

УДК 581.5:470.44/47

О. В. Ляпустіна, Т. М. Сатарова

*Український державний хіміко-технологічний університет
Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ЗАРОДКОВИХ МІШКІВ ЯК БІОТЕХНОЛОГІЧНА СИСТЕМА ДОРОЩУВАННЯ ЗИГОТИЧНИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ *IN VITRO*

Установлено можливість дорозвинення зародка кукурудзи в культурі ізольованих зародкових мішків на штучному живильному середовищі в умовах *in vitro* від ранньої перехідної стадії до початку органогенезу. З'ясовано, що культивування зародкових мішків з метою дорощування зародка та накопичення крохмалю в ендоспермі повинно проводитися понад 20 діб. Забарвлення культивованого зародкового мішка може слугувати маркерною ознакою дорозвинення зародка та накопичення крохмалю в ендоспермі.

Е. В. Ляпустина, Т. Н. Сатарова

*Украинский государственный химико-технологический университет
Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ МЕШКОВ КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ДОРАЩИВАНИЯ ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ *IN VITRO*

Установлена возможность доразвития зародыша кукурузы в культуре изолированных зародышевых мешков на искусственной питательной среде в условиях *in vitro* от ранней переходной стадии до начала органогенеза. Выяснено, что культивирование зародышевых мешков с целью доращивания зародыша и накопления крахмала в эндосперме должно проводиться более 20 суток. Окраска культивированного зародышевого мешка может служить маркерным признаком доразвития зародыша и накопления крахмала в эндосперме.

E. V. Lyapustina, T. N. Satarova

Ukrainian State University of Chemical Engineering, Dnipropetrovsk National University

CULTURE OF ISOLATED EMBRYO SACS AS A BIOTECHNOLOGICAL SYSTEM FOR THE UPGROWING OF MAIZE ZYGOTIC EMBRYOS *IN VITRO*

Our research established the possibility of updevelopment of maize embryo in a culture of isolated embryo sacs in artificial nutrient medium *in vitro* from the transition stage up to the beginning of organogenesis. It was determined that the cultivation of embryo sacs for the purpose of an embryo upgrowing and starch accumulation in endosperm should continue more than 20 days. The colour of cultivated embryo sac can be considered as a marker of embryo's upgrow and starch accumulation in endosperm.

Вступ

У квіткових рослин зародковий мішок являє собою жіночу гаметофітну генерацію. До запліднення зародковий мішок найпоширенішого *Polygonum*-типу вміщує яйцеклітину, дві синергіди, центральну клітину з двома полярними ядрами та три антиподи. Після запліднення яйцеклітина формує зародок, а центральна клітина дає початок ендосперму. Клітини, які входять до зародкового мішка до та після запліднення, ембріонально молоді, володіють високим ступенем тотипотентності [4]. Культура ізольованих яйцеклітин, зигот, молодих зародків, ендосперму та суцільних зародкових мішків на різних стадіях розвитку становить новий перспективний, але мало розроблений напрям біотехнологічних досліджень у галузі клітинної та генетичної інженерії кукурудзи.

Для ізолювання зародкових мішків часто застосовують ферментативну мацерацію тканин нуцелуса, але ферментативне втручання впливає на подальшу життєздатність зародкових мішків і дорослених у них зародків [8; 15; 16]. Для культивування ізольованих запліднених зародкових мішків кукурудзи з метою дорозвинення в них зародків запропоновано декілька варіантів живильних середовищ, які варіюють за вмістом мінеральних компонентів, цукрози та фітогормонів [2; 7; 9]. У цілому умови та особливості дорозвинення зародка та ендосперму усередині культивованого зародкового мішка лишаються не з'ясованими. Не охарактеризовано корелятивні взаємовідносини між розвитком зародка та ендосперму у даній біотехнологічній системі.

У зв'язку з цим мета нашої роботи – з'ясувати можливість розвитку в ізольованих зародкових мішках кукурудзи зародка та ендосперму в культурі *in vitro*.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження слугували зародкові мішки, ізольовані із 7-добових зернівок кукурудзи з генотипом зародка та ендосперму ДК2/477-322×A22. Качани відокремлювали від донорних рослин на сьому добу після запилення, видаляли обгортки, стерилізували у 70 % етиловому спирті протягом 1–2 с та триразово промивали у стерильній дистильованій воді. У цей період зародковий мішок втрачає адгезію з тканиною нуцелуса та може бути легко видалений із зернівки.

Зародкові мішки механічно ізолювали та експлантували на живильне середовище у стерильних умовах ламінар-боксів. Культивування зародкових мішків здійснювали на модифікованому живильному середовищі NBM за R. Mol et al. [9], яке вміщувало макросолі N 6, мікросолі B 5, 0,1 мг/л тіаміну гідрохлориду, 0,5 мг/л піридоксину гідрохлориду, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 90 г/л сахарози, 2 мг/л 6-бензиламінопурину та 7 г/л агару. Культивування проводили в чашках Петрі, по 5 зародкових мішків на чашку при температурі +26 °С у темряві. Аналіз результатів культивування вели на 20-ту та 50-ту добу в культурі.

Розвиток зародкових мішків і зародків *in vitro* оцінювали за такими показниками як забарвлення та лінійні розміри зародкового мішка, наявність, довжина та стан розвитку зародка, стан ендосперму та наявність у ньому крохмалю. Тимчасові препарати зародкових мішків для виявлення крохмалю фарбували реактивом Люголя. Морфометричний аналіз зародкових мішків і зародків проводили під мікроскопами МБС-1 і ЛОМО МІКМЕД-5, мікрофотографії отримані за допомогою фотоапарата Canon PowerShot A590 IS.

Результати та їх обговорення

На 7-му добу після запилення зернівка гібрида ДК2/477-322×А22 має довжину близько 5,0 мм. Вона вміщує прозорий зародковий мішок білого кольору (рис. 1а) довжиною 1,7 мм. У середині зародкового мішка присутній зародок (див. рис. 1б) довжиною 0,1 мм. У цьому віці (див. рис. 1в) зародок перебуває на ранній перехідній стадії (щойно відбулося виділення суспензора). Ендосперм у цей час закінчує клітиноутворення, крохмаль в ендоспермі відсутній.

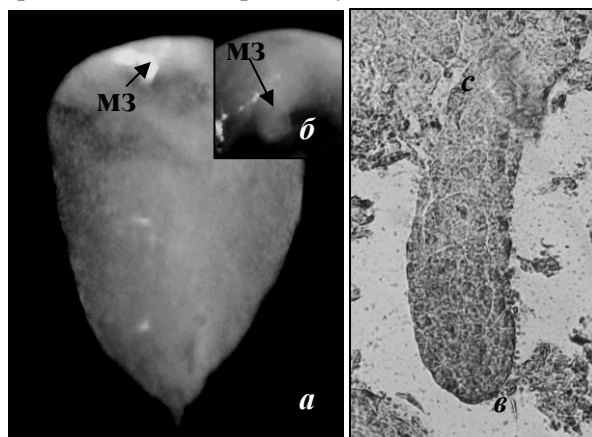


Рис. 1. Стан розвитку зародкового мішка та зародка кукурудзи на 7-му добу після запилення: зародковий мішок (а) та зародок (б); в – 7-добовий зародок кукурудзи на ранній перехідній стадії; МЗ – місце розташування зародка, с – суспензор; оптичне збільшення а, б – $\times 64$, в – $\times 400$

У процесі культивування ізольованих 7-добових зародкових мішків спостерігали поступові зміни зовнішньоморфологічних ознак, а саме забарвлення, прозорості, форми поверхні та розмірів, що може свідчити про зміну спрямованості метаболічних процесів і певні морфогенетичні перетворення культивованих об'єктів.

Дослідження розвитку зародкових мішків в динаміці показало, що до 20-ї доби культивування більша їх частина змінює забарвлення на жовтий колір і лише невеликий відсоток стає бурим (табл. 1). До 50-ї доби культивування зменшувалася частка жовтих і збільшувалася – бурих зародкових мішків, із прозорих вони ставали непрозорими.

Таблиця 1

Розвиток ізольованих зародкових мішків кукурудзи в культурі *in vitro*

Доба культури <i>in vitro</i>	Вивчено зародкових мішків, екз.	Забарвлення / прозорість зародкового мішка	% зародкових мішків даного кольору*	Довжина зародкового мішка*, мм	Середня довжина зародкового мішка*, мм	Кількість дорозвинених зародків, екз.
0	10	білий, прозорий	100	1,75	1,75	–
20	50	білий, прозорий	12,0 \pm 9,3	2,71 \pm 0,65	2,60 \pm 0,18	0
		жовтий, непрозорий	74,0 \pm 12,5	2,51 \pm 0,19		0
		бурий, непрозорий	14,0 \pm 9,9	2,96 \pm 0,27		0
50	24	білий, прозорий	20,8 \pm 16,9	3,50 \pm 0,76	3,34 \pm 0,21	2
		жовтий, непрозорий	20,8 \pm 16,9	3,40 \pm 0,48		1
		бурий, непрозорий	58,3 \pm 20,6	3,17 \pm 0,19		10

Примітки: * – дані наведено у вигляді $x \pm m \cdot t_{0,05}$, де x – середнє арифметичне, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – коефіцієнт Стьюдента на рівні значущості 0,05.

У процесі культивування змінювалися структура та форма поверхні зародкового мішка, відбувалося його ущільнення та в окремих випадках спостерігалось формування новоутворень на його поверхні (рис. 2).

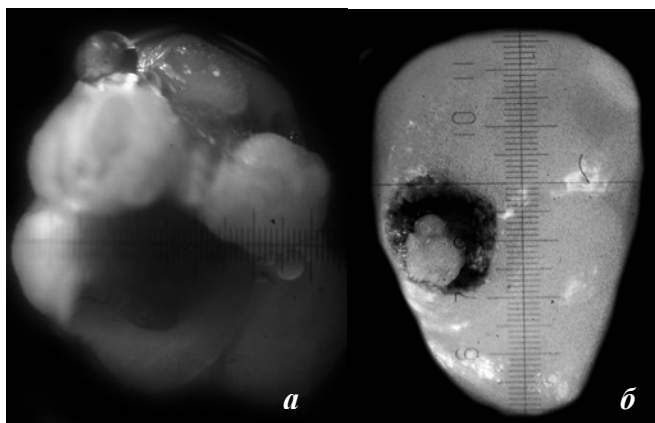


Рис. 2. Стан розвитку 7-добового зародкового мішка кукурудзи на 50-ту добу в культурі *in vitro*:
a, б – зародкові мішки зі зміненою структурою та формою поверхні; оптичне збільшення – $\times 64$

Зародкові мішки, які при культивуванні змінювали форму, із зовнішнього боку були випуклими (рис. 3*a*), а з боку середовища – увігнутими (див. рис. 3*б, в*).

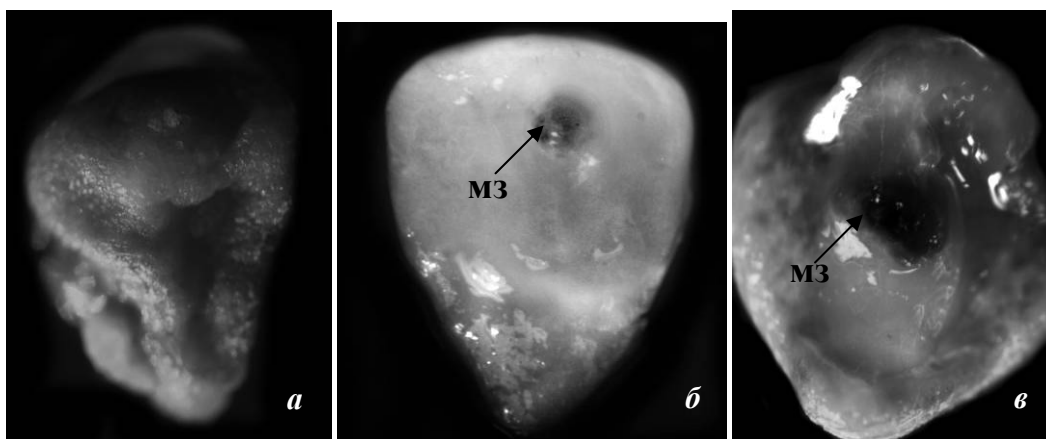


Рис. 3. Стан розвитку 7-добового зародкового мішка (*a, б, в*) та зародка на 50-ту добу культивування *in vitro*: *МЗ* – місце розташування зародка; оптичне збільшення – $\times 64$

При культивуванні ізолюваних зародкових мішків спостерігалось збільшення їх довжини приблизно на 48 % на 20-ту добу культивування і на 90 % – на 50-ту добу порівняно з довжиною зародкового мішка на момент експлантації. Суттєвої різниці у довжині зародкових мішків за групами забарвлення не знайдено (див. табл. 1).

На 20-ту добу культивування збільшення зародків усередині зародкових мішків ще не спостерігалось. На 50-ту добу в культурі в окремих зародкових мішках візуально відмічено ріст і дорозвинення зародка від ранньої перехідної стадії до початку етапу органогенезу (табл. 2).

Розвиток зародка та ендосперму кукурудзи в ізольованих зародкових мішках *in vitro*

Доба культури <i>in vitro</i>	Вивчено зародкових мішків, екз.	Забарвлення / прозорість зародкового мішка	Кількість дорозвинених зародків, екз.	% зародкових мішків із дорозвиненими зародками	Довжина зародка, мм	% зародкових мішків із крохмалем в ендоспермі
0	10	білий, прозорий	–	–	0,10	0
50	5	білий, прозорий	2	40,0	0,49	0
	5	жовтий, непрозорий	1	20,0		60,0
	14	бурий, непрозорий	10	71,4		50,0
Всього	24	–	13	54,2		41,7

Зародки, які просунулись у розвитку від вихідної (ранньої перехідної) стадії до початку етапу органогенезу, названо дорозвиненими. Такі зародки збільшувалися у довжину майже у 5 разів відносно вихідного розміру. Отримані дорозвинені зародки не формували проростків при пророщуванні (вірогідно, через недорозвинення стеблового та кореневого апексів зародка). Усі отримані зародки щільні та жовто-бурі (рис. 4).

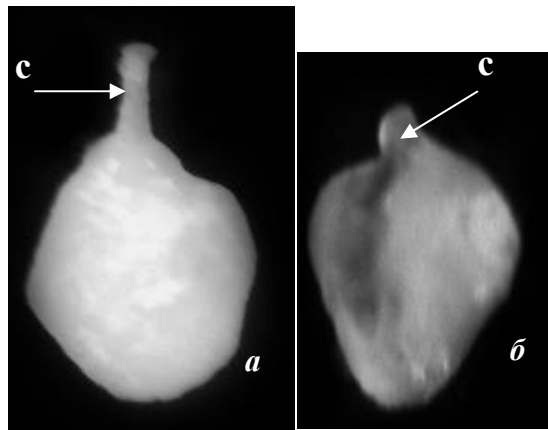


Рис. 4. Стан розвитку 7-добового зародка кукурудзи (а, б) на 50-ту добу в культурі *in vitro*:
с – суспензор; оптичне збільшення – $\times 64$

Відмічено, що у змінених за формою, культивованих жовтих і бурих зародкових мішках зародок завжди містився на увігнутій стороні (з боку середовища) і легко відокремлювався скальпелем (див. рис. 3б, в). Переважна більшість дорозвинених зародків отримана у бурих зародкових мішках (див. табл. 2). Припускаємо, що забарвлення культивованого зародкового мішка може слугувати маркерною ознакою дорозвинення зародків. Утворення сформованих зародків (із нормально розвиненими органами – щитком, зародковим корінцем, плюмулою), які б забезпечували проростання, в нашому експерименті не спостерігалось.

У процесі культивування зернівок відбувався розвиток ендосперму. Акумуляція крохмалю в ньому ставала помітною лише на 50-ту добу. Накопичення крохмалю спостерігалось тільки в жовтих і бурих зародкових мішках (див. табл. 2), тобто забарвлення культивованого зародкового мішка може слугувати маркерною ознакою накопичення крохмалю та розвитку ендосперму. Тісного зв'язку між накопиченням крохмалю в ендоспермі та розвитком зародка не встановлено, оскільки зародкові мішки, в яких у нашому експерименті знайдено дорозвинені зародки, або вміщували, або не вміщували крохмаль в ендоспермі (див. табл. 2).

Таким чином, проведені дослідження показали, що в ізолюваних зародкових мішках на живильному середовищі, яке містить 90 г/л сахарози та 2 мг/л 6-бензиламінопурину, спостерігається зростання зародка, але не відбувається формування повноцінних точок росту, які б дозволили при пророщуванні отримати нормальні проростки. Узагалі, дорощування різноманітних незрілих структур у культурі *in vitro* до сформованого та зрілого стану – складне завдання через різні потреби, зокрема, у пластичних та сигнальних речовинах на ключових фазах розвитку. І все ж, розроблено умови дозрівання в ізолюваній культурі *in vitro* тичинок, пилку, зав'язей та ендосперму кукурудзи [3; 5; 10].

Нормальне проходження основних стадій розвитку зародка на рослині забезпечує низка факторів як генетичної, так і фізіолого-біохімічної та морфогенетичної природи. Так, на прикладі тютюну показано, що наявність вихідної клітинної стінки зиготи відіграє ключову роль у встановленні її полярності, формуванні двоклітинного проембрію та нормального суспензора. За відсутності клітинної стінки або у випадку її регенерації із зиготи розвивається калус або глобулярний зародок без суспензора [13]. У *Arabidopsis thaliana* та кукурудзи досліджено гени, які відіграють ключову роль у диференціації елементів зародка. Зокрема, доведено активну експресію генів синтезу кальмодуліну саме у ранньому ембріогенезі кукурудзи [11]. У арабідопсису ідентифіковано декілька генів, які впливають на визначення та характеристики стеблової меристеми. Мутації цих генів повертають розвиток зародка до перехідної стадії, тоді як перехід до проліферації стеблового апекса гальмується. Підкреслюється провідна роль ауксинів у органогенезі зародка як сигнальних речовин розвитку полярності при формуванні радикалярного та стеблового апексів [12].

Дорозвинення зародків у нашій роботі отримано у 20–70 % зародкових мішків. Можливо, що гібридний генотип зародка та ендосперму міг, деякою мірою, через гібридний дизгенез гальмувати розвиток цих структур у певній частці зародкових мішків.

У проведеному експерименті розвиток зародка в ізолюваних зародкових мішках відбувався до початку органогенезу, а далі гальмувався. Однак, J. D. Laurie et al. [2] вдалося отримати розвиток зародків в ізолюваних зародкових мішках до сформованого стану та формування проростків. Оскільки у проведених дослідженнях як об'єкти взято різні форми, треба припустити, що генотип може мати суттєвий вплив на результати культивування. Але, в цілому, перехід до органогенезу потребує особливих специфічних умов і прояву низки факторів, які можуть визначати ефективність органогенезу. Відомо, що присутність декількох шарів нуцелуса навколо зародкового мішка забезпечує повноцінний розвиток останнього шляхом виділення у середовище речовин гормональної природи [2; 15]. Безумовно, важливим механізмом регуляції розвитку зародків є зміна співвідношення фітогормонів у зародку та оточуючому його середовищі. Деякі дослідники вважають за необхідне додавання до живильного середовища для дозрівання зародкових мішків та зародків цитокінінів, зокрема, 6-бензиламінопурину [2; 4]. У нашому експериментальному матеріалі наявність 2 мг/л 6-бензиламінопурину не забезпечила повного формування зародків. Вочевидь, у 5–9-добовому віці відбуваються зміни концентрації фітогормонів у зародках і зернівках кукурудзи. У декількох публікаціях продемонстровано, що у зернівці приблизно на 8-му добу в умовах *in vivo* концентрація цитокінінів сягає максимуму (цей вік відповідає пізній перехідній стадії розвитку зародка), а пізніше починає зменшуватися. Концентрація ауксинів у цей час зростає і розпочинається диференціація органів зародка [7]. Ці відомості свідчать про необхідність подальшого дослідження ролі фітогормонів і, зокрема, ауксинів у формуванні органів зиготичного зародка кукурудзи. До кінця не

з'ясованою залишається роль ендосперму у дозріванні зародків в ізолюваних зародкових мішках. У нашому дослідженні не виявлено взаємозв'язку між розвитком зародка та ендосперму в умовах *in vitro*. У зародкових мішках, де інтенсивно розвивався ендосперм, необов'язково відбувався розвиток зародка і, навпаки, дорозвинені зародки траплялися в зернівках, де не розвивався ендосперм.

У проведеному експерименті зародкові мішки активно змінювали при культивуванні забарвлення, форму та структуру поверхні. Встановлено, що зміна кольору зародкового мішка на бурий може слугувати маркерною ознакою того, що усередині нього розвивається зародок. У подальшому такі зернівки без видалення зародків можна трансплантувати на інше живильне середовище зі зміненим складом (зокрема, фітогормонів) для забезпечення проходження наступних стадій розвитку.

Зародки в нашому експерименті розвивалися дуже повільно. Так, на 20-ту добу культивування їх ще не можливо було помітити у культивованих зародкових мішках, тоді як на рослині *in vivo* зародки відповідного віку сягають близько 6–7 мм і легко візуалізуються. На 50-ту добу зародки розміром до 0,5 мм можна було спостерігати у частини культивованих зародкових мішків. Як відомо, зниження темпів розвитку зародків негативно відбивається на їх формуванні та здатності до проростання [1], тому актуальним завданням стає прискорення ембріогенезу усередині культивованого зародкового мішка.

Висновок

Установлено можливість дорозвинення зародка від ранньої перехідної стадії до початку етапу органогенезу в культурі ізолюваних зародкових мішків кукурудзи. Культивування зародкових мішків із метою дорощування зародка та накопичення крохмалю в ендоспермі повинно проводитися понад 20 діб. Виявлено, що забарвлення культивованого зародкового мішка може слугувати маркерною ознакою дорощування зародків і накопичення крохмалю в ендоспермі.

Бібліографічні посилання

1. **Сатарова Т. М.** Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Д., 2003. – 42 с.
2. **A novel** technique for the partial isolation of the maize embryo sacs and subsequent regeneration of plants / J. D. Laurie, G. Zhang, I. E. McGann et al. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 1999. – Vol. 35. – P. 320–325.
3. **Bommineni V. R.** Maturation of stamens and ovaries on cultured ear inflorescences of maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* – 1990. – Vol. 23. – P. 59–66.
4. **Dumas C.** Fertilization and early seed formation / C. Dumas, P. Rogowsky // *Comptes Rendus Biologies.* – 2008. – Vol. 331, N 10. – P. 715–725.
5. **Endosperm** cell and organ culture / D. Gruis, H. Guo, Q. Tian, O. A. Olsen // *Endosperm. Developmental and Molecular Biology.* Olsen, Odd-Arne (Ed.) / Series: Plant Cell Monographs. – Springer, 2007. – Vol. 8. – P. 111–119.
6. **In vitro** pollination and fertilization in maize (*Zea mays* L.): technical procedures and prospects for the dissection of the double fertilization process / J. E. Faure, C. Digonnet, R. Mol et al. // *Plant Sci.* – 1994. – Vol. 104. – P. 1–10.
7. **In vitro** development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis / E. Matthys-Rochon, F. Piola, E. Deunff et al. // *J. Exp. Bot.* – 1998. – Vol. 49, N 322. – P. 839–845.
8. **Leduc N.** Deleterious effect of minimal enzymatic treatments on the development of isolated maize embryo sacs in culture / N. Leduc, E. Matthys-Rochon // *Sex Plant Reprod.* – 1995. – Vol. 8, N 5. – P. 313–317.

9. **Mol R.** *In vitro* culture of fertilized embryo sacs of maize: zygotes and two-celled proembryos can developed into plants / R. Mol, E. Matthys-Rochon, C. Dumas // *Planta*. – 1993. – Vol. 189, N 2. – P. 213–217.
10. **Pareddy D. R.** Maturation of maize pollen *in vitro* / D. R. Pareddy, J. F. Petolino // *Plant Cell Rep.* – 1992. – Vol. 11. – P. 535–539.
11. **PCR-generated cDNA** library of transition-stage maize embryos: cloning and expression of calmodulin genes during early embryogenesis / C. Breton, A. Chaboud, E. Matthys-Rochon et al. // *Plant Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 27. – P. 105–113.
12. **Souter M.** Polarity and signaling in plant embryogenesis / M. Souter, K. Lindsey // *J. Exp. Bot.* – 2000. – Vol. 51, N 347. – P. 971–983.
13. **Tobacco** zygotic embryogenesis *in vitro*: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation / Y.-C. He, Y.-Q. He, L.-H. Qu et al. // *Plant Journal*. – 2007. – Vol. 49, is. 3. – P. 515–527.
14. **Van Lammeren A. A.** Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in presence or absence of 2,4-D // *Acta Bot. Neerl.* – 1988. – Vol. 37, N 1. – P. 49–61.
15. **Wagner T. V.** Observations on the isolated embryo sac of *Zea mays* L. // *Plant Sci.* – 1989. – Vol. 59. – P. 127–132.
16. ***Zea mays*** embryo sacs in culture. Plant regeneration from 1 day after pollination embryos / M. K. Campenot, G. Zhang, A. J. Culter, D. D. Cass // *Amer. J. Bot.* – 1992. – Vol. 79. – P. 1368–1373.

Надійшла до редакції 30.11.2009