

УДК 581.143.6:633.15

К. В. Деркач

Институт сільського господарства степової зони НААН України

ДИНАМІКА КАЛУСОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* У ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

Оцінено лінії кукурудзи зародкової плазми Ланкастер відносно здатності зберігати морфогенний потенціал калусів за тривалого культивування. Здатність до тривалого морфогенного калусогенезу генотипічно зумовлена та довше залишається високою у ліній, які належать до підплазми Mo17/Oh43. Визначено лінію підплазми Oh43, яка може слугувати базовою в цій підплазмі для тривалого культивування калусів зі збереженням їх морфогенності. Отримано рослини-регенеранти з культивованих тривало калусів. Визначено лінії, перспективні для використання у біотехнологічно-селекційних програмах.

Е. В. Деркач

Институт сельского хозяйства степной зоны НААН Украины

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ГЕНОТИПОВ КУКУРУЗЫ ЗАРОДЫШЕВОЙ ПЛАЗМЫ ЛАНКАСТЕР

Оценены линии кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер по отношению к способности сохранять морфогенный потенциал каллусов при длительном культивировании. Способность к продолжительному морфогенному каллусогенезу генотипически обусловлена и дольше остается высокой у линий, которые относятся к подплазме Mo17/Oh43. Выявлена линия подплазмы Oh43, которая может служить базовой в этой подплазме для длительного культивирования каллусов с сохранением их морфогенности. Получены растения-регенеранты из длительно культивируемых каллусов. Определены линии, перспективные для использования в биотехнологически-селекционных программах.

K. V. Derkach

Institute of Agriculture of Steppe Zone of NAAS of Ukraine

ESTIMATION OF CALLUSOGENESIS DYNAMICS IN THE MAIZE CULTURE OF THE LANCASTER GERM PLASM GENOTYPES *IN VITRO*

The ability of the maize inbred lines of the Lancaster germ plasm to maintain morphogenic potential of the callus under long cultivation has been estimated. The capability to long-term morphogenic callusogenesis is genotypically determined and longer in the Mo17/Oh43 subplasm line. The line of Oh43 subplasm may be the base for the long-continued cultivation of morphogenic calluses. Regenerated plants from the long-continued cultivated calluses were obtained. Promising inbreds for usage in biotechnology and breeding programs were identified.

Вступ

Зародкова плазма Ланкастер – одна з перспективних у селекційному відношенні зародкових плазм кукурудзи в Україні. Лінії зародкової плазми Ланкастер в основному

належать до середньостиглої та середньопізньої груп стиглості, проте їх інтенсивно використовують для створення скоростиглих генотипів кукурудзи, у селекції на абіотичну стійкість та як донори високої комбінаційної здатності [2; 5].

Поєднання методів біотехнології та селекції дозволяє дещо полегшити та прискорити процеси з удосконалення генотипів кукурудзи. Зокрема, використання методу культури клітин *in vitro*, який включає в себе етапи калусогенезу та регенерації, сприяє розширенню різноманіття вихідного селекційного матеріалу.

Калуси, які утворюються в процесі культивування *in vitro* незрілих зародків кукурудзи, поділяють на калуси типу I і типу II. Калуси типу I – компактні новоутворення, які ростуть повільно та регенерують шляхом соматичного ембріогенезу та пагонного органогенезу. Тривалість їх вирощування в культурі та регенераційна здатність обмежена декількома місяцями. Калуси типу II – крихка ембріонна тканина, яка росте швидко і яку можна підтримувати в культурі до двох років [6; 7].

А. Manivannan et al. [9; 10] характеризують калус типу I як компактний і органогенний, а калус типу II – крихкий і ембріогенний. Відмічено, що калус типу II володіє вищою регенераційною здатністю, ніж калус типу I. Калуси типу II використовуються для генетичної трансформації [11], для отримання стійких до абіотичних факторів генотипів [8], а також із метою отримання соматоклональних варіантів, оскільки у міру старіння тканини в ній накопичуються генетичні мутації [6].

Тривале збереження морфогенності культивованих калусів дає можливість відмовитися від використання штучного клімату.

У роботі [4] проведено оцінку калусогенного потенціалу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер на 30-ту добу культивування *in vitro*. Мета даної роботи – оцінка динаміки калусогенного потенціалу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер та визначення тривалості збереження морфогенного потенціалу даних генотипів.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом дослідження виступали 10 ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер: лінії ДК267, ДК212, ДК6080, ДК420-1 (підплазми Oh43), ДК633/266, ДК298 (підплазми Mo17/Oh43), ДК633 (підплазми Mo17), ДК3070 (підплазми Mo17/O92), ДК236 (підплазми Mo17/F2) і ДК633/325 (підплазми Mo17/Міндзенпуста). Як стандарт використовували лінію Chi31, яка належить до екзотичної зародкової плазми (підплазми Chi31) та широко використовується у біотехнологічних дослідженнях.

Донорні рослини вирощували у польових умовах за загальноприйнятою методикою польового досліду. Ізольовані незрілі зародки довжиною 1,0–1,5 мм на 10–12-ту добу після штучного запилення експлантували на живильне середовище N6 із додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 690 мг/л L-проліну, 30 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти. Культивування проводили у темряві при +25...+27 °C. На 150-ту добу культивування калуси розділяли на приблизно однакові за розмірами шматочки (приблизно 1,0–1,5 см) та висаджували на модифіковані за допомогою 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 690 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози середовища MS із різним вмістом 6-бензиламінопурина (6-БАП) (0; 0,1 та 1,0 мг/л).

Результати культивування реєстрували на 30, 60, 75, 90 та 120-ту добу від експлантації зародків. Частоти утворення морфогенних калусів, калусів типів I і II розраховували як процентне відношення зародків із певним типом реакції до загальної кількості культивованих зародків. Статистичну обробку даних проводили згідно з [1].

Дані у таблицях наведені у вигляді $\bar{x} \pm mt_{0,05}$, де \bar{x} – середнє арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Стюдента за рівня значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

Морфогенний потенціал культивованих ліній протягом досліджуваного періоду культивування знижується (табл.). Це стосується ліній, що проявили свій калусогенний потенціал на 30 та 60-ту добу культивування. Найбільший морфогенний потенціал на 120-ту добу культивування зафіксовано у лінії ДК298 (44,4 %) підплазми Мо17/Oh43, тоді як інша лінія даної підплазми (ДК633/266) характеризувалася значно нижчим рівнем морфогенного калусогенезу (23,2 %). Серед ліній підплазми Oh43 вища частота утворення морфогенних калусів на 120-ту добу культивування відмічалася в лінії ДК267 (25,0 %). Лінії ДК212, ДК6080 та ДК420-1 даної підплазми характеризувалися значно нижчим рівнем морфогенності (2,0–5,2 %).

Лінії, які проявили свій калусогенний потенціал лише на 60-ту добу культивування, на 120-ту добу культивування мали показники частоти утворення морфогенних калусів на рівні 0–9,3 %. Лінія ДК236 втратила свою морфогенність вже на 90-ту добу культивування. Лінія-стандарт Chi31 на 120-ту добу культивування відзначалася морфогенним калусогенезом на рівні 11,2 %. Незважаючи на те, що калуси типу I не здатні до тривалого культивування [6; 7], лінії ДК267, ДК298, ДК633, ДК3070, ДК633/325 та Chi31 на 120-ту добу культивування продовжували демонструвати калуси типу I. Лінія ДК236 не утворила калуси типу I взагалі. У лінії ДК6080 відмічено утворення калусу типу I на 60-ту добу культивування з лише дещо набухлого на 30-ту добу культивування незрілого зародка, хоча вже через 30 діб даний експлант перетворився на калус типу II.

Протягом досліджуваного періоду культивування відбувалося зниження значень частоти утворення морфогенних калусів у результаті переходу їх у неморфогенні, а також частоти утворення калусів типу I у результаті переходу їх у калуси типу II чи неморфогенні. Калуси типу II також демонстрували перехід у неморфогенні калуси.

Відомо, що формування калусів типу II відмічене у вужчому колі генотипів, ніж калусів типу I [6], а також що частота їх утворення нижча, ніж калусів типу I [9; 10]. Отримані на 30-ту добу культивування дані в переважній більшості свідчать про зворотне. Тож здатність до утворення калусів типу I чи II визначається генотипічно та дане співвідношення може бути змінене шляхом оптимізації складу середовища культивування. Обране для калусогенезу середовище рекомендовано використовувати для тривалого культивування ліній ДК298, ДК267 та ДК633/266.

Висаджені на 150-ту добу культивування на середовища регенерації калуси характеризувалися низькою регенераційною здатністю. Лише 3 з 11 ліній (ДК420-1, ДК298 та Chi31) проявили свій регенераційний потенціал. Лінія ДК420-1 (1 випадок регенерації на 233 шматочки калусів) характеризувалася ембріогенезом, лінія ДК298 (6 випадків регенерації на 712 шматочків калусів) – органогенезом, а лінія Chi31 – органогенезом (14 випадків регенерації) та ембріогенезом (2 випадки регенерації на 246 шматочків калусів). Лінії ДК420-1 та ДК298 регенерували лише на середовищі з 0,1 мг/л 6-БАП, лінія Chi31 – на всіх варіантах живильного середовища. Зі збільшенням тривалості перебування клітин у культурі *in vitro* соматоклональна мінливість зростає [3]. Разом із цим різко зменшується регенераційна здатність калусних тканин. Отримані нами дані підтверджують це. Низький регенераційний потенціал ліній, окрім соматоклональної мінливості, можливо, пов'язаний з недосконалістю складу живильного середовища.

**Динаміка калусогенезу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер
і екзотичної зародкової плазми Chi31**

Генотип	Плазма	Під-плазма	Кількість культивованих зародків, шт.	Діб у культурі	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК267	Ланкастер	Oh43	452	30	71,46 ± 4,25	67,92 ± 4,40	3,54 ± 1,74
				60	49,56 ± 4,71	45,13 ± 4,69	4,42 ± 1,94
				75	48,45 ± 4,71	43,14 ± 4,66	5,31 ± 2,11
				90	48,23 ± 4,71	15,93 ± 3,45	32,30 ± 4,40
				120	25,00 ± 4,08	1,55 ± 1,16	23,45 ± 3,99
ДК212	Ланкастер	Oh43	268	30	40,67 ± 6,01	13,81 ± 4,22	26,87 ± 5,43
				60	11,19 ± 3,86	0	11,19 ± 3,86
				75	10,07 ± 3,68	0	10,07 ± 3,68
				90	5,22 ± 2,72	0	5,22 ± 2,72
				120	5,22 ± 2,72	0	5,22 ± 2,72
ДК6080	Ланкастер	Oh43	186	30	37,63 ± 7,12	0	37,63 ± 7,12
				60	3,23 ± 2,60	0,54 ± 1,08	2,69 ± 2,38
				75	3,23 ± 2,60	0	3,23 ± 2,60
				90	3,23 ± 2,60	0	3,23 ± 2,60
				120	3,23 ± 2,60	0	3,23 ± 2,60
ДК420-1	Ланкастер	Oh43	199	30	30,15 ± 6,52	2,51 ± 2,22	27,64 ± 6,36
				60	2,01 ± 1,99	1,01 ± 1,42	1,01 ± 1,42
				75	2,01 ± 1,99	1,01 ± 1,42	1,01 ± 1,42
				90	2,01 ± 1,99	0	2,01 ± 1,99
				120	2,01 ± 1,99	0	2,01 ± 1,99
ДК633/266	Ланкастер	Mo17/ Oh43	383	30	84,60 ± 3,69	5,48 ± 2,33	79,11 ± 4,16
				60	35,51 ± 4,90	3,13 ± 1,78	32,38 ± 4,79
				75	32,90 ± 4,81	3,13 ± 1,78	29,77 ± 4,68
				90	26,11 ± 4,49	0	26,11 ± 4,49
				120	23,24 ± 4,32	0	23,24 ± 4,32
ДК298	Ланкастер	Mo17/ Oh43	372	30	78,49 ± 4,27	34,68 ± 4,94	43,82 ± 5,15
				60	69,62 ± 4,78	30,91 ± 4,80	38,71 ± 5,06
				75	56,45 ± 5,15	25,27 ± 4,51	31,18 ± 4,81
				90	53,76 ± 5,18	8,87 ± 2,95	44,89 ± 5,16
				120	44,35 ± 5,16	0,54 ± 0,76	43,82 ± 5,15
ДК633	Ланкастер	Mo17	474	30	0	0	0
				60	13,71 ± 3,16	8,44 ± 2,56	5,27 ± 2,06
				75	12,66 ± 3,06	6,75 ± 2,31	5,91 ± 2,17
				90	9,28 ± 2,67	1,69 ± 1,18	7,59 ± 2,44
				120	9,28 ± 2,67	1,48 ± 1,11	7,81 ± 2,47
ДК3070	Ланкастер	Mo17/O9 2	193	30	0	0	0
				60	12,44 ± 4,76	12,44 ± 4,76	0
				75	8,81 ± 4,09	8,81 ± 4,09	0
				90	3,63 ± 2,70	3,63 ± 2,70	0
				120	3,63 ± 2,70	2,59 ± 2,29	1,04 ± 1,46
ДК236	Ланкастер	Mo17/ F2	445	30	0	0	0
				60	1,35 ± 1,09	0	1,35 ± 1,09
				75	1,35 ± 1,09	0	1,35 ± 1,09
				90	0	0	0
				120	0	0	0
ДК633/325	Ланкастер	Mo17/ Мінд- зенпуста	534	30	0	0	0
				60	9,36 ± 2,52	7,49 ± 2,28	1,87 ± 1,17
				75	6,74 ± 2,17	6,74 ± 2,17	0
				90	3,93 ± 1,68	0,94 ± 0,83	3,00 ± 1,48
				120	2,81 ± 1,43	0,94 ± 0,83	1,87 ± 1,17
Chi31	Екзотична	Chi31	473	30	59,20 ± 4,52	19,66 ± 3,66	39,53 ± 4,50
				60	15,43 ± 3,33	6,34 ± 2,24	9,09 ± 2,65
				75	13,32 ± 3,13	5,92 ± 2,17	7,40 ± 2,41
				90	11,84 ± 2,97	4,44 ± 1,90	7,40 ± 2,41
				120	11,21 ± 2,90	1,27 ± 1,03	9,94 ± 2,75

Висновки

Здатність до тривалого культивування *in vitro* зі збереженням морфогенного потенціалу у ліній кукурудзи генотипічно зумовлена. Проведено оцінку динаміки калусогенезу 10 ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер та лінії-стандарту Chi31. Показано можливість тривалого збереження морфогенності культивованих калусів. Підплазма Мо17/Oh43 довше за інші досліджені підплазми здатна до збереження морфогенного потенціалу калусів. Серед ліній – представників підплазми Oh43 відзначено ДК267 як лінію з тривалим збереженням морфогенності культивованих калусів. Рекомендовано ДК298, ДК267 та ДК633/266 як лінії із тривалим збереженням морфогенності до застосування у біотехнологічно-селекційних програмах за умови підбору оптимального середовища регенерації.

Бібліографічні посилання

1. **Атраментова Л. О.** Статистичні методи в біології / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. – Х. : ХНУ ім. В. Н. Каразіна. – 2007. – 288 с.
2. **Боденко Н. А.** Добір та оцінка вихідного матеріалу на посухо- та жаростійкість для селекції середньостиглих гібридів кукурудзи : Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : 06.01.05 – Селекція рослин. – Дніпропетровськ, 2003. – 19 с.
3. **Генетичний** поліморфізм соматоклональних ліній кукурудзи, отриманих від лінії P346 / Д. М. Майданок, І. О. Андреев, К. В. Спірідінова, В. А. Кунах // Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23. – № 4. – С. 324–331.
4. **Деркач К. В.** Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro* / К. В. Деркач, О. Є. Абраїмова, Т. М. Сатарова // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2011. – Вип. 19, т. 1. – С. 16–21.
5. **Нові** ранньостиглі та середньоранні самозапилені лінії плазми Ланкастер / Є. І. Беліков, А. В. Алдошин, Т. Г. Купріченкова, С. О. Шевченко // Бюл. Ін-ту зернового господарства. – 2005. – № 23–24. – С. 21–24.
6. **Пиралов Г. Р.** Особенности роста и дифференциации длительно пассируемой каллюсной культуры линии кукурузы ДК675 / Г. Р. Пиралов, О. Е. Абраїмова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т. 35, № 5. – С. 372–376.
7. **Пиралов Г. Р.** Цитоморфологические особенности начальных этапов каллусогенеза и регенерации в культуре незрелых зародышей кукурузы / Г. Р. Пиралов, О. Е. Абраїмова // Геном рослин: 36. статей V Міжнар. конф. – Одеса, 2008. – С. 212–216.
8. **Al-Naggar A. M. M.** Plant regeneration of some Egyptian maize genotypes from type II callus maintained under water stress condition / A. M. M. Al-Naggar, A. I. Ragab, M. R. I. Al-Bakry // Arab Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 14, N 1. – P. 49–60.
9. **Callus** induction and regeneration of elite Indian maize inbreds / A. Manivannan, J. Kaul, A. Singode, S. Dass // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, N 44. – P. 7446–7452.
10. **In vitro** plant generation of tropical maize genotypes / A. H. Gorij, M. Zolnoori, A. Jamasbi, Z. Zolnoori // International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology. – 2011. – Vol. 16. – P. 52–59.
11. **Multicellular** genesis of leaf primordium was demonstrated via chimaeric transgenic plant of maize (*Zea mays* L.) regenerated from type II calli / Z.-Q. Xu, X. Huang, C. Feng et al. // Molecular Biology Reports. – 2010. – N 37. – P. 3525–3531.

Надійшла до редколегії 02.12.2011