

DOI 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-103-106

УДК 577.391:575.21/22.043:581.33:591.463.1

Грубська Л. В., Клепко А. В., Андрейченко С. В., Гудков І. М.

КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ УТВОРЕННЯ ТА РОСТУ ПИЛКОВИХ ТРУБОК NICOTIANA ALATA IN VITRO ПІСЛЯ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ В РІЗНИХ ДОЗАХ

Національний університет біоресурсів та природокористування України (м. Київ)

alla.klepko@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри радіобіології та радіоекології Національного університету біоресурсів та природокористування України «Особливості дії іонізуючого випромінювання на процес гаметогенезу у вищих еукаріот», № державної реєстрації 0118U000397.

Вступ. Пророщування пилку на поживному середовищі є одним із сучасних методів спостереження за проростанням пилку та ростом пилкових трубок *in vitro*, який дає змогу не тільки робити висновки щодо життєздатності чоловічого гаметофіту, але і аналізувати його запліднюючі властивості. Так, при встановленні клітинних механізмів утворення гіногенетичних гаплоїдів за допомогою пророщування пилку *in vitro* вдалось показати, що гамма-радіація блокує мітоз генеративної клітини в пилковій трубці шляхом утворення реститутивного ядра. Через те, із-за відсутності активних спермій, запліднення яйцеклітини в зародкову мішку не відбувалось [1,2].

В радіобіологічних дослідженнях метод пророщування пилку *in vitro* виявився вкрай ефективним при встановленні сублетальних та летальних доз, а також спектру радіаційних пошкоджень чоловічого гаметофіту. Так, цим методом вдалось показати, що двоклітинний пилкоз більшої покритонасінних рослин характеризується підвищеною радіорезистентністю, оскільки його LD_{50} , як правило, знаходиться в інтервалі 300 – 1500 Гр [3,4].

Останнім часом застосування різних ксенобіотиків, зокрема іонізуючої радіації, для індукції апоміксіса, мутагенезу та трансгенезу у рослин набуває все більшого розмаху. Так, в серії публікацій [5-11] були проаналізовані ростові властивості гамма-опроміненого пилку гарбуза, полуниці, лимону, грейпфруту, апельсина, дині та кавуна, шляхом його культивування на поживному середовищі *in vitro*, що дало змогу встановити відповідні дози для індукції гаплоїдного та диплоїдного партеногенезу, а згодом використати такий гамма-опромінений пилкоз в селекційно-генетичній роботі.

Мета роботи полягала у вивченні кінетичних особливостей проростання пилку та росту пилкових трубок *Nicotiana glauca in vitro* після опромінення сухого пилку різними дозами гамма-радіації.

Об'єкт і методи дослідження. З метою збору пилку тютюну духмяного, спочатку збирали нерозкриті бутони, вилучали з них пиляки перед початком антезису та переносили їх в чашки Петрі, де тримали протягом 30 год при температурі 20°C та вологості повітря 60%. Після розкриття пиляків з них витрушували

пилкоз, котрий згодом зберігали в бюксах при -18°C.

Пилкоз пророщували в розчині 10% цукрози та 0,01% борної кислоти на водопровідній воді, яку попередньо профільтрували під тиском через міліпорний фільтр фірми «Millipore» з діаметром пор в 0,22 мкм. Для пророщування 0,2 мг пилку спочатку переносили на покривне скельце, а потім його за допомогою голки рівномірно розподіляли по поверхні краплі, що містила 0,04 мл поживного середовища. Приготовлені таким чином препарати розміщали в чашках Петрі разом зі шматками вологого фільтрувального паперу для запобігання висиханню пилкової суспензії. Пророщування контрольного та гамма-опроміненого пилку проводили у трьох повторностях при температурі +28°C та освітленості в 800 лк. Пилкоз вважали пророслим, якщо довжина пилкової трубки була не менше діаметра пилкового зерна. Вважається, що за такої ситуації в пилку вже починається синтез пектинових речовин, котрі так необхідні для побудови клітинної стінки [4]. Проростання та довжину пилкових трубок визначали за допомогою окуляр-мікрометра під мікроскопом «МБИ-3» (Росія) на збільшенні $\times 150$. Проростання пилку та середню довжину пилкових трубок визначали у виборці з двохсот довільно відібраних пилкових зерен. При цьому довірчі інтервали встановлювали в межах $\pm 1,96$ стандартної похибки (SE), керуючись двобічною кривою нормального розподілу даних при $p = 0,95$. Проростання пилку та довжину пилкових трубок на графіках позначали у відсотках від кінцевого значення відповідних контрольних величин. Опромінення сухого пилку гамма-променями проводили при потужності дози 0,2 Гр/с.

Статистичні відмінності для різних доз опромінення визначали за допомогою дисперсійного аналізу «ANOVA» та непарного критерія Стьюдента з поправкою Бонфероні при $p < 0,05$ [12].

Результати досліджень та їх обговорення. Використання капельної культури пилку дало змогу простежити за перебігом процесу проростання та росту пилкових трубок тютюну духмяного на штучному поживному середовищі та встановити динаміку проростання як інтактних, так і гамма-опромінених пилкових зерен. Ці результати представлені на **рис. 1**. Як бачимо, гамма-опромінення пилку в дозі 5 Гр майже не позначається на швидкості проростання пилкових зерен, котре як і в контролі розпочинається за 0,5 год після початку культивування пилку. Проростання пилку відбувалося протягом перших трьох годин, після чого повністю припинялося. При цьому загаль-

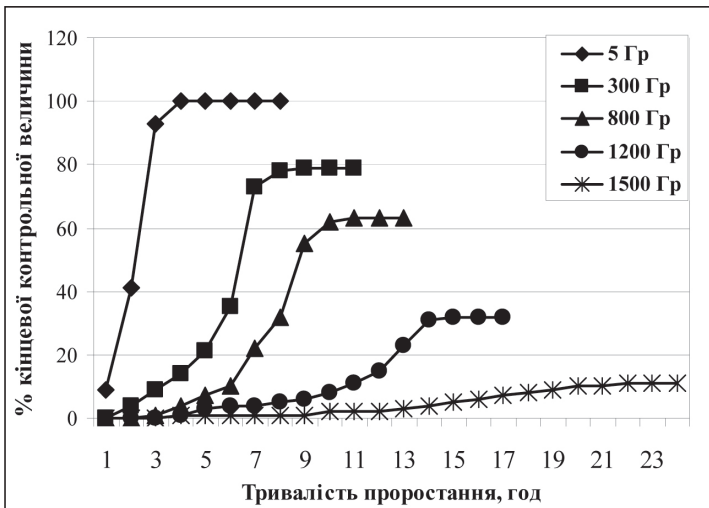


Рис. 1. Динаміка проростання гамма-опроміненого пилку тютюну духмяного (*Nicotiana glauca*) *in vitro*.

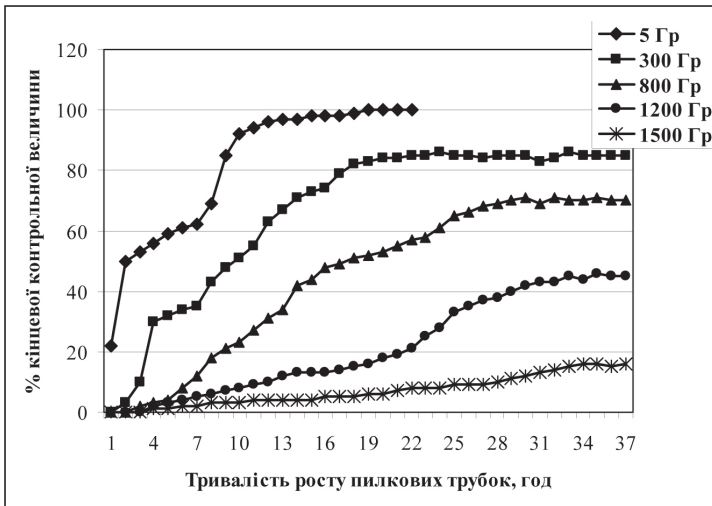


Рис. 2. Динаміка росту пилкових трубок гамма-опроміненого пилку тютюну духмяного (*Nicotiana glauca*) *in vitro*.

на кількість пророслого пилку становила приблизно 82 % і була такою, як і в контролі.

Збільшення дози опромінення пилку до 300 Гр призвело до зростання тривалості латентного періоду до початку проростання пилку *in vitro*, котрий в цьому випадку вже становив приблизно 1,2 год, що в 2,4 рази перевищувало контрольне значення. Проростання гамма-опроміненого в дозі 300 Гр пилку тривало 7 год і досягло кінцевої величини в 62%, що становило 85% контрольного значення. Розрахунки показують, що на кожні 100 пилкових зерен в середньому з'являлося 9 пилкових трубок кожну годину, тоді як при дозі в 5 Гр та в контролі протягом проростання на кожні 100 пилкових зерен кожну годину з'являлося по 27 пилкових трубок. Інакше кажучи, гамма-опромінення в дозі 300 Гр зумовило гальмування швидкості проростання пилку в 3 рази. Зі збільшенням дози опромінення пилку помічені тенденції посилювались. Так, при дозі в 800 Гр загальний термін проростання становив 11 год, при 1200 Гр – 14 год, а при 1500 Гр вже досягав 19 год. Одночасно виявилось, що швидкість утворення пилкових трубок в суспензії пилку при 800 Гр дорівнювала 5,2 год, при

1200 Гр – 2,5 год, а при 1500 Гр – лише 0,7 пилкових трубок за год.

Аналіз динаміки росту пилкових трубок в суспензії неопроміненого пилку встановив, що цей процес відбувається в декілька стадій (рис. 2). Так, відразу після проростання пилкові трубки починали швидко збільшувати свою довжину протягом перших 2,5 годин, після чого процес росту пилкових трубок значно уповільнювався.

На восьму годину культивування пилку *in vitro* середня довжина пилкових трубок знову починала різко зростати, а тому досягла майже 92% своєї кінцевої величини на 11 годину. На цьому етапі спостерігалось гальмування подальшого росту пилкових трубок. Через те, середня довжина пилкових трубок дуже повільно протягом наступних семи годин доходила до свого максимального значення і припиняла своє подальше збільшення, переходячи на стаціонарний рівень. Таким чином, для процесу росту пилкових трубок характерним є існування декількох стадій. Так, на стадії 1, котра тривала перші три години, відбувалось швидке подовження пилкових трубок. На стадії 2, котра починалась після третьої години і тривала ще чотири години, відбувалось різке гальмування швидкості росту пилкових трубок, а тому їх подовження проходило дуже повільно. Однак на стадії 3 швидкий ріст пилкових трубок поновлювався і тривав ще протягом 3-4 годин, після чого (стадія 4) швидкість росту пилкових трубок знову уповільнювалась і поступово знижувалась до нуля на 18 годину культивування пилку. На стадії 5 пилкові трубки вже більше не росли. До того ж, в суспензії інколи (до 1%) спостерігався неконтрольований викид цитоплазми пилку назовні, що поєднувалось з одночасним трісканням кінчиків пилкових трубок.

Після опромінення пилку гамма-променями в дозах 5 – 300 Гр, на кінетичних кривих росту пилкових трубок легко помітити збереження всіх вищезазначених п'яти стадій росту. Змінювалась лише їх тривалість. В той же час, при дозі в 800 Гр на кінетичній кривій росту пилкових трубок можна побачити відсутність стадії 3, яка пов'язана з повторним зростанням швидкості росту пилкових трубок. Зі збільшенням дози опромінення пилку до 1200 Гр та 1500 Гр процес росту пилкових трубок все більше набував поступального характеру, проходив рівномірно та характеризувався зникненням будь-якої різниці між своїми стадіями.

Таким чином, проведеними дослідженнями було показано, що з ростом дози опромінення пилку в діапазоні 5 – 300 Гр відбувається поступове скорочення стадії поновлення прискореного росту пилкових трубок, а при 800 Гр її повне зниження. Одночасно зникають відмінності між іншими стадіями росту пилку, а сам процес набуває рівномірного поступального характеру з постійною швидкістю.

Отримані дані мають важливе теоретичне значення, оскільки дають змогу зрозуміти механізм «менторного ефекту» в запиленні пилковими сумішами з гамма-опроміненним компонентом [13]. В

таких пилкових сумішах гамма-опроміненій в дозі 1000 Гр пилки відіграє роль провідника, який дає змогу інтактним пилковим трубкам долати бар'єр внутрішньовидової несумісності та доростати до зав'язі і сім'яних зачатків. В той же час, на останньому етапі прогамної стадії запліднення інтактні пилкові трубки, як правило, обганяють гамма-опромінені пилкові трубки, а тому самостійно проникають в ще непошкоджені зародкові мішки та здійснюють їх запліднення.

Виявляється, що такий феномен відбувається завдяки неспроможності гамма-опроміненіх пилкових трубок, порівняно з інтактними, до прискорення швидкості свого росту через втрату стадії З. Через те, інтактні пилкові трубки, які зберігають здатність до повторного прискорення свого росту виявляються більш активними та успішними при конкуренції за сім'язачатки та зародкові мішки.

Висновки

1. Встановлено, що гамма-опромінення затримує процес проростання пилкових трубок та дозозалежним чином уповільнює швидкість їх утворення.

2. З'ясовано, що гамма-радіація зумовлює втрату пилковими трубками здатності до повторного прискорення свого росту із-за зникнення стадії З, на якій це відбувається.

3. Показано, що гамма-радіація в дозах 5 – 300 Гр не впливає на стадії росту пилкових трубок, хоча і зумовлює зміни їх тривалості. В той же час, дози гамма-радіації в 800 Гр та вище спричиняли зникнення відмінностей між п'ятьма стадіями росту пилкових трубок, із-за чого ріст пилку набував рівномірного поступального характеру з постійною швидкістю.

4. Отримані дані та встановлені закономірності дають можливість пояснити виникнення «менторного ефекту» при проведенні запилення пилковими сумішами з гамма-опроміненним компонентом.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчити особливості росту гамма-опроміненого пилку *Nicotiana glauca* *in vivo*, а також при проведенні запилення пилковими сумішами з гамма-опроміненним в різних дозах допоміжним компонентом.

Література

1. Andreychenko SV, Grodzinskiy DM. Poluchenije gaploidov Petunia hybrida opyleniem gamma-obluchennoy pyl'tsoy. Doklady AN USSR. Seriya B. 1982;12:54-6. [in Russian].
2. Andreychenko SV, Grodzinsky DM. The parthenogenesis induction by gamma-irradiated pollen in Angiosperms. J. Cellul. Biochem. 1989;13(Suppl. C):842-6.
3. Brewbaker JL, Emery GC. Pollen radiobotany. Radiat. Bot. 1962;1(2):101-54.
4. Andreychenko SV, Grodzinskiy DM. Opylyayushchaya sposobnost' i rostovyye svoystva pyl'tsevykh zeren posle gamma-oblucheniya. Fiziol. biokh. kul't. rasteniy. 1983;15(2):148-52. [in Russian].
5. Kundu M, Dubey A, Srivastava M, Malik S. Induction of haploid plants in citrus through gamma-irradiated pollen and ascertainment of ovule age for maximum recovery of haploid plantlets. Turkish Journal of Biology. 2017;41:469-83.
6. Taskin H, Yuçel NK, Baktemur G, Comlekcioglu S, Buyukalaca S. Effects of different genotypes and gamma ray doses on haploidization with irradiated pollen technique in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). Canadian Journal of Plant Science. 2013;93:1165-8.
7. Kurtar ES, Sari N, Abak K. Objection of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica. 2002;127(3):335-44.
8. Kurtar ES, Balkaya A, Ozbakir M, Ofluoglu T. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). African Journal of Biotechnology. 2009;8(21):5944-51.
9. Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Reproduction. 2003;21:1121-8.
10. Murti RH, Kim HY, Yeoung YoRog. Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on *in vitro* mutagenesis of strawberry. African Journal of Biotechnology. 2013;12(30):4803-12.
11. Hojsgaard DH, Martinez EJ, Quarin CL. Competition between meiotic and apomictic pathways during ovule and seed development results in clonality. New Phytologist. 2013;197:336-47.
12. Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moskva: Praktika; 1999. 460 s. [in Russian].
13. Andreychenko SV. Mekhanizmy regulyatsii fiziologicheskikh funktsiy. Kiev: Naukova dumka; 1986. Mentornaya pyl'tsa: perspektivy ispol'zovaniya v selektsionnoy rabote. s. 107-10. [in Russian].

КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ УТВОРЕННЯ ТА РОСТУ ПИЛКОВИХ ТРУБОК *Nicotiana glauca* *IN VITRO* ПІСЛЯ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ В РІЗНИХ ДОЗАХ

Грубська Л. В., Клепко А. В., Андрейченко С. В., Гудков І. М.

Резюме. Використання різних ксенобіотиків, і зокрема іонізуючої радіації, для модифікації ростових властивостей пилкових трубок є розповсюдженим прийомом, який часто застосовується генетиками та селекціонерами при виведенні інбредних ліній різних рослин та для створення нових сортів. З огляду на це, вивчення проростання та росту гамма-опроміненого пилку *in vitro* є необхідним не тільки для визначення дозового діапазону дії іонізуючої радіації на пилки, а також для з'ясування тих особливих властивостей, яких набуває пилки після гамма-опромінення в різних дозах. Метою роботи було вивчення динаміки і кінетики утворення та росту пилкових трубок тютюну духмяного в штучних умовах поживного середовища. Пророщування пилку проводили в крапельних культурах на стерильній водопровідній воді з додаванням цукрози (10%) та борної кислоти (0,01%) при температурі +28°C та люмінесцентному освітленні в 800 лк. Дослідами встановлено дозозалежне пригнічення проростання та зменшення середньої довжини пилкових трубок. Крім того, показано, що при дозах 800 Гр та вище пилкові трубки втрачають здатність до тимчасового прискорення-уповільнення свого росту, оскільки він відбувається при таких дозах з постійною швидкістю. Через те, такі пилкові трубки можуть відігравати роль провідника – ментора для подолання гаметофітної несумісності у запиленнях пилковими сумішами.

Ключові слова: пилки, *Nicotiana glauca*, пилкові трубки, гамма-опромінення, пророщування *in vitro*.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И РОСТА ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК NICOTIANA ALATA IN VITRO ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ В РАЗНЫХ ДОЗАХ**Грубская Л. В., Клепко А. В., Андрейченко С. В., Гудков И. Н.**

Резюме. Использование разных ксенобиотиков, и в частности ионизирующей радиации, для модификации ростовых свойств пыльцевых трубок является распространенным приемом, который часто применяют генетики и селекционеры для выведения инбредных линий разных растений и создания новых сортов. В этой связи изучение прорастания и роста гамма-облученной пыльцы *in vitro* необходимо не только для определения дозового диапазона действия ионизирующей радиации на пыльцу, но также и для выяснения тех особенностей свойств, которые приобретает пыльца после гамма-облучения в разных дозах. Целью работы было изучение динамики и кинетики образования и роста пыльцевых трубок табака душистого в искусственных условиях питательной среды. Проращивание пыльцы проводили в капельных культурах на стерильной водопроводной воде с добавлением сахарозы (10%) и борной кислоты (0,01%) при температуре +28°C и люминесцентном освещении в 800 лк. Опытами установлено дозозависимое угнетение прорастания и уменьшение средней длины пыльцевых трубок. Кроме того, показано, что при дозах 800 Гр и выше пыльцевые трубки теряют способность временно ускорять-замедлять свой рост, поскольку он происходит при таких дозах с постоянной скоростью. Ввиду этого, такие пыльцевые трубки могут становиться проводниками – менторами в смешанных опылениях пыльцесмесями с несовместимым необлученным компонентом.

Ключевые слова: пыльца, *Nicotiana alata*, пыльцевые трубки, гамма-облучение, проращивание *in vitro*.

KINETIC PECULIARITIES OF NICOTIANA ALATA POLLEN TUBES' FORMATION AND GROWTH IN VITRO AFTER GAMMA-IRRADIATION IN DIFFERENT DOSES**Grubska L. V., Klepko A. V., Andreychenko S. V., Gudkov I. M.**

Abstract. Usage of different xenobiotics, in particular ionizing radiation, for the modification of growth properties of pollen tubes is widely spread due to the possibility to apply gamma-irradiated pollen for mutagenesis and apomixis induction as well as transgenesis implementation. In view of this, studying gamma-irradiated pollen germination and growth *in vitro* would be helpful not only for the determination of ionizing radiation effects on pollen but also elucidation the special features acquired by pollen through gamma-irradiation in wide dose range. The research aimed at analysis of dynamics and kinetics of *Nicotiana alata* pollen tubes formation and further growth on the artificial nutritional medium consisted of 10% sucrose and 0,01% boric acid in sterile tap water at +28°C and luminescent illumination of 800 lx. Pollen was collected before anthesis and irradiated in dry state by gamma-rays in the dose range 5 – 3000 Gy. Application of pollen drop culturing made possible us to follow the dynamics of pollen germination and pollen tube growth *in vitro*. Thus, unirradiated control pollen was shown to germinate rapidly within three hours after sowing on the water solution of nutrients, the latent period before germination being equal to half an hour. Gamma-irradiated by 5 Gy *Nicotiana alata* pollen proved to be of the same germination qualities as control. Meanwhile gamma-irradiation of pollen by 300 Gy caused the increase of latent period before pollen germination up to 1,2 hr, the whole germination term reaching 7 hr. Simultaneously the percentage of germinated pollen decreased to 62% comparing with control where pollen germination was equal to 82%. The further radiation dose elevation resulted in gradual elongation of latent period before pollen germination up to 2,8 hr at the dose of 800 Gy and 3,8 hr at the dose of 1500 Gy. Apart from this, pollen gamma-irradiation stipulated the slowing of pollen tube formation, the latter being equal to 5,2; 2,5 and 0,7 pollen-tubes/hr at 800 Gy, 1200 Gy and 1500 Gy, respectively.

Analysis of pollen-tube growth dynamics has elucidated that in control this process proceeded in five steps. At stage 1 pollen-tubes immediately after germination commenced to grow rapidly during 2,5 hr. Afterwards pollen-tube growth slowed down. By 8th hr of pollen cultivation *in vitro* the second raise of pollen-tube growth velocity appeared which continued within three hours and resulted in evident elongation of pollen tubes up to 92% of their final mean. At the fourth stage pollen-tubes reached their final length and entered the termination period (stage 5). Gamma-irradiation of tobacco pollen by 5 Gy did not change the shape of pollen-tube growth curve. However, dose increase to 300 Gy resulted in decrease of stage 3 duration associated with second raise of pollen-tube growth velocity. Further radiation dose elevation sequentially to 800 Gy, 1200 Gy and 1500 Gy caused full elimination of stage 3. Moreover, pollen-tube growth at high doses 1200 Gy and 1500 Gy proceeded with the same speed without any signs of its acceleration or slowing. Absence of second enhancement of pollen-tube growth at high radiation doses gives insight in mentor properties of gamma-irradiated pollen which promotes incompatible pollen growth in pistil and let it invade embryo-sacs in first turn. In addition, it's worth mentioning that high radiation doses caused pollen tips rupturing and issuing of pollen cytoplasm outwards.

Key words: pollen, *Nicotiana alata*, pollen tubes, radiation, *in vitro* germination.

*Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 25.11.2018 року*