 мл/л – мали високу гаметоцидну активність. Менш активним за цієї концентрації виявився препарат ДСК 10.

Але саме останній препарат мав найбільшу ефективність за концентрації 5 мл/л: у цьому варіанті досліду було досягнуто 100 %-го стерилізуючого ефекту у двох із трьох залучених до експерименту ліній. У решти препаратів гаметоцидна активність була відсутньою або недо-

статньо високою, щоб вважати цей препарат придатним для хімічної кастрації.

Було встановлено відмінності за реакцією на обробку гаметоцидними препаратами між залученими до експерименту лініями. Зокрема, лінія Од. 973 Б виявилася найменш чутливою порівняно з іншими генотипами.

Результати досліджень засвідчили (табл. 2), що із збільшенням концентрації посилювався негативний вплив препаратів на жіночу генеративну сферу.

Таблиця 2. Зав'язування насіння соняшника під ізоляторами залежно від генотипу, хімічної природи гаметоцидного препарату та його концентрації

Варіант обробки (В)			Генотип (А)		
№ з.п.	Назва препарату	Концентрація (мл/л)	Х808Б	Х1002Б	Од.973Б
			Кількість насінин на кошик, шт.		
1	ДГК-2*	1	3,6	24,8	27,9
2		2,5	6,3	2,4	74,6
3		5	0,5	0,4	12,1
4	ДГК-3*	1	2,5	13,9	18,8
5		2,5	0,8	0,8	14,0
6		5	0,1	1,9	13,5
7	ДСК 1А	1	9,2	109,5	147,6
8		2,5	22,0	128,5	181,0
9		5	13,3	97,7	119,0
10	ДСК 10*	1	17,0	11,3	75,2
11		2,5	2,0	0,3	9,4
12		5	0,0	0,0	4,3
13	Д 75 КУ	1	12,1	75,2	160,3
14		5	10,2	72,1	136,1
15		10	10,7	120,7	171,2
16		15	18,8	111,1	144,0
17	ГКЗ	50 мг/л	0,2	0,0	2,3
18	Контроль: без обробки		90,1	116,8	167,8
			НІР ₀₅ =10,25 (фактор А) НІР ₀₅ =29,88 (фактор В)		

Примітка. *Препарати, які виявили високу гаметоцидну активність.

Зокрема, зав'язування насіння за вільного запилення зменшувалося з майже 90 % (контроль без обробки) до 17,0–45,0 % (в окремих суцвіттях – до 63,7 %, за використання нових препаратів ДГК-2, ДГК-3 та ДСК-10 у варіантах із найбільшим стерилізуючим ефектом. Для гібереліну цей показник становив у середньому 19,3 % за варіювання від 14,5 % до 36,7 %.

Як уже було зазначено вище, придатними для обробки гаметоцидами вважаються суцвіття соняшника, розмір яких не перевищує 15 мм. Але через асинхронність розвитку навіть у межах одного генотипу оптимальної фази у певний проміжок часу досягає невелика частка рослин, що створює певні технічні незручності для обробки гаметоцидними препаратами.

Зважаючи на те, що однією з вимог до гаметоцидних препаратів є ефективність на різних стадіях розвитку рослин [4, 9], нами було оброблено суцвіття двох однокошикових ліній розміром від 5 до 7 мм і від 16 до 30 мм.

Результати досліджень показали (табл. 3), що за обробки суцвіть меншого за оптимальний розміру препаратами ДГК-2, ДГК-3 та ДСК-10 було отримано практично 100 %-ву стерильність. Така ж тенденція притаманна і для препа-

рату ДСК-1А і в меншій мірі для препарату Д 75 КУ, які виявили низьку гаметоцидну активність. Дуже маленькі суцвіття (≤ 5 мм) були стерильними після обробки усіма препаратами навіть у лінії Од. 973 Б, яка характеризувалася найнижчою чутливістю до дії досліджених гаметоцидів. Що стосується суцвіть більшого розміру, то недостатня вибірка не дозволяє зробити однозначні висновки щодо їх придатності для обробки гаметоцидними препаратами. Обробка багатокошикових ліній соняшника гібереліном засвідчила відсутність системної дії цього фітогормону з гаметоцидним ефектом, оскільки стерильними були лише кошики, які безпосередньо було піддано обробці.

Виходячи із отриманих результатів, слід зазначити, що питання щодо впливу розміру суцвіть на стерилізуючий ефект гаметоцидів потребує подальших досліджень із цитологічним аналізом. Можна припустити, що добір препарату, визначення оптимальної концентрації та розміру суцвіття дасть можливість проводити одноразову обробку для отримання високого стерилізуючого ефекту, що істотно знизить трудомісткість хімічної кастрації.

Таблиця 3. Зав'язування насіння соняшника залежно від генотипу, хімічної природи гаметоцидного препарату та його концентрації за вільного запилення

Варіант обробки (В)			Назва лінії (А)	
№ з.п.	Назва препарату	Концентрація (мл/л)	Х 808 Б	Од. 973 Б
			Зав'язування насіння, % від загальної кількості квіток	
1	ДГК-2	1	65,0	62,7
2		2,5	50,8	64,4
3		5	31,3	48,5
4	ДГК-3	1	51,7	53,8
5		2,5	25,0	45,0
6		5	20,8	36,7
7	ДСК-10	1	52,8	70,0
8		2,5	34,4	53,3
9		5	17,0	45,0
10	ГК ₃	50 мг/л	36,7	14,5
11	Контроль: без обробки		91,7	89,5
НІР ₀₅ =4,43 (фактор А)			НІР ₀₅ =18,28 (фактор В)	

Примітка. *Напівжирним шрифтом позначено варіанти обробки з найнижчими показниками зав'язування насіння під ізоляторами (табл. 2).

Висновки

Із дев'яти досліджених нових гаметоцидних препаратів три виявили стерилізуючий ефект за обробки суцвіть соняшника розміром 16 мм. Препарати ДГК-2 і ДГК-3 вже за мінімальної концентрації (1 мл/л) мали високу гаметоцидну активність. Найбільш ефективним виявився препарат ДСК-10 у концентрації 5 мл/л, обробка яким дозволила досягти 100 %-ої стерильності пилку у двох із трьох залучених до

експерименту генотипів. Суцвіття, розмір яких був меншим за оптимальний, виявили більшу чутливість до дії гаметоцидних препаратів. Нові гаметоцидні препарати, які в окремих варіантах досліджу чинили менший негативний вплив на жіночу генеративну сферу, ніж гіберелін, є перспективними для подальших досліджень з удосконалення методики хімічної кастрації соняшника.

References

1. Perez-Prat E., van Lookeren Compagne M.M Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants. *Trends Plant Sci.* 2002. Vol. 7, No. 5. P. 199–203. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02252-5.
2. Whitford R.R., Whitford D.J., Fleury C., Reif M.T., Garcia T., Okada S., Korzun V., Langridge P. Hybrid breeding in wheat: technologies to improve hybrid wheat seed production. *J. Exp. Bot.* 2013. Vol. 64. P. 5411–5428. doi: 10.1093/jxb/ert333.
3. Schuster W. Experiments on male-sterility of sunflowers caused by genetical, physiological and applied chemical factors. *Theor. App. Genet.* 1969. Vol. 39. P. 261–273.
4. Sharma Y., Sharma S.N. Chemical hybridizing agents (CHA) – a tool for hybrid seed production – a review. *Agric. Rev.* 2005. Vol. 26. P. 114–123.
5. Fedin M.A., Kuznecova T.A. Gametocidy i ikh primeneniye v selekcii. Obzornaia informacia. *Seriia Rastenievodstvo i biologii sel'skokhoziaistvennykh rastenii*. M.: VNIITEISKh, 1997. 53 s. [in Russian] / Федин М.А., Кузнецова Т.А. Гаметоциды и их применение в селекции. Обзорная информация. *Серия Растениеводство и биология сельскохозяйственных растений*. М.: ВНИИТЭИСХ, 1997. 53 с.
6. Yu C., Hu S., He P., Sun G., Yu C., Zhang C., Yu Y. Inducing male sterility in *Brassica napus* L. by a sulphonylurea herbicide itribenuronmethyl. *Plant Breed.* 2006. Vol. 125, No. 1. P. 61–64. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01180.x.
7. Mel'nik V.S., Riabchun V.K. Vpliv gametocidiv na formuvannia cholovichoisteril'nosti ta rozvitok roslin tritikale iarogo. *Selekcii i nasinnictvo*. 2012. Vip. 101. S. 90–101. [in Ukrainian] / Мельник В.С., Рябчун В.К. Вплив гаметоцидів на формування чоловічої стерильності та розвиток рослин тритикале ярого. *Селекція і насінництво*. 2012. Вип. 101. С. 90–101.
8. Amelework A., Laing M., Laing H., Shimelis H. Evaluation of effective gametocides for selective induction of male sterility in sorghum. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2016. Vol. 52, No. 4. P. 163–170. doi: 10.17221/159/2015-CJGPB.
9. Bochkarov N.I., Cukhlo L.G. Muzhskaiia steril'nost'. *Biologiya, selekcii i vozdeleyvanie podsolnechnika*. M.: Agropromizdat, 1992. S. 49–52. [in Russian] / Бочкарев Н.И., Цухло Л.Г. Мужская стерильность. *Биология, селекция и возделывание подсолнечника*. М.: Агропромиздат, 1992. С. 49–52.
10. Kirichenko V.V. Selekcii i semenovodstvo podsolnechnika [*Heliantus annuus*]. Kh.: Magda, 2005. 387 s. [in Ukrainian] / Кириченко В.В. Селекция и семеноводство подсолнечника [*Heliantus annuus*]. X.: Магда, 2005. 387 с.
11. Anashchenko A.V. Muzhskaiia steril'nost' modifikatsionnogo kharaktera u podsolnechnika *Sel'skokhoziaistvennaia biologiya*. 1968. T. 3, No. 4. S. 544–549. [in Russian] / Анащенко А.В. Мужская стерильность модификационного характера у подсолнечника. *Сельскохозяйственная биология*. 1968. Т. 3, № 4. С. 544–549.
12. Anashchenko A.V. Osobennosti vyrashchivaniia podsolnechnika pri khimicheskoi kastratsii. *Selekcii i semenovodstvo*. M., 1971. No. 2. С. 36–38. [in Russian] / Анащенко А.В. Особенности выращивания подсолнечника при химической кастрации. *Селекция и семеноводство*. М., 1971. № 2. С. 36–38.
13. Anashchenko A.V. Podsolnechnik: metodicheskie ukazaniia po izucheniiu mirovoi kollekcii maslichnykh kul'tur. L.: VIR, 1989. 40 s. [in Russian] / Анащенко А.В. Подсолнечник: методические указания по изучению мировой коллекции масличных культур. Л.: ВИР, 1989. 40 с.

BILYNSKA O. V.¹, LYUTENKO V. S.¹, DULNIEV P. G.², BEZPARTOCHNA V. P.¹

¹ Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuriev of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovskiyi ave., 142, e-mail: bilinska@ukr.net

² Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 02160, Kiev, Kharkivske h., 50, e-mail: dulnev@bpci.kiev.ua

MALE STERILITY IN SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) INDUCED WITH NEW GAMETOCIDAL AGENTS

Aim. Evaluation of the new gametocidal agents effect on pollen sterility and viability of female gametophyte in sunflower was the main goal of the investigation. **Methods.** Sunflower florets were treated with nine newly synthesized in the Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine chemicals in concentrations ranged from 1.0 ml/l to 15.0 ml/l of stock solutions. Gibberellic acid (50 mg/l) was used as a control. The gametocidal effect on the pollen sterility was determined using seed-set after gametocide treatment and controlled self-pollination compared to

untreated florets. Influence of gameticides on the female gametophyte viability was evaluated as seed-set after free cross-pollination. **Results.** It was revealed that DGK-2 and DGK-3 have a high gametocidal activity even at the lowest dose – 1 ml/l. DSK-10 appeared to be the most effective one at a dose of 5 ml/l. This treatment allowed us to achieve near-complete male sterility. Negative effect of gameticides on the female gametophyte was enhanced with increase in their concentrations. However, new gameticides had less negative effect compared to gibberellin in certain experimental variants. **Conclusions.** DGK-2, DGK-3 and DSK-10 are promising for further investigations on the chemical demasculation in sunflower for further hybridization on the fertile basis without mechanical anther removal.

Keywords: sunflower, (*Helianthus annuus* L.), induced pollen sterility, gamitocidal agents, gibberellin, seed-set.