

КАЛУСОГЕНЕЗ У ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ НА ФОНІ АУКСИНОВОГО НАВАНТАЖЕННЯ

Т. М. Сатарова, доктор біологічних наук;

Г. Р. Піралов, кандидат біологічних наук;

Н. А. Боденко, кандидат сільськогосподарських наук;

О. Є. Абраїмова

Інститут зернового господарства НААН України

Досліджено вплив різних концентрацій дикамби та їх поєднань з 2,4-дихлорфеноксіоцтовою кислотою (2,4-Д) на індукцію калусогенезу в культурі незрілих зародків ліній кукурудзи з основних комерційних зародкових плазм. Встановлено, що для отримання морфогенних калусів повне або часткове заміщення у середовищі індукції 2,4-Д на дикамбу є суттєвим фактором впливу, ступінь ефективності якого визначається генотипом. Лінії з високим рівнем морфогенного калусогенезу та чутливі до дії ауксинового навантаження щодо формування крихкої калусної тканини типу II належали до зародкових плазм Iodent, Lancaster, PLS61 та Chi31.

Ключові слова: кукурудза, калусогенез, ауксини, зародкові плазми.

Калусогенез є експериментальною базою в дослідженнях з регенерації рослин і гене-тичної трансформації, а також при отриманні соматоклональних варіантів, започаткуванні суспензійних культур та культур протопластів. Для отримання калусної тканини у злаків використовують незрілі зародки. Ці експлантати в культурі *in vitro* утворюють як морфогенні калуси (на щитку), більшість яких здатна до регенерації рослин, так і неморфогенні, тобто нездатні до регенерації калуси (як на щитку, так і на зародковій осі). Морфогенні щиткові калуси злаків поділяють на два основних типи – калус типу I (компактний) і калус типу II (пухкий) [8]. Калус типу I росте повільно, зовні – білий або жовтий, щільний, компактний, швидко переходить до регенерації і не спроможний до тривалої підтримки в культурі. Калус типу II відрізняється швидким ростом, зовні м'який, крихкий, білий або блідо-жовтий, часто прозорий, здатний до тривалої підтримки в культурі при регулярному пасивуванні на свіже живильне середовище. При зниженні концентрації ауксинів калус типу II також спроможний до регенерації. Вивченню структури та регенераційного потенціалу калусів кукурудзи типу I і типу II присвячена значна кількість робіт, в яких розглядаються ультраструктурні, біохімічні, цитогенетичні та інші особливості двох основних типів морфогенних калусів, а також характер їх генетичного контролю і шляхи морфогенезу [1, 6, 9, 11, 14 та ін.]. У клітинній і генетичній інженерії кукурудзи використовуються тільки морфогенні калуси, оскільки кінцевою метою біотехнологічних досліджень цієї культури є одержання рослин-регенерантів із заданими властивостями. При цьому важливе значення для конкретних біотехнологічних маніпуляцій має отримання і використання того або іншого типу морфогенних калусів. Так, для одержання рясної регенерації слід використовувати калус типу I, для створення колекцій калусних культур, започаткування суспензійних культур та культур протопластів – калус типу II, для отримання соматоклональних варіантів та в генно-інженерних маніпуляціях – калуси обох типів [13, 16].

Відомо, що фітогормони класу ауксинів є необхідними компонентами живильних середовищ для індукції калусогенезу у кукурудзи. Найчастіше використовується 2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) [7, 12], але останніми роками виявлено вплив інших ауксинів, зокрема дикамби на стимулювання індукції калусогенезу в культурі незрілих зародків [15]. При з'ясуванні найбільш оптимального ауксинового навантаження необхідно враховувати, що вплив генотипу, а також взаємодія генотипу та факторів культивування є суттєвими чинниками в розвитку калусогенезу та підтриманні

калусів в культурі [3, 5]. Також слід враховувати, що отримані калуси потрібні для подальшої диференціації і регенерації або довгострокового підтримання в культурі *in vitro* у недиференційованому стані. Саме ауксинове навантаження у середовищі індукції може виявитися критичним фактором при визначенні подальших морфогенетичних можливостей калусної тканини. У даній роботі ми досліджували вплив різних концентрацій дикамби, а також поєднань 2,4-Д і дикамби в живильному середовищі на індукцію калусогенезу у різних ліній кукурудзи з основних комерційних зародкових плазм.

Матеріалом для дослідження слугували перспективні у селекційному та біотехнологічному відношенні лінії кукурудзи, а саме ДК366 (зародкова плазма Oh43), ДК443 (Iodent), ДК633 (Mo17/C103), ДК675 (Lancaster), Chi31 (Chi31) та PLS61 (PLS61). Для індукції калусогенезу незрілі зародки довжиною 1 мм у віці 12-14-ти днів після запилення експлантували на контрольне середовище та його модифікації за вмістом ауксинів. Контрольне середовище вміщувало макро-, мікросолі та вітаміни середовища N₆ [10], 100 мг/л інозиту, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла та 1 мг/л 2,4-Д. У модифікаціях контрольного середовища 1 мг/л 2,4-Д було замінено на один з наступних компонентів: 1 мг/л дикамби; 2 мг/л дикамби; 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л дикамби; 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. Аналіз результатів індукції калусогенезу проводили на 30-ту добу культивування. Розраховували загальну частоту калусогенезу (%) як процентне відношення кількості зародків, що сформували калуси, до загальної кількості культивованих зародків. Частоту формування морфогенних калусів (%) підраховували як процентне відношення кількості зародків, що утворили морфогенні калуси будь-якого типу, до загальної кількості культивованих зародків. Частоту утворення морфогенних калусів типу I (%) і типу II (%) також підраховували як процентне відношення кількості зародків, які утворили калуси відповідного типу до загальної кількості культивованих зародків. Статистичну обробку результатів виконано за Г. Ф. Лакінім [2].

В таблиці 1 наведено частоту загального калусогенезу та частоту утворення морфо-генних калусів при дії різних комбінацій ауксинів у індуктивному живильному середовищі.

У вивчених ліній, крім лінії ДК633, усі варіанти фітогормонального впливу забезпечували загальну частоту калусогенезу на рівні 98-100%. У ДК633 загальна частота калусогенезу становила 65,3-96,8%, при цьому у всіх експериментальних варіантах частота калусогенезу була вища, ніж в контролі.

Частота утворення морфогенних калусів великою мірою залежала від генотипу донор-ної рослини як в контрольному варіанті, так і на фоні ауксинового навантаження. Так, у лінії ДК366 тільки у варіанті з 1 мг/л дикамби спостерігалось достовірне збільшення показника порівняно з контролем. У лінії ДК443 при дуже високому рівні утворення морфогенних калусів (93,3-100%) різниці між варіантами не встановлені. У лінії ДК633 при низькому загальному рівні утворення морфогенних калусів тенденція до збільшення показника відносно контролю відмічалась у варіанті 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. У лінії ДК675 збільшення частоти утворення морфогенних калусів порівняно з контролем спостерігалось у варіантах з 1 мг/л дикамби та 2 мг/л дикамби. Тенденція до збільшення показників відмічена у варіантах з 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л дикамби та 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. У ліній PLS61 та Chi31 за високої загальної частоти морфогенних калусів різниці між варіантами не виявлено.

Отже, ауксинові речовини не діють на лінії з високим вихідним рівнем калусогенезу, тобто вони є високочутливими, оскільки навіть в контролі досліджуваний показник у них сягає майже 100%. Це лінії ДК443, PLS61 та Chi31, які представляють зародкові плазми Iodent, PLS61 та Chi31 відповідно.

1. Вплив ауксинів на калусогенез в культурі незрілих зародків ліній кукурудзи

Лінія	Вміст ауксинів в середовищі	Кількість культивованих зародків	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення морфогенних калусів, %
ДК366	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	105	99,0 ^{a*}	7,6 ^{a*}
	1 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	21,9 ^b
	2 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	8,6 ^{ab}
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	9,5 ^{ab}
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	11,4 ^{ab}
ДК443	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	60	100,0 ^a	93,3 ^a
	1 мг/л дикамби	60	100,0 ^a	100,0 ^a
	2 мг/л дикамби	60	100,0 ^a	93,3 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	60	100,0 ^a	93,3 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	60	100,0 ^a	96,7 ^a
ДК633	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	95	65,3 ^a	2,1 ^{ab}
	1 мг/л дикамби	95	93,7 ^b	4,2 ^{ab}
	2 мг/л дикамби	95	84,2 ^{ab}	2,1 ^{ab}
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	95	75,8 ^a	1,1 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	95	96,8 ^b	9,5 ^b
ДК675	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	117	99,1 ^a	27,4 ^a
	1 мг/л дикамби	117	100,0 ^a	54,7 ^{bc}
	2 мг/л дикамби	117	100,0 ^a	64,1 ^b
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	117	99,1 ^a	37,6 ^{ac}
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	117	99,1 ^a	41,0 ^{ac}
Chi31	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	107	98,1 ^a	77,6 ^a
	1 мг/л дикамби	107	100,0 ^a	81,3 ^a
	2 мг/л дикамби	107	99,1 ^a	73,8 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	107	100,0 ^a	79,4 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	107	100,0 ^a	82,2 ^a
PLS61	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	105	100,0 ^a	87,6 ^a
	1 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	89,5 ^a
	2 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	87,6 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	95,2 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	105	100,0 ^a	94,8 ^a
Всього	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	589	93,7 ^a	46,3 ^a
	1 мг/л дикамби	589	99,0 ^c	56,4 ^b
	2 мг/л дикамби	589	97,3 ^{bc}	53,1 ^{ab}
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	589	95,9 ^{ab}	50,3 ^{ab}
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	589	99,3 ^c	54,1 ^{ab}

* середні значення ознаки для однієї лінії, позначені однаковою літерою, недостовірно розрізняються на рівні значущості 0,05.

Ауксини впливали на частоту утворення морфогенних калусів у ліній з низьким вихідним рівнем морфогенного калусогенезу (слабкочутливі). Це лінії ДК366, ДК633 та ДК675, які належать до зародкових плазм Oh43, Mo17/C103 та Lancaster відповідно. Вико-ристання 1 мг/л дикамби замість 1 мг/л 2,4-Д у живильному середовищі зумовлювало три-разове збільшення частоти утворення морфогенних калусів у лінії ДК366, дворазове підвищення цього показника у ДК675 і вдалося виявити тенденцію до його збільшення у лінії ДК633. При збільшенні дикамби у живильному середовищі до 2 мг/л для ліній ДК366, ДК633 та у варіанті з 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л дикамби для ліній ДК675, ДК366, ДК633 частота утворення морфогенних калусів у слабкочутливих ліній була на рівні контролю. При використанні середовища з 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби замість контрольного достовірно збільшення досліджуваного показника у 4,5 раза мало місце у ДК633, а у ДК675 виявлена тенденція до його підвищення. Отже, кращим серед досліджених варіантів щодо збільшення частоти утворення морфогенних калусів ми вважаємо середовище з 1 мг/л дикамби та середовище 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби,

адже саме у цих варіантах утворення морфогенних калусів поліпшується у слабкочутливих ліній і не погіршується у висо-кочутливих.

2. Частота утворення морфогенних калусів типу I і типу II у ліній кукурудзи за дії ауксинового навантаження

Лінія	Вміст ауксинів в середовищі	Кількість культивованих зародків	Частота утворення морфогенних калусів типу I, %	Частота утворення морфогенних калусів типу II, %
ДК366	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	105	7,6 ^a	0,0 ^a
	1 мг/л дикамби	105	3,8 ^a	18,1 ^b
	2 мг/л дикамби	105	8,6 ^a	0,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	105	8,6 ^a	1,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	105	10,5 ^a	1,0 ^a
ДК443	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	60	73,3 ^a	20,0 ^a
	1 мг/л дикамби	60	43,3 ^b	56,7 ^b
	2 мг/л дикамби	60	63,3 ^{ab}	30,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	60	63,3 ^{ab}	30,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	60	60,0 ^{ab}	36,7 ^{ab}
ДК633	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	95	2,1 ^a	0,0 ^a
	1 мг/л дикамби	95	4,2 ^a	0,0 ^a
	2 мг/л дикамби	95	2,1 ^a	0,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	95	1,1 ^a	0,0 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	95	8,4 ^a	1,1 ^a
ДК675	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	117	0,0 ^a	27,4 ^a
	1 мг/л дикамби	117	0,0 ^a	54,7 ^{bc}
	2 мг/л дикамби	117	0,0 ^a	64,1 ^b
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	117	0,0 ^a	37,6 ^{ac}
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	117	0,0 ^a	41,0 ^{ac}
Chi31	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	107	19,6 ^a	57,9 ^a
	1 мг/л дикамби	107	15,0 ^a	66,4 ^{ab}
	2 мг/л дикамби	107	15,0 ^a	58,9 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	107	0,0 ^b	79,4 ^b
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	107	1,9 ^b	80,4 ^b
PLS61	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	105	51,4 ^a	36,2 ^a
	1 мг/л дикамби	105	43,8 ^a	45,7 ^a
	2 мг/л дикамби	105	44,8 ^a	42,9 ^a
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	105	20,0 ^b	75,2 ^b
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	105	10,4 ^b	84,3 ^b
Всього	1 мг/л 2,4-Д (контроль)	589	21,9 ^a	24,4 ^a
	1 мг/л дикамби	589	16,3 ^{ab}	40,1 ^{bc}
	2 мг/л дикамби	589	19,0 ^a	34,1 ^b
	0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби	589	11,7 ^b	38,5 ^{bc}
	0,5 мг/л 2,4-Д+1 мг/л дикамби	589	11,5 ^b	42,6 ^c

* середні значення ознаки для однієї лінії, позначені однаковою літерою, недостовірно розрізняються на рівні значущості 0,05.

Частота утворення морфогенних калусів типу I і типу II у досліджених ліній представлена в таблиці 2.

У нашому експерименті утворення морфогенних калусів типу I в ДК633 поліпшувалося лише у варіанті з 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. Загалом, поліпшення утворення морфогенних калусів відбувалося за рахунок збільшення частки калусів типу II. За здатністю до формування калусів типу II в контролі досліджені лінії розподілялися: на ви-сокочутливі – PLS61, Chi31, ДК675, середньочутливі – ДК443 та низькочутливі – ДК366, ДК633. Розподілення генотипів за вихідною здатністю щодо

утворення калусів типу II залежно від зародкової плазми в цілому відповідало загальному рівню морфогенного калу-согенезу. Високо- та середньоспроможні до калусогенезу лінії при тестуванні в контролі належали не тільки, як раніше, до плазм PLS61, Chi31, Iodent, але й до плазми Lancaster. До останньої належала лінія ДК675, яка здатна утворювати калусну тканину типу II і тривалий час перебувати в культурі [4]. Ознака “частота морфогенних калусів типу II” на відміну від сумарної ознаки “частота морфогенних калусів” змінювалася при зміні ауксинових компо-нентів середовища перш за все у високо- та середньочутливих ліній. Кращими варіантами порівняно з контролем для високочутливих ліній PLS61 та Chi31 були: 0,5 мг/л 2,4-Д+0,5 мг/л дикамби та 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. У середньоспроможної до калусо-генезу лінії ДК443 утворення калусів типу II стимулювалося 1 мг/л дикамби. Серед низькочутливих ліній тільки у варіанті з 1 мг/л дикамби у ДК366 спостерігалось утворення калусів типу II – на рівні 18 %, у всіх інших випадках показник достовірно не відрізнявся від нуля.

Таким чином, для отримання калусів типу II повна або часткова зміна 2,4-Д у середовищі індукції на дикамбу є суттєвим впливовим фактором, ступінь ефективності якого залежить від генотипу. Спостереження за здатністю калусної тканини типу II до подальшого пасивування показало, що калуси, ініційовані на середовищі з деякою часткою 2,4-Д (0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби), краще та більш тривалий час підтримувалися в культурі, ніж калуси, ініційовані при дії лише дикамби. Тому у подальшій роботі для стимуляції утворення калусів типу II у високо- і середньочутливих до калусогенезу ліній рекомендується використовувати середовища, збагачені 0,5 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л дикамби. Вірогідно, для групи низько чутливих ліній необхідно збільшити концентрацію ауксинів або підібрати більш оптимальний варіант поєднань різних ауксинових речовин.

Бібліографічний список

1. Белоусов А.А. Генетическое улучшение популяций кукурузы по частоте соматического эмбриогенеза и андрогенеза в культуре *in vitro* / А.А. Белоусов, И.С. Замрибориц // Гене-тика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Майкоп: РИПО Адыгея, 1999. – С. 273–277.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия: уч. пособие / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990 – 352 с.
3. Пиралов Г.Р. Влияние биологических особенностей исходного материала и состава пита-тельных сред на каллусогенез и регенерацию в культуре незрелых зародышей кукурузы / Г.Р. Пиралов, О.Е. Абраимова // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1997. – Т. 29. – № 1. – С. 44–50.
4. Пиралов Г.Р. Особенности роста и дифференциации длительно пассируемой каллусной культуры линии кукурузы ДК675 / Г.Р. Пиралов, О.Е. Абраимова // Физиол. и биох. культ. раст. – 2000. – Т. 32. – № 5 (187). – С. 372–376.
5. Сатарова Т.М. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. ... доктора біол. наук: 03.00.20 "Біотехнологія" / Тетяна Миколаївна Сатарова; Ін-т клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ. – К., 2002. – 537 с.
6. Чеченева Т.М. Спонтанна та індукована мінливість кукурудзи *in vitro*: автореф. дис.. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук: 03.00.15 "Генетика" / Т.М. Чеченева; Ін-т фізіології рослин та генетики НАНУ. – К., 2003. – 44 с.
7. Aguado-Santacruz G.A. In vitro plant regeneration from quality protein maize / G.A. Aguado-Santacruz, E.Garcia-Moya, J.Aguilar-Acuna et al. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2007. – Vol. 43. – P. 215–224.
8. Armstrong C.L. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline / C.L.Armstrong, C.E. Green // Planta. – 1985. – Vol. 164. – N 2. – P. 207–214.
9. Armstrong C.L. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis / C.L. Armstrong, J. Romero-Seversou, T.K. Hodges // Theor. Appl. Genet. – 1992. – Vol. 84. – P. 755–762.

10. *Chu C.C.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments of the nitrogen sources / *C.C. Chu, J.J. Wang, J.S. Sun* // *Scientia Sinica*. – 1975. – Vol. 18. – N 5. – P. 659–668.
11. *Emons A.M.C.* Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells / *A.M.C. Emons, H. Kieft* // *Plant Cell Rep.* – 1991. – Vol. 10. – P. 485–488.
12. *Green C.E.* Plant regeneration from tissue cultures of maize / *C.E. Green, R.L. Phillips* // *Crop Sci.* – 1975. – Vol. 15. – N 3. – P. 417–421.
13. *Kim H.A.* The development of herbicide-resistant maize: stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maize using explants of type II embryogenic calli / *H.A. Kim, S. D. Utomo, S. Y. Kwon et al.* // *Plant Biotechnology Reports*. – 2009. – Vol. 3. – N 4. – P. 277–283.
14. *McCain J.W.* Characterization of somatic embryo development and plant regeneration from friable maize callus culture / *J.W. McCain, K.K. Kamo, T.K. Hodges* // *Bot. Gaz.* – 1988. – Vol. 149. – N 1. – P. 16–20.
15. *Rakshit S.* Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds / *S. Rakshit, Z. Rashid, J. Sekhar et al.* // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2009, online – DOI 10.1007/s11240-009-9613-z.
16. *Xu Z.-Q.* 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.* // *Plant Biotechnology Reports*. – 2009, online – DOI 10.1007/s11033-009-9946-z.