

УДК 633.15:581.143.6

О. Є. Абраїмова, Г. Р. Піралов, Т. М. Сатарова

*Институт зернового господарства УААН
Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара*

БИОТЕХНОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ ПІД ВПЛИВОМ АБСЦИЗОВОЇ КИСЛОТИ ТА 6-БЕНЗИЛАМІНОПУРИНУ

Досліджено вплив абсцизової кислоти та 6-бензиламінопурину на утворення калусної тканини в культурі незрілих зародків кукурудзи. Для більшості досліджених генотипів абсцизова кислота в середовищі індукції стимулювала, а 6-бензиламінопурин інгібував утворення морфогенних калусів. Відмічено, що генотип виступає важливим фактором, який визначає характер дії фітогормонального складу середовища на утворення специфічних видів калусної тканини. Для застосування у біотехнологічних програмах отримання морфогенної калусної тканини рекомендоване використання залежно від генотипу 0,04–0,10 мг/л абсцизової кислоти на фоні базового живильного середовища.

О. Е. Абраимова, Г. Р. Пиралов, Т. М. Сатарова

*Институт зернового хозяйства УААН
Днепрпетровский национальный университет им. Олесь Гончара*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ И 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА

Исследовано влияние абсцизовой кислоты и 6-бензиламинопурина на образование калусной ткани в культуре незрелых зародышей кукурузы. Для большинства исследованных генотипов абсцизовая кислота в среде индукции стимулировала, а 6-бензиламинопурин ингибировал образование морфогенных калусов. Отмечено, что генотип выступает важнейшим фактором, определяющим характер действия фитогормонального состава среды на образование специфических видов калусной ткани. Для применения в биотехнологических программах получения морфогенной калусной ткани рекомендовано использование в зависимости от генотипа 0,04–0,10 мг/л абсцизовой кислоты на фоне базовой питательной среды.

О. Е. Abraimova, G. R. Piralov, T. M. Satarova

Institute of Grain Farming UAAN, Oles' Gonchar Dnipropetrovsk National University

BIOTECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF CALLUSOGENESIS IN MAIZE IMMATURE EMBRYO CULTURE UNDER THE INFLUENCE OF ABSCISIC ACID AND 6-BENZYLAMINOPURINE

The effect of abscisic acid and 6-benzylaminopurine on the induction of callus tissue in maize immature embryo culture was studied. For the majority of investigated genotypes abscisic acid stimulated, but 6-benzylaminopurine inhibited the formation of morphogenic calli in induction medium. It was noted that genotype appeared to be an important factor that determined the character of the influence of

phytohormonal composition of the medium on the induction of the specific types of calli. Using of 0.04-0.10 mg/l abscisic acid is recommended for biotechnological production of morphogenic callus tissue in dependence of donor plant genotype.

Вступ

Розробка технології отримання тотипотентних калусних культур для різних генотипів кукурудзи – важливе біотехнологічне завдання, оскільки калусна тканина становить основу для регенерації рослин і отримання соматоклонів, започаткування суспензійних культур, культур протопластів, проведення генетичної трансформації. Застосування ауксинів, зокрема 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти (2,4-Д), – обов'язкова умова отримання калусної тканини кукурудзи [5; 7; 10].

Відомості щодо дії інших класів фітогормонів на калусогенез у цієї рослини суперечливі. У ряді досліджень показано, що кінетин, зеатин і кокосове молоко не виявляють стимулювального впливу на калусоутворення [8; 9]. В інших випадках застосування цитокінінів, зокрема, 6-бензиламінопурину (6-БАП) поліпшувало калусогенез [1]. Вважають, що цитокініни по-різному впливають на такі різноспрямовані процеси як калусогенез і регенерація. Потрібно диференціювати характер їх впливу на ініціацію та розвиток калусів, соматичних зародків, органогенез, загальну регенерацію, укорінення. Це робить важливим з'ясування концентрації, експозиції та періоду застосування фітогормонів у технологічному циклі [4].

Встановлено, що вплив абсцизової кислоти (АБК) на підтримання ембріогенного калусу подібний до дії сахарози, яка стимулює накопичення крохмалю у соматичних ембріодах, а гіберелова кислота здатна нейтралізувати дію абсцизової кислоти [6]. Узагалі дія різних фітогормонів та їх поєднань на утворення калусів незрілими зародками кукурудзи досліджена недостатньо. Тому мало вивченими залишаються потенційні можливості їх залучення до біотехнологічних програм. У зв'язку з цим мета нашого дослідження – оцінити вплив таких фітогормонів як абсцизова кислота та 6-бензиламінопурин на калусогенез, оптимізувати біотехнологічний процес отримання калусної тканини в культурі незрілих зародків різних генотипів кукурудзи.

Матеріал і методи досліджень

Матеріалом для дослідження слугували незрілі зародки ліній, гібридів і популяцій кукурудзи, перспективних у селекційному відношенні. Експерименти проводили у 2008 та 2009 роках. Незрілі зародки відбирали з 3–7 польових донорних рослин, вирощених за загальноприйнятною методикою. Зародки у віці 10–12 діб після запилення довжиною 1,0–1,5 мм експлантували щитком догори на живильне середовище. Контрольним (К) для калусогенезу було модифіковане середовище №6 із додаванням 10 мг/л $AgNO_3$, 690 мг/л *L*-проліну, 100 мг/л мезоінозиту, 100 мг/л гідролізату казеїну, 20 г/л сахарози, 1 мг/л 2,4-Д. Дане середовище використане у попередніх дослідженнях і добре себе зарекомендувало для ініціації калусогенезу у кукурудзи [3].

В експерименті 2008 року до контрольного середовища додавали АБК у концентрації 0,04 мг/л, 6-БАП у концентрації 0,1 мг/л і випробовували поєднання цих фітогормонів у наведених концентраціях. В експерименті 2009 року до контрольного середовища додавали АБК у концентраціях 0,04 та 0,10 мг/л. Культивування проводили у темряві при температурі +26 °С.

Аналіз результатів індукції калусогенезу вели на 30-ту добу культивування. Частоту калусогенезу розраховували як процентне відношення зародків, що сформували той чи інший тип калусу, до загальної кількості культивованих зародків. Окремо визначали загальну частоту калусогенезу (%) і частоту утворення морфогенних калусів (%).

В експерименті 2009 року також оцінювали частоту утворення таких типів морфогенних калусів як компактні та крихкі. Дані в таблицях наведені у вигляді $M \pm m$ [2].

Результати та їх обговорення

У першому експерименті (2008 рік, табл. 1), на відміну від другого (2009 рік, табл. 2), вивчали калусоутворення на щитках незрілих зародків восьми ліній кукурудзи під впливом 0,04 мг/л АБК, 0,10 мг/л 6-БАП та їх поєднання.

Таблиця 1

Вплив абсцизової кислоти та 6-бензиламінопурину на калусогенез у кукурудзи

Лінія	Середовище	Культивовано зародків, шт.	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення морфогенних калусів, %
A188	К	216	98,6 ± 1,6	49,1 ± 6,8
	К + 0,04 мг/л АБК	230	97,8 ± 2,0	68,3 ± 6,2
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	224	97,8 ± 2,0	42,4 ± 6,6
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	221	97,3 ± 2,2	52,5 ± 6,8
ДК633	К	204	100,0 ± 0,0	14,7 ± 5,0
	К + 0,04 мг/л АБК	192	99,5 ± 1,0	17,7 ± 5,6
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	216	97,7 ± 2,0	13,4 ± 4,6
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	209	98,1 ± 1,8	27,3 ± 6,2
SS-566	К	86	43,0 ± 10,6	25,6 ± 9,4
	К + 0,04 мг/л АБК	87	47,1 ± 10,8	27,6 ± 9,6
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	86	47,7 ± 10,8	5,8 ± 5,0
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	87	43,7 ± 10,6	11,5 ± 6,8
SS-42	К	213	98,1 ± 1,8	59,6 ± 6,8
	К + 0,04 мг/л АБК	232	100,0 ± 0,0	62,5 ± 6,4
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	242	99,6 ± 0,8	69,8 ± 6,0
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	184	98,9 ± 1,6	83,7 ± 5,4
PLS61	К	221	100,0 ± 0,0	71,0 ± 6,2
	К + 0,04 мг/л АБК	159	100,0 ± 0,0	80,5 ± 6,2
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	165	100,0 ± 0,0	64,8 ± 7,4
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	208	100,0 ± 0,0	71,6 ± 6,2
ДК675	К	265	98,1 ± 1,6	19,2 ± 4,8
	К + 0,04 мг/л АБК	265	98,5 ± 1,4	23,0 ± 5,2
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	265	98,5 ± 1,4	24,9 ± 5,4
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	260	100,0 ± 0,0	34,2 ± 5,8
W38	К	130	98,5 ± 2,2	54,6 ± 8,8
	К + 0,04 мг/л АБК	125	98,4 ± 2,2	57,6 ± 8,8
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	135	98,5 ± 2,0	51,1 ± 8,6
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	130	97,7 ± 2,6	47,7 ± 8,8
Chi31	К	243	100,0 ± 0,0	92,2 ± 2,4
	К + 0,04 мг/л АБК	237	99,6 ± 0,8	89,5 ± 4,0
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	238	100,0 ± 0,0	41,2 ± 6,4
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	238	99,6 ± 0,8	55,0 ± 6,4
Всього	К	1578	96,0 ± 1,0	49,9 ± 2,6
	К + 0,04 мг/л АБК	1527	96,1 ± 1,0	54,6 ± 2,6
	К + 0,10 мг/л 6-БАП	1571	96,1 ± 1,0	40,6 ± 2,4
	К + 0,04 мг/л АБК + 0,10 мг/л 6-БАП	1537	95,8 ± 1,0	50,0 ± 2,6

Додавання досліджених фітогормонів і їх поєднання майже не впливало на загальну частоту калусоутворення, яка для всіх генотипів (окрім SS-566) сягала 97–100 %. Найцінніші для регенерації рослин – морфогенні калуси, частота утворення яких менша, ніж загальна частота калусогенезу. Вона значно коливалася між варіанта-

ми дослідів та у різних генотипів. Для більшості досліджених ліній спостерігалася тенденція підвищення частоти утворення морфогенних калусів при додаванні 0,04 мг/л АБК порівняно з контролем на 2,0–19,2 %. Додавання 6-БАП порівняно з контролем інгібувало утворення морфогенних калусів на 1,3–19,8 % для 6 з 8 досліджених ліній. Для двох ліній (SS-42 та ДК675) відмічена тенденція до стимуляції утворення морфогенних калусів на фоні 6-БАП.

Таблиця 2

Вплив абсцизової кислоти на частоту калусогенезу у різних генотипів кукурудзи

Генотип	Вміст АБК у середовищі, мг/л	Культивовано зародків, шт.	Загальна частота калусогенезу, %	Частота морфогенних калусів, %		
				всього	компактних	крихких
Chi31	0,00	240	100,0	59,6 ± 6,3	0,0	59,6 ± 6,3
	0,04	225	100,0	67,6 ± 6,2	0,0	67,6 ± 6,2
	0,10	250	100,0	66,4 ± 5,8	0,0	66,4 ± 5,8
ДК675	0,00	249	100,0	33,3 ± 6,0	0,0	33,3 ± 6,0
	0,04	247	100,0	34,8 ± 6,1	0,0	34,8 ± 6,1
	0,10	265	100,0	41,1 ± 6,0	0,0	41,1 ± 6,0
ДК675хChi31	0,00	220	100,0	71,8 ± 6,1	0,0	71,8 ± 6,1
	0,04	221	99,5 ± 0,8	76,5 ± 5,7	0,0	76,5 ± 5,7
	0,10	225	99,6 ± 0,7	72,9 ± 5,9	0,0	72,9 ± 5,9
Chi31хДК675	0,00	53	100,0	77,4 ± 11,5	0,0	77,4 ± 11,5
	0,04	53	100,0	77,4 ± 11,5	0,0	77,4 ± 11,5
	0,10	53	100,0	77,4 ± 11,5	0,0	77,4 ± 11,5
ДК377	0,00	240	100,0	17,9 ± 4,9	17,9 ± 4,9	0,0
	0,04	240	100,0	21,3 ± 5,3	21,3 ± 5,3	0,0
	0,10	240	100,0	20,4 ± 5,2	20,4 ± 5,2	0,0
ДК377 популяція	0,00	325	100,0	53,8 ± 5,5	53,8 ± 5,5	0,0
	0,04	325	100,0	55,7 ± 5,5	55,7 ± 5,5	0,0
	0,10	325	100,0	56,3 ± 5,5	56,3 ± 5,5	0,0
ДК185	0,00	203	100,0	3,0 ± 2,4	3,0 ± 2,4	0,0
	0,04	203	100,0	17,7 ± 5,4	17,7 ± 5,4	0,0
	0,10	228	100,0	9,2 ± 3,8	9,2 ± 3,8	0,0
ДК254	0,00	175	100,0	12,0 ± 4,9	12,0 ± 4,9	0,0
	0,04	175	100,0	16,6 ± 5,6	16,6 ± 5,6	0,0
	0,10	175	100,0	16,6 ± 5,6	16,6 ± 5,6	0,0
ДК185хДК254	0,00	225	100,0	12,4 ± 4,4	12,4 ± 4,4	0,0
	0,04	225	100,0	16,0 ± 4,9	16,0 ± 4,9	0,0
	0,10	225	100,0	15,1 ± 4,8	15,1 ± 4,8	0,0
ДК254хДК185	0,00	263	100,0	12,9 ± 4,1	12,9 ± 4,1	0,0
	0,04	263	100,0	24,3 ± 5,3	24,3 ± 5,3	0,0
	0,10	263	100,0	24,3 ± 5,3	24,3 ± 5,3	0,0
(ДК185хДК254)S ₃	0,00	452	99,6 ± 0,6	18,8 ± 3,7	18,8 ± 3,7	0,0
	0,04	435	100,0	28,7 ± 4,3	28,7 ± 4,3	0,0
	0,10	500	100,0	30,0 ± 4,1	30,0 ± 4,1	0,0
(ДК185хДК254) single seed	0,00	390	100,0	20,5 ± 4,1	20,5 ± 4,1	0,0
	0,04	375	100,0	26,1 ± 4,5	26,1 ± 4,5	0,0
	0,10	390	100,0	24,4 ± 4,3	24,4 ± 4,3	0,0

Калусогенез під впливом поєднання досліджених концентрацій абсцизової кислоти та 6-БАП вказує на провідну роль генотипу у визначенні синергічного або антагоністичного характеру одночасної дії двох фітогормонів. Морфогенні калуси утворю-

валися краще при поєднанні 6-БАП та АБК, ніж під впливом лише 6-БАП, але слабкіше, ніж на середовищі лише з абсцизовою кислотою.

Аналіз результатів проведеного експерименту дозволив виявити генотипні відмінності реакції незрілих зародків кукурудзи на дію досліджених фітогормонів та їх поєднання. Для індукції морфогенних калусів найкращий варіант із проаналізованих – додавання до контрольного середовища 0,04 мг/л абсцизової кислоти.

У наступному експерименті (2009 рік) досліджували вплив вищих концентрацій абсцизової кислоти на інтенсивність калусоутворення в культурі незрілих зародків. На 9 генотипах кукурудзи вивчали калусоутворення на контрольному середовищі К та експериментальних варіантах К + 0,04 мг/л АБК та К + 0,1 мг/л АБК (див. табл. 2).

Суттєвий позитивний вплив АБК в концентрації 0,04–0,10 мг/л на індукцію морфогенних калусів засвідчено для лінії ДК185 та гібридних комбінацій за її участю, ДК254хДК185 та (ДК254хДК185)S₃. Для значної решти досліджених генотипів наявна тенденція збільшення відсотка морфогенних калусів за дії АБК порівняно з контролем.

Здатність до підтримання в культурі *in vitro* та регенерації також суттєво залежить від структури морфогенного калусу. Компактні калуси легше переходять до регенерації, але важче підтримуються у культурі, крихкі калуси – навпаки. За дії АБК утворення компактної або крихкої морфогенної калусної тканини суто залежить від генотипу. Серед досліджених в експерименті 2009 року генотипи ДК377, ДК377 популяція, ДК185, ДК254, ДК185хДК254, ДК254хДК185, (ДК185хДК254)S₃ та (ДК185хДК254) single seed утворювали лише компактні калуси, а Chi31, ДК675, ДК675хChi31, Chi31хДК675 – лише крихку калусну тканину. Тип калусної тканини перш за все визначався калусогенною здатністю батьківських ліній і далі успадковувався у прямих і зворотних гібридах і популяціях за їх участю. Генетичний статус і ступінь гетерозиготності донорного матеріалу вносили зміни лише у кількісні показники утворення того чи іншого типу тканини.

Калуси досліджених генотипів кукурудзи, індуковані на фоні різного вмісту абсцизової кислоти, залишено для пасивування, отримання калусної тканини типу II та регенерації.

Висновки

Загальна частота калусогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи для всіх досліджених генотипів за винятком лінії SS-566 незалежно від складу живильного середовища склала 97–100 %. Встановлено, що на утворення морфогенної калусної тканини абсцизова кислота мала стимулювальний вплив. Додавання 6-БАП до середовища індукції для більшості досліджених генотипів інгібувало утворення морфогенних калусів. За поєднання 6-БАП і АБК спостерігався проміжний ступінь цього типу калусогенезу. Генотип виступає важливим фактором, що визначає характер впливу фітогормонального складу середовища на утворення специфічних видів калусної тканини. Для застосування у біотехнологічних програмах отримання морфогенної калусної тканини рекомендується використовувати залежно від генотипу донорної рослини 0,04–0,10 мг/л абсцизової кислоти на фоні базового живильного середовища, яке вміщує мінеральну основу N₆ із додаванням 10 мг/л AgNO₃, 690 мг/л L-проліну, 100 мг/л мезоінозиту, 100 мг/л гідролізату казеїну, 20 г/л сахарози та 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти.

Бібліографічні посилання

1. **Кунах В. А.** Получение каллусных тканей от разных по генотипу растений кукурузы / В. А. Кунах, Т. Н. Чеченева, В. В. Моргун // Физиология растений. – 1989. – Т. 27, № 2. – С. 399–403.
2. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. **Пиралов Г. Р.** Влияние биологических особенностей исходного материала и состава питательных сред на каллусогенез и регенерацию в культуре незрелых зародышей кукурузы / Г. Р. Пиралов, О. Е. Абраимова // Физиология и биохимия культурных растений. – 1997. – Т. 29, № 1. – С. 44–50.
4. **Чеченева Т. Н.** Повышение регенерационной способности у инбредных линий кукурузы *in vitro* / Т. Н. Чеченева, В. А. Труханов // Цитология и генетика. – 1997. – Т. 31, № 2. – С. 36–40.
5. **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.
6. **Emons A. M. C.** The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures / A. M. C. Emons, A. Samallo-Droppers, C. Van der Toor // J. Plant Physiol. – 1993. – Vol. 142. – P. 597–604.
7. **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.
8. **Hendre R. R.** Tissue cultures of maize, wheat, rice and sorghum / R. R. Hendre, A. F. Mascarenhas, P. Meera // Indian J. Exp. Biol. – 1975. – Vol. 13, N 2. – P. 108–111.
9. **Novack F. J.** Studies on the morphogenetic response of maize tissue cultures of different origin / F. J. Novack, Z. Opatrny, B. Povenska et al. // Biol. Plantarum. – 1979. – Vol. 21, N 6. – P. 418–426.
10. **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. – Vol. 100, N 1. – P. 31–37.

Надійшла до редакції 12.02. 2010