

## ОЦІНКА РЕЦИПРОКНОГО ЕФЕКТУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* У ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

*Т. М. Сатарова*, доктор біологічних наук;

*К. В. Деркач<sup>1</sup>, О. Є. Абраїмова*

*Інститут зернового господарства НААН України*

*Охарактеризовано динаміку калусогенезу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер і їхніх реципрокних гібридів. Виявлено реципрокний ефект за ознаками «загальна частота калусогенезу» і «частота утворення морфогенних калусів», який зберігається протягом 60 діб культивування. Для отримання високої частоти морфогенного калусогенезу рекомендовано при створенні гібридів використовувати лінію ДК420-1 як материнську.*

**Ключові слова:** кукурудза, культура *in vitro*, реципрокний ефект, калусогенез, лінія.

Лінії зародкової плазми Ланкастер в основному належать до середньостиглої і середньопізньої груп стиглості [1; 2], проте вони широко використовуються для створення скоростиглих генотипів кукурудзи [2], у селекції на абіотичну стійкість [1; 3] та як донори високої комбінаційної здатності [1]. Лінії плазми Ланкастер слугують тестерами до гетерозисних груп Айодент, BSSS, інколи – Лакон [4; 5]. Для одержаних гібридів характерна неоднозначна реакція на середовище, що дає можливість отримувати генотипи з різним рівнем пластичності [6]. Відомо, що інбредні лінії плазми Ланкастер частіше використовують як чоловічу форму при створенні гібридів в зв'язку з їх схильністю до пошкодження шкідниками, ураження хворобами, особливо такими, як стеблова гниль, пухирчаста сажка, а також слабкою стійкістю стебла, низькою продуктивністю, проте зустрічаються і форми з високою стійкістю до вилягання та інших біотичних факторів [7].

Для прискорення і зменшення трудоемності селекційного процесу та розширення генетичного різноманіття вихідного селекційного матеріалу широкого використання набувають біотехнологічні методи. У зв'язку зі значною генотиповою реакцією зразків кукурудзи в культурі *in vitro* [8] необхідно мати характеристику окремих зародкових плазм, які використовуються в сучасному селекційному процесі за здатністю до калусогенезу та регенерації. Такий моніторинг дає можливість виявити найбільш чутливі зразки в кожній гетерозисній групі, ідентифікувати генотипи для модельного використання, виявити лінії, що здатні проявляти значний гетерозисний ефект в гібридах, визначити характер прояву реципрокного ефекту в гібридів тощо.

Реципрокний ефект – це наявність різниці у прояві ознаки між реципрокними гібридами, які отримують, коли міняються місцями батьківські компоненти схрещувань – з материнського на чоловічий і навпаки. Наявність реципрокного ефекту свідчить про неоднозначний вплив генотипу материнського та чоловічого компонентів схрещування на прояв ознаки у певного гібрида. Основна причина появи реципрокного ефекту пов'язана з материнським успадкуванням, зокрема з цитоплазматичною спадковістю. Як відомо, ДНК присутня не тільки в ядрі, а й в цитоплазмі, зокрема в таких органелах, як пластиди та мітохондрії. Оскільки чоловіча гамета (спермій) – бідноплазменна клітина, а жіноча гамета (яйцеклітина) є великою клітиною зі значною кількістю цитоплазми, то зародок містить лише ядерну ДНК спермія і ядерну та цитоплазматичну ДНК яйцеклітини.

В літературі є відомості про ембріогенний калусогенез ліній кукурудзи та їхніх реципрокних гібридів в культурі незрілих зародків [9]. Характеристика реципрокного ефекту подана відносно андрогенетичної чутливості пиляків кукурудзи [8]. Проте цілеспрямованих досліджень за такими ознаками, як морфогенний калусогенез, утворення калусів певних типів в культурі незрілих зародків генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер, не проводилось.

---

<sup>1</sup> Науковий керівник доктор біологічних наук Т. М. Сатарова.

Метою нашої роботи було дослідження калусогенного потенціалу у ліній підплазм Мо17 та Oh43 зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів.

Матеріалом для дослідження слугували дві перспективні у селекційному відношенні лінії кукурудзи зародкової плазми Ланкастер, які належать до різних підплазм: лінія ДК633 (підплазма Мо17) та лінія ДК420-1 (підплазма Oh43), а також їхні прямий і зворотний гібриди.

Донорні рослини вирощували в польових умовах згідно з методичними рекомендаціями по проведенню польових дослідів із кукурудзою [10]. Для індукції калусогенезу незрілі зародки довжиною 1–1,5 мм на 10-12 добу після штучного запилення експлантували щитком догори на живильне середовище N<sub>6</sub> (Chu, 1975) з додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 690 мг/л L-проліну, 60 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти. Культивування зародків проводили при 25–27°C, у темряві. Результати аналізували на 30-ту та 60-ту добу культивування.

Класифікація калусів прийнята нами згідно з С. Е. Green, Y. L. Phillips (1975). Калуси, що утворилися, розподіляли на морфогенні або неморфогенні. Серед морфогенних калусів розрізняли калуси типу I і типу II. До типу I належали калуси, що ростуть повільно, білі або жовті, щільні, компактні, швидко переходять до регенерації і не здатні до тривалої підтримки в культурі; до типу II – калуси зі швидким ростом, зовні м'які, крихкі, білі або блідо-жовті, часто прозорі, здатні до тривалої підтримки в культурі при регулярному пасивуванні на свіже живильне середовище.

Загальну частоту калусогенезу розраховували як процентне відношення кількості зародків, що утворили на щитку калус будь-якого типу, до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Частоту утворення морфогенних калусів, калусів типу I і типу II розраховували як процентне відношення кількості зародків з відповідним типом калусу до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Частоту спонтанної регенерації визначали як процентне відношення кількості культивованих зародків з калусами, які на індуктивному живильному середовищі були здатні утворювати пагони з клітин калусної тканини, до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Статистична обробка експериментальних даних виконана за методикою Г. Ф. Лакіна [11]. Дані в таблицях представлені у вигляді  $\bar{x} \pm mt_{0,05}$ , де  $\bar{x}$  – середнє арифметичне значення показника,  $m$  – похибка середнього арифметичного,  $t_{0,05}$  – критерій Ст'юдента при рівні значущості 0,05.

В таблиці 1 наведено частоту загального калусогенезу, частоту утворення морфогенних калусів, калусів типу I і типу II на 30-ту добу культивування.

Утворення калусів протягом першого місяця культивування спостерігалось у лінії ДК420-1 (підплазма Oh43) та прямого гібрида ДК420-1хДК633 – 94,1–95,5%. Для генотипів характерним було утворення морфогенного калусу, калусів типу I і типу II. Гібрид ДК420-1хДК633 утворював в основному калус типу I, тимчасом як лінія ДК420-1 – обидва типи калусів, але при цьому дещо переважали калуси типу II. Лінія ДК633 підплазми Мо17 та зворотний гібрид ДК633хДК420-1, де ця лінія слугувала материнською, до 30-ї доби культивування калуси не утворювали. Спонтанна регенерація форм, що утворювали калуси у перший місяць культивування, не спостерігалася.

### **1. Калусогенез в 30-добовій культурі незрілих зародків кукурудзи ліній зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів**

Генотип	Підплазма плазми Ланкастер	Кількість культивованих зародків, шт	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК420-1	Oh43	239	94,1 ± 3,0	59,4 ± 6,4	16,3 ± 4,8	43,1 ± 6,4

ДК633	Мо17	445	0	0	0	0
ДК420-1хДК633	Oh43, Мо17	134	95,5 ± 3,6	92,5 ± 4,6	91,8 ± 4,8	0,8 ± 1,5
ДК633хДК420-1	Мо17, Oh43	259	0	0	0	0

Отже, впродовж першого місяця культивування генотипів, що досліджувалися за здатністю до калусогенезу всіх типів, спостерігався чіткий реципрокний ефект. Гібрид з участю двох ліній стає позитивним до культивування лише при наявності чутливої лінії ДК420-1 як материнської. Якщо материнською формою є нечутлива лінія ДК633, то і гібрид ДК633х ДК420-1 виявляє негативну реакцію, незважаючи на те, що чоловіча лінія здатна до калусогенезу. Оскільки обрані лінії походять від певних підплазм зародкової плазми Ланкастер, зазначимо, що здатність до калусогенезу в гібрида з'являється, коли мате-ринською є лінія підплазми Oh43, і зникає – коли материнська лінія належить до підплазми Мо17. У гібрида ДК420-1хДК633 за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I спостерегається позитивний гетерозис.

Після аналізу на 30-ту добу від експлантації всі культивовані зародки були пересаджені на свіже живильне середовище того ж складу і культивувалися наступні 30 діб за ідентичних умов. У таблиці 2 наведено дані, що характеризують стан експлантів на 60-ту добу культивування. Всі показники розраховані відповідно до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу.

**2. Калусогенез в 60-добовій культурі незрілих зародків кукурудзи ліній зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів**

Генотип	Кількість культивованих зародків, шт	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК420-1	225	17,3 ± 5,1	17,3 ± 5,1	0
ДК633	363	10,2 ± 3,2	8,0 ± 2,9	2,2 ± 1,5
ДК420-1хДК633	128	91,4 ± 5,0	91,4 ± 5,0	0
ДК633хДК420-1	258	2,4 ± 1,9	2,4 ± 1,9	0

У лінії ДК420-1 в період з 30-тої по 60-ту добу культивування спостерігалось значне зниження морфогенного потенціалу калусів за рахунок переходу калусів типу II у неморфогенні. Разом з тим, частота утворення калусів типу I утримувалася на вихідному рівні. Калусогенний потенціал прямого гібрида ДК420-1хДК633 також зберігався. У цього гібрида, як і в перший місяць, переважно утворювався калус типу I та зберігався значний гетерозис за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I. Лінія ДК633 у перший місяць культивування була нечутливою, але впродовж наступних 30-ти діб сформувала морфогенні калуси – 10,2%. Формувалися калуси обох типів, переважно щільні, компактні (тип I). У зворотного гібрида ДК633хДК420-1 спостерігався слабкий морфогенний калусогенез (2,4%) типу I. З усіх генотипів, що досліджувалися, лише у лінії ДК633 на 60-ту добу культивування була відмічена спонтанна регенерація на рівні 0,55%.

Отже, протягом другого місяця культивування відбуваються суттєві зміни у зразків щодо калусогенезу. Нечутлива у перший місяць лінія ДК633 та гібрид, для якого вона є материнською, при більш тривалому культивуванні виявляють певну здатність до утворення морфогенних калусів. Тобто лінія ДК633 має слабшу здатність до калусогенезу, ніж ДК420-1 і проявляється вона значно повільніше. Разом з тим, характер прояву реципрокного ефекту в даній добірці генотипів, виявлений на 30-ту добу культивування, зберігається і в подальшому при культивуванні. На 60-ту добу культивування відмічався позитивний гетерозис у прямого гібрида та від'ємний гетерозис у зворотного гібрида за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I.

Загалом здатність до калусогенезу в кукурудзи, в тому числі і морфогенного, контролюється ядерними генами [12]. Разом з тим, дослідженнями В. Г. Чернишової [9] з впливу різних типів цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) на індукцію незрілими зародками кукурудзи ембріогенної калусної тканини *in vitro* виявлено, що цитоплазматичний фактор, що інгібує соматичний ембріогенез, пов'язаний з ЦЧС, але не залежить від її типу. У досліджених нами генотипів плазми Ланкастер реципрокний ефект спостерігався за відсутності ЦЧС і можливо пов'язаний з іншим цитоплазматичним чинником, який регулює калусогенез. Участь ядерних генів у визначенні здатності до морфогенного калусогенезу та калусогенезу типу I підтверджується в нашому дослідженні наявністю гетерозису за даними ознаками. Його прояв може забезпечуватися наддомінуванням типом взаємодії алельних генів та специфічними типами взаємодії неалельних генів.

Таким чином, у лінії зародкової плазми Ланкастер виявлено реципрокний ефект за здатністю до загального та морфогенного калусогенезу, зокрема утворення компактного ка-лусу типу I. Реципрокний ефект зберігається протягом тривалого періоду культивування. Для забезпечення високого рівня калусогенезу рекомендовано включати до складу гібридів донорну лінію ДК420-1 як материнський компонент.

### Бібліографічні посилання

1. *Дзюбецький Б. В.* Варіювання тривалості періоду «сходи – цвітіння жіночих суцвіть» залежно від умов року, строку сівби та генотипів батьківських форм гібрида / *Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, О. В. Воскобойник, О. О. Нетреба* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2009. – № 37. – С. 22–26.
2. *Олешко О. Г.* Оцінка нових самозапильних ліній кукурудзи, споріднених з генетичною плазмою Ланкастер / *О. Г. Олешко* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2003. – № 21–22. – С. 65–69.
3. *Боденко Н. А.* Добір та оцінка вихідного матеріалу на посухо- та жаростійкість для селекції середньостиглих гібридів кукурудзи: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція рослин» / *Н. А. Боденко*. – Дніпропетровськ, 2003. – 19 с.
4. *Дзюбецький Б. В.* Підбір тестерів для ліній плазми Лакауна в зв'язку з селекцією на адаптивність до умов Степу / *Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, М. Б. Грабовський* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2003. – № 21–22. – С. 24–27.
5. *Мустяца С. И.* Использование зародышевой плазмы гетерозисных групп BSSS, Рейд и Айодент в селекции скороспелой кукурузы / *С. И. Мустяца, С. И. Мистерец* // Кукуруза и сорго. – 2007. – № 6. – С. 8–12.
6. *Шевченко С. О.* Адаптивна здатність тесткросних гібридів, одержаних за участю нових ліній кукурудзи плазми Ланкастер / *С. О. Шевченко* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2007. – № 31–32. – С. 63–66.
7. *Гриднева Н. М.* Устойчивость линий кукурузы к стеблевым гнилям, ломкости стебля и пузырчатой головне / *Н. М. Гриднева* // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Краснодар. – 1999. – С. 92–96.
8. *Сатарова Т. М.* Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. доктора біол. наук: 03.00.20 / *Сатарова Тетяна Миколаївна*. – Дніпропетровськ, 2002. – 537 с.
9. *Чернышева В. Г.* Влияние ЦМС на индукцию эмбриогенной калусной ткани кукурузы / *В. Г. Чернышева, З. Б. Шамина* // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 8. – С. 1435–1439.
10. *Филев Д. С.* Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой / *Д. С. Филев, В. С. Циков, В. И. Золотов*. – 1980. – 54 с.
11. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / *Г. Ф. Лакин*. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
12. *Tomes D. T.* The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm / *D. T. Tomes, O. S. Smith* // *Theor. Appl. Genet.* – 1985. – Vol. 70, № 5. – P. 505–509.