

УДК 581.5:470.44/47

О. В. Ляпустіна

Український державний хіміко-технологічний університет

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

З'ясовано можливість отримання життєздатних зародків повної зрілості в культурі ізольованих зернівок кукурудзи на штучному живильному середовищі в умовах *in vitro* від зиготи / проембрію та глобулярної стадії. Встановлено факт накопичення крохмалю в ендоспермі під час культивування на штучному живильному середовищі. Внутрішній стан зернівки може слугувати маркерною ознакою дозрівання зародків і накопичення крохмалю в ендоспермі незалежно від генотипу. Генотип, вік культивованих зернівок і концентрація сахарози впливають на розвиток ендосперму, накопичення у ньому крохмалю та дорощування зародків від зиготи / проембрію та глобулярної стадії.

Е. В. Ляпустина

Украинский государственный химико-технологический университет

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

Установлена возможность получения жизнеспособных зародышей полной спелости в культуре изолированных зерновок кукурузы на искусственной питательной среде в условиях *in vitro* от зиготы / проэмбрио и глобулярной стадии. Установлен факт накопления крахмала в эндосперме во время культивирования на искусственной питательной среде. Внутреннее состояние зерновки может служить маркерным признаком созревания зародышей и накопления крахмала в эндосперме, независимо от генотипа. Генотип, возраст культивированных зерновок и концентрация сахарозы влияют на развитие эндосперма, накопление в нем крахмала и доращивание зародышей от зиготы/проэмбрио и глобулярной стадии.

Е. V. Lyapustina

Ukrainian State University of Chemical Engineering

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

The investigation established the possibility of production of maize embryo in culture of isolated caryopsis on artificial nutrient medium *in vitro* conditions from a zygote / proembryo and globular stage up to the full maturity. It was determined that the cultivation of caryopsis on artificial nutrient medium provides the accumulation of starch in endosperm. The internal state of cultured caryopsis can be considered as a marker of embryo upgrowing and starch accumulation in endosperm, irrespective of the genotype. The genotype, the age of cultured caryopsis and concentration of sucrose influence on the development of endosperm, accumulation of starch in endosperm and embryo upgrowing from the zygote / proembryo and globular stage.

Вступ

Розвиток у культурі *in vitro* елементів чоловічої та жіночої генеративної сфери від ранніх етапів до зрілості, що передбачає культивування на штучних живильних середовищах – перспективний напрям моделювання та пояснення процесів регенерації рослин [9]. Поширені дослідження *in vitro* культур зигот, зародкових мішків і зародків [3]. Ці елементи становлять великий інтерес для широкого кола генетичних маніпуляцій: ізолювання гамет, їх злиття, дорощування отриманих зигот і ізолюваних зародкових мішків, що вміщують зиготу або проембрію, дорощування ізолюваних незрілих зародків. Процедура ізоляції елементів зернівки працезатратна, тривала, потребує застосування ферментів, що дають обмежені перспективи для використання досліджуваних об'єктів, через їх сумнівну життєздатність [1; 5; 16].

Умови під час культивування повинні максимально наблизитися до умов на рослині. Тому проводять культивування із частиною тканин материнського або батьківського організму для тривалого росту [6]. Умови розвитку ендосперму та зародків не збігаються, кожен із них потребує особливих умов культивування [4; 8]. У кукурудзи позитивні результати отримано при культивуванні запліднених зародкових мішків із тканинами нуцелусу, покривами насіння [1; 15]. Для тютюну, пшениці та рису використовували яйцеклітини під час культивування ізолюваних зигот [5; 14; 17].

Ізолювані зернівки – вдалий об'єкт дослідження факторів, що істотно впливають на регенераційні процеси рослин. З'ясуванню підлягають вплив генотипу та віку культивованих об'єктів, тривалість культивування, встановлення оптимальної концентрації вуглеводів і фітогормонів, необхідність застосування субкультури тощо. Культивування цілих зернівок дозволить детальніше вивчити фізіологію розвитку ендосперму, зародка та зернівки в цілому. Шляхами дослідження можуть бути ембріологічний і метаболічний напрями, тобто як з погляду формування та розвитку ендосперму, зародка, так і з погляду вуглеводного та азотного обміну речовин. Культура зернівок кукурудзи, ізолюваних від качана, в умовах *in vitro* донині не вивчалася. У культурі *in vitro* зернівки кукурудзи із сегментами качана були використанні у дослідженнях вуглеводного та білкового метаболізму [2; 12; 13]. В умовах *in vivo* в ізолюваних зернівках досліджено крохмале-ліпідний баланс [10].

Вибір живильного середовища досить важливий, він вказує на спроможність і компетентність системи *in vitro*. Середовище впливає на розвиток експлантатів, не тільки забезпечуючи умови для розвитку, а й діючи на можливість прискорення розвитку досліджених об'єктів. Базовим і універсальним середовищем для багатьох видів рослин різного віку, різного типу експлантатів є середовище Мурасиге – Скуга. Але універсальне не означає краще. Залишається проблема оптимізації живильного середовища для кожного виду рослин і для кожного випадку окремо.

Під час культивування ізолюваних об'єктів різних генотипів можуть бути відсутні відмінності відносно часу першого поділу зиготи, і на перший погляд вибрані генотипи мають рівні вірогідності розвитку. Але головна відмінність полягає у потенціалі зиготи при подальшому розвитку та утворенні багатоклітинних структур. Генотип впливає на можливість розвитку зиготи шляхом прямого ембріогенезу, утворення калусу або декількох зародків з однієї зиготи. Є свідчення про вплив генотипу на культуру зигот тютюну [5], рису [11], пшениці [7]. Незважаючи на наявність свідчень щодо важливості впливу генотипу в процесі культивування рослин, цьому питанню для кукурудзи було приділено недостатньо уваги. Вік культивованих об'єктів також має суттєвий вплив на подальший розвиток. Це може бути пов'язано з рівнями ендогенних гормонів, склад яких у різному

віці різний. У зв'язку з цим існує необхідність оптимізації складу живильного середовища відповідно до віку культивованого матеріалу та навпаки [1; 5].

Зважаючи на наведене вище, мета даної роботи – оцінити можливості зиготичного розвитку в культурі ізольованих зернівок кукурудзи *in vitro* та з'ясувати оптимальні умови для цього, встановити вплив генотипу та віку на розвиток складових елементів зернівки, концентрації вуглеводів і фітогормонів.

Матеріал і методи досліджень

Матеріал для дослідження – інбредна лінія кукурудзи ДК366, прості гібриди кукурудзи А22хДК307, ДК2/477-322хА22, ДК675хYuR75 та популяція ДК377. Для експлантації на живильне середовище використовували ізольовані зернівки у віці 1–3-ї та 5–7-ї доби після запилення. Качани без обгорток поверхово стерилізували у 70° етиловому спирті протягом 1–2 с і триразово промивали у стерильній дистильованій воді.

Основне індуктивне середовище у культурі зернівок – модифіковане живильне середовище NBM за R. Mol [8], яке вміщувало макросолі N₆, мікросолі B₅, 0,1 мг/л тіаміну гідрохлориду, 0,5 мг/л піридоксину гідрохлориду, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 7 г/л агару, 90, 120, 150 та 200 г/л сахарози та 1, 2 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП). Ізольовані зернівки культивували у чашках Петрі, у положенні зародком до середовища. Культивування проводили при температурі +26 °С у темряві. Розвиток зернівок і зародків *in vitro* оцінювали за такими показниками як довжина зернівки, зовнішній і внутрішній стан зернівки, наявність розвиненого ендосперму та зародка, правильність сформованих зародків, присутність крохмалю у ендоспермі. Для виявлення крохмалю використовували реактив Люголя. Зародки та зародкові мішки пророщували на середовищах: P₅ і P₆, що містили макро- та мікросолі MS у половинній концентрації, 0,1 мг/л тіаміну гідрохлориду, 0,5 мг/л піридоксину гідрохлориду, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 15 г/л сахарози, 50 мг/л мезоінозиту, 25 мг/л вітаміну C, 6 г/л агару, середовище P₆ додатково містило 2,5 г/л активованого вугілля.

Вплив генотипів на розвиток зернівок кукурудзи та їх складових від стадії зиготи / проембрію вивчали при культивуванні ізольованих зернівок генотипів ДК675хYuR75 та ДК377 у віці другої доби після запилення на середовищі NBM з 150 г/л сахарози та 1 мг/л БАП. Від глобулярної стадії зародка вивчали ізольовані зернівки генотипів ДК366, А22хДК307, ДК2/477-322хА22 у віці 5–7 діб після запилення під час культивування на середовищі NBM з 90 г/л сахарози та 1 мг/л БАП. Вплив віку культивованих об'єктів, концентрацій сахарози та 6-бензиламінопурину вивчали при культивуванні ізольованих зернівок кукурудзи гібриду ДК675хYuR75. Концентрацію сахарози досліджували на середовищі NBM з 1 мг/л БАП для зернівок у віці другої доби після запилення, концентрацію 6-бензиламінопурину – NBM з 150 г/л сахарози, для зернівок у віці третьої доби після запилення. Культивування для встановлення впливу віку зернівок проводили на середовищі NBM з 150 г/л сахарози та 1 мг/л БАП, для зернівок у віці першої–третьої доби після запилення.

Результати та їх обговорення

На момент експлантації довжина зернівки кукурудзи генотипів ДК675хYuR75, ДК377 у віці 1–3-ї доби після запилення та генотипів А22хДК307, ДК2/477-322хА22, ДК366 у віці 5–7 діб після запилення складала приблизно 2,0–3,0 та 4,5–5,0 мм відповідно. Досліджені зернівки належать до незрілих. На 1–3-ю добу після запилення зернівка містила зародковий мішок (рис. 1а, б), довжиною приблизно 0,1 мм, зиготу або проембрію та декілька ядер ендосперму. На 5–7-му добу після запилення зернівка вмі-

щувала зародковий мішок (рис. 1в, з) довжиною приблизно 1,2 мм і зародок – 0,1 мм. Зародок перебував на глобулярній стадії. Ендосперм у цей час перебуває у процесі клітиноутворення, крохмаль в ендоспермі відсутній.

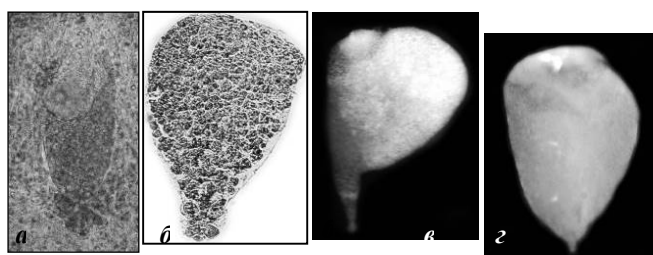


Рис. 1. Зародкові мішки кукурудзи: а – зародковий мішок на 1-шу добу після запилення; б – ізолюваний зародковий мішок на 3-тю добу після запилення; в – ізолюваний зародковий мішок на 5-у добу після запилення; з – ізолюваний зародковий мішок на 7-му добу після запилення; а, б – $\times 400$, в, з – $\times 64$

При культивуванні ізолюваних зернівок спостерігалось збільшення їх довжини, але достовірної різниці між різними генотипами не виявлено (табл. 1, 2). Це справедливо для культивування зернівок і від зиготи / проембрію, і від стадії глобулярного зародка. При культивуванні зернівок від стадії зиготи / проембрію, їх довжина на 50-ту добу збільшилася на 53,6 % для гібриду ДК675хYuR75 та на 54,8 % для популяції ДК377, порівняно з довжиною зернівки на момент експлантації (див. табл. 1). Зернівки від глобулярної стадії зародка зросли на 17 % для лінії ДК366, на 18 % – для гібриду А22хДК307 та на 22,4 % – для гібриду ДК2/477-322хА22 порівняно з довжиною зернівки на момент експлантації (див. табл. 1). Встановлена закономірність відповідає динаміці розвитку *in vivo*, але меншою мірою, оскільки зернівки у природних умовах виростають приблизно до 8 мм. Довжина зернівок досліджених генотипів на 27-му добу після запилення склала приблизно 8,4 мм.

Таблиця 1

Вплив генотипу на розвиток зернівок кукурудзи та їх складових від стадії зиготи / проембрію на 2-гу добу після запилення

Генотип	Вивчено зернівок, екз.	Довжина зернівки після культури, мм*	Частота зернівок (%), що містили			
			розвинений ендосперм із крохмалем	сформований зародок	сформований зародок правильної будови	життєздатний зародок
ДК675хYuR75	100	3,84 \pm 0,14	2,0	2,0	2,0	2,0
ДК377	61	3,87 \pm 0,20	0	0	–	–

Примітка: * – дані представлено у вигляді $x \pm m$.

Таблиця 2

Вплив генотипу на розвиток зернівок кукурудзи та їх складових від глобулярної стадії зародку на 5–7-му добу після запилення

Генотип	Вивчено зернівок, екз.	Довжина зернівки після культури, мм*	Частота зернівок (%), що містили			
			розвинений ендосперм із крохмалем	сформований зародок	сформований зародок правильної будови	життєздатний зародок
ДК366	149	5,95 \pm 0,17	14,1	11,4	8,1	7,3
А22хДК307	98	6,08 \pm 0,17	1,0	1,0	1,0	0
ДК2/477-322хА22	57	6,12 \pm 0,27	1,8	1,8	1,8	0

Примітка: див. табл. 1.

При культивуванні змінювався внутрішній стан зернівок. Зернівки, що містили сформовані зародки (із точками зростання стебла та кореня, із сформованим щитком) та крохмаль у ендоспермі, були із білою, виповненою, м'ясистою, щільною або білою висохлою внутрішністю (рис. 2а). Зернівки, що мали добре розвинені, міцні покриви та рідинне або драглисте наповнення, не накопичували крохмаль у ендоспермі та не містили розвинутого зародка (рис. 2б). Внутрішній стан зернівки може слугувати маркерною ознакою дозрівання зародків і накопичення крохмалю в ендоспермі під час культивування ізольованих зернівок.

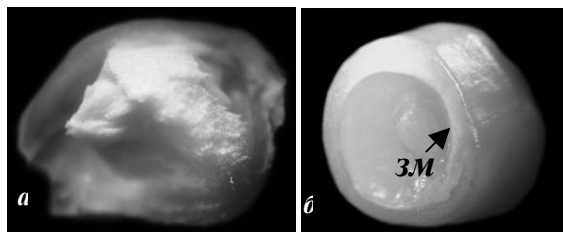


Рис. 2. Зернівка кукурудзи у розрізі після культивування *in vitro*: а – зернівка (поздовжній зріз), що містила розвинутий зародок та ендосперм; б – зернівка (поперечний зріз) із міцно розвинутими покривами, що містила нерозвинутий зародковий мішок; зм – зародковий мішок; оптичне збільшення $\times 32$

Дослідження впливу генотипу на розвиток ендосперму та накопичення у ньому крохмалю виявило стійку залежність від генотипу. Незрілі зернівки у віці 1–3-ї доби після запилення містили у зародковому мішку лише декілька ядер ендосперму. При наступному культивуванні спостерігався розвиток ендосперму (2%), що одночасно накопичував крохмаль, у одного з двох досліджених генотипів ДК675хYuR75 (див. табл. 1). Незрілі зернівки у віці 5–7-ї доби після запилення містили ендосперм, що закінчував процес клітиноутворення. У інбредної лінії ДК366 накопичення крохмалю після культивування йшло інтенсивніше (14,1%) порівняно з гібридами А22хДК307 та ДК2/477-322хА22, у яких лише одиничні зернівки накопичували крохмаль під час культивування (див. табл. 2).

Дозрівання зародків у культурі ізольованих зернівок кукурудзи також залежить від генотипу. Це справедливо для дозрівання зародків від зиготи / проембрію і від глобулярної стадії (див. табл. 1, 2). У ранньостиглої лінії ДК366 отримано 11,4% сформованих зародків, 70,6% з яких правильної будови (у тому числі зародок зі збільшеними точками зростання та зародок, що проріс у зернівці), що дали рослини при наступній регенерації (рис. 3а–в) (див. табл. 2). Інші зародки були сформовані, але не правильної будови (рис. 3г). Оцінка життєздатності виявила, що 64,3% зародків інбредної лінії, з усіх дозрілих, були життєздатними, тобто спроможними дати зелені пагони довжиною 1,5–13,5 мм і довжиною кореневої системи 0,2–10,5 мм (рис. 3г, д). У гібридів А22хДК307 та ДК2/477-322хА22 нормальні зародки отримано, але вони не проявили себе як життєздатні. Зародки, що перебували на глобулярній та перехідній стадії, при підрахунках не враховували. Довжина зародка після культивування склала 1,75–2,05 мм для інбредної лінії ДК366.

Під час культивування ізольованих зернівок у віці 1–3-ї доби після запилення відбувалося дозрівання зародків від стадії зиготи / проембрію (див. рис. 1а, б) до повністю зрілого сформованого стану (рис. 4а, б), що проросли у 2% зернівок гібриду ДК675хYuR75 (див. табл. 1). Проросток спрямований до середовища (рис. 4в), ззовні зернівки спостерігався отвір (рис. 4г).

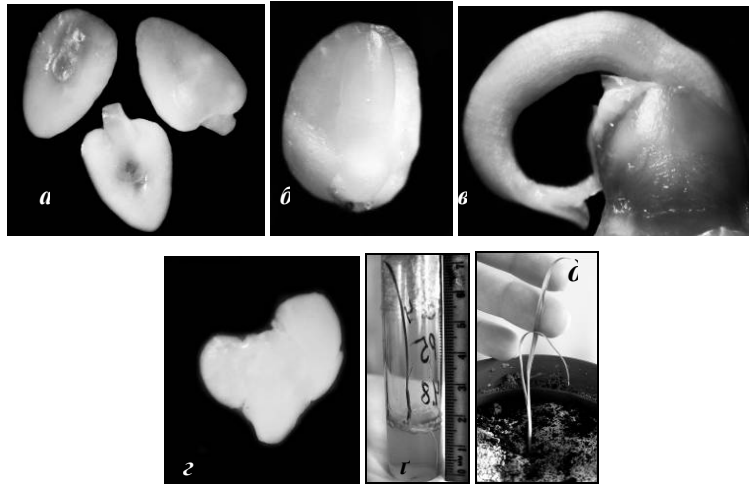


Рис. 3. Зародки кукурудзи та проростки з них після культивування *in vitro*:
a – сформовані зародки правильної будови; *б* – сформований зародок зі збільшеними точками зростання; *в* – зернівка, в якій проріс зародок; *г* – сформований зародок неправильної будови;
г – проросток на 14-у добу при регенерації ізольованих зародків;
д – проросток у ґрунті; *а, б, г* – $\times 64$, *в* – $\times 32$

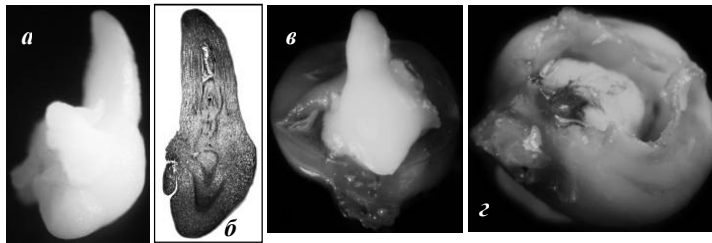


Рис. 4. Зародок та зернівка 2-ї доби після запилення, в якій він проріс до 50-ї доби культивування: *а* – зародок (живий), *б* – зародок (фіксований препарат),
в – зародок, що проріс у зернівці, спрямований до живильного середовища;
г – зернівка, в якій проріс зародок, мала отвір ззовні; *а, в, г* – $\times 32$, *б* – $\times 400$

Під час дослідження віку культивованих незрілих ізольованих зернівок відмічено тенденцію, що зернівки різного віку потребують різних умов культивування. Встановлено, що досліджені умови культивування (середовище NBM з 150 г/л сахарози та 1 мг/л БАП) однозначно не підходять для культивування зернівок у віці 1-ї доби після запилення, бо вони всі повністю луснули (рис. 5), не містили розвиненого ендосперму та зародка (табл. 3). Майже половина зернівок 3-ї доби також луснули, а зернівки 2-ї доби луснули лише у 9 % (див. табл. 3). Приблизно чверть досліджених зернівок кожного віку виявилися пустими та повністю висохлими після культивування (див. табл. 3). Достовірної різниці між довжиною зернівки 2 та 3-ї доби після культивування не виявлено (див. табл. 3). Зернівки 2 та 3-ї доби після запилення містили приблизно однакову кількість розвиненого ендосперму, що при цьому накопичив крохмаль (див. табл. 3). Зернівки 2-ї доби після запилення одночасно містили й розвинені зародки, що проросли у зернівках (див. табл. 3, рис. 4в), їх ендосперм був дещо більшого розміру (3,5 мм, на відміну від 2 мм ендосперму, який містили зернівки 3-ї доби після культивування).

Таким чином, вік і генотип досліджуваних ізольованих незрілих зернівок кукурудзи мають суттєвий вплив при культивуванні, з метою розвинення ендосперму та

зародків від стадії зиготи / проембрію. Це може бути пов'язано з різним рівнем ендогенних гормонів і генетичним потенціалом узагалі.

Таблиця 3

Вплив віку на культуру незрілих зернівок кукурудзи

Доба після запилення	Вивчено зернівок, екз.	Довжина зернівки після запилення, мм	Довжина зернівки після культури, мм*	Частота зернівок (%), що луснули	Частота зернівок (%), що були пусті	Частота зернівок (%), що містили розвинутий		
						ендосперм із крохмалем	зародок	зародок і ендосперм одночасно
1	15	2,0	–	100,0	26,7	0	0	–
2	100	2,5	3,84 ± 0,14	9,0	25,0	2,0	2,0	2,0
3	90	3,0	4,04 ± 0,21	42,2	27,8	2,2	0	–

Примітка: див. табл. 1.

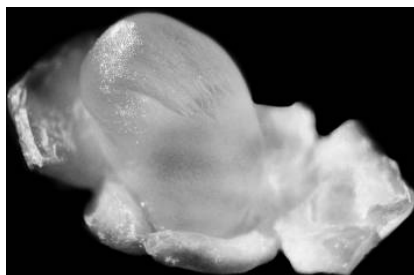


Рис. 5. Зернівка кукурудзи 1-ї доби після запилення, яка повністю луснула на 5-ту добу в культурі *in vitro*: × 32

Проведене дослідження впливу різної концентрації 6-бензиламінопурину на культуру незрілих зернівок *in vitro*. Розвиток зародка не спостерігався у жодному випадку. В обох випадках спостерігали розвиток ендосперму (2,2 % зернівок містили ендосперм розміром 2 мм, у якому накопичився при цьому крохмаль). Відносно кращих результатів вдалося добитися з концентрацією 6-бензиламінопурину в 1 мг/л, що забезпечила вдвічі меншу кількість пустих, усохлих зернівок (табл. 4). Таким чином, концентрація 6-бензиламінопурину 1 або 2 мг/л не суттєво впливає на формування ендосперму та дорозвинення зародків від стадії зиготи / проембрію.

Таблиця 4

Вплив концентрації 6-бензиламінопурину на культуру незрілих зернівок кукурудзи

Концентрація 6-бензиламінопурину, мг/л	Вивчено зернівок, екз.	Довжина зернівки після культури, мм*	Частота зернівок (%), що луснули	Частота зернівок (%), що були пусті	Частота зернівок (%), що містили розвинутий		
					ендосперм із крохмалем	зародок	зародок і ендосперм одночасно
1	45	3,80 ± 0,18	46,7	15,6	2,2	0	–
2	45	4,24 ± 0,29	37,8	40,0	2,2	0	–

Примітка: див. табл. 1.

Під час дослідження впливу концентрації сахарози відносно кращих результатів вдалося добитися із середньою концентрацією, оскільки дозрівання зародків (у 1,1 % зернівок) та утворення ендосперму (у 2,1 % зернівок) відбулося на середовищі із 150 г/л сахарози, розвиток ендосперму спостерігався також на середовищі із 120 г/л сахарози, але меншою мірою (табл. 5). На середовищі з 200 г/л сахарози не спостерігалось розвитку ні зародка, ні ендосперму. Кількість пустих, висохлих ізсередини

зернівок приблизно однакова для трьох досліджених концентрацій. Кількість луснутих зернівок і їх довжина зменшувалися зі зростанням концентрації (див. табл. 5). На середовищі із 200 г/л сахарози покрити були занадто товсті порівняно з іншими варіантами концентрацій сахарози. Таким чином, концентрація сахарози впливає на формування ендосперму та дорозвинення зародків від стадії зиготи / проембрію.

Таблиця 5

Вплив концентрації сахарози на культуру незрілих зернівок кукурудзи

Концентрація сахарози, мг/л	Вивчено зернівок, екз.	Довжина зернівки після культури, мм*	Частота зернівок (%), що луснули	Частота зернівок (%), що були пусті	Частота зернівок (%), що містили розвинутий		
					ендосперм із крохмалем	зародок	одночасно зародок і ендосперм
120	119	4,34 ± 0,21	52,1	30,3	0,8	0	–
150	190	3,92 ± 0,12	24,7	26,3	2,1	1,1	1,1
200	41	3,38 ± 0,14	4,9	24,4	0	0	–

Примітка: див табл. 1.

Із погляду на утрудненість ізоляції та роботи з елементами сім'язачатка кукурудзи альтернативою може бути проведення генетичних маніпуляцій у середині нього, без шкідливої ізоляції складових. Наступним етапом буде культивування цілих зернівок на живильному середовищі. Це дозволить максимально наблизитися до умов *in vivo* в культурі *in vitro*, бо усі процеси (формування та дозрівання зародка та ендосперму) будуть відбуватися глибоко зануреними у материнські тканини, як і на рослині. У даній роботі було максимально отримано 11,4 % зернівок із дозріванням зародків від глобулярної стадії до зрілого сформованого стану та 2 % – від зиготи / проембрію. Раніше 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 та починається диференціація органів зародка [1]. Ці відомості свідчать про необхідність подальшого дослідження ролі фітогормонів і, зокрема, ауксинів у формуванні органів зиготичного зародка кукурудзи. Існує потреба створення загальної технології зиготичного розвитку зародка за стадіями. Це передбачає індивідуальне визначення концентрації вуглеводів, фітогормонів і умов культивування взагалі для зиготи / проембрію, глобулярної, ранньої та пізньої перехідної стадій.

Висновки

Отримані дані свідчать про можливість дорощування та дозрівання зародків у культурі ізольованих зернівок кукурудзи та отримання життєздатних зародків, що дають міцні, добре розвинені зелені проростки. Встановлено факт накопичення крохмалю в ендоспермі під час культивування на штучному живильному середовищі. Внутрішній стан зернівки може слугувати маркерною ознакою дозрівання зародків і накопичення крохмалю в ендоспермі незалежно від генотипу. Встановлено вплив генотипу, віку культивованих незрілих зернівок і концентрації сахарози на розвиток ендосперму, накопичення у ньому крохмалю та дорощування зародків від зиготи / проембрію та глобулярної стадії. Не виявлено чітких закономірностей при застосуванні 1 та 2 мг/л 6-бензиламінопурина для культивування незрілих зернівок кукурудзи від зиготи / проембрію та глобулярної стадії.

Бібліографічні посилання

1. **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.
2. **Cobb B. G.** Sugar utilization by developing wild type and Shrunken-2 maize kernels / B. G. Cobb, L. C. Hannah // *Plant Physiol.* – 1986. – Vol. 80. – P. 609–611.
3. **Dumas C.** Fertilization and early seed formation / C. Dumas, P. Rogowsky // *Comptes Rendus Biologies.* – 2008. – Vol. 331, N 10. – P. 715–725.
4. **Hauptli H.** Maize *in vitro* pollination with single pollen grains / H. Hauptli, S. Williams // *Plant Science.* – 1988. – Vol. 58. – P. 231–237.
5. **He Y.** Regeneration of fertile plants from isolated tobacco zygotes by *in vitro* culture / Y. He, M. Sun, H. Yang // *Chinese Science Bulletin.* – 2004. – Vol. 49, N 8. – P. 810–814.
6. **Kranz E.** *In vitro* fertilization: Analysis of early post-fertilization development using cytological and molecular techniques / E. Kranz, S. Scholten // *Sex Plant Reprod.* – 2008. – Vol. 21. – P. 67–77.
7. **Kumlehn J.** Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants / J. Kumlehn, H. Lörz, E. Kranz // *Planta.* – 1998. – Vol. 205. – P. 327–333.
8. **Mol R.** Embryogenesis and plant regeneration from maize zygotes by *in vitro* culture of fertilized embryo sacs / R. Mol, E. Matthys-Rochon, C. Dumas // *Plant Cell Reports.* – 1995. – Vol. 14. – P. 743–774.
9. **Nagata T.** Molecular genetic approaches to maize improvement / T. Nagata, H. Lorz, M. Widholm. – Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2009. – 365 p.
10. **Positional cues** for the starch/lipid balance in maize kernels and resource partitioning to the embryo / H. Rolletschek, K. Koch, U. Wobus et al. // *The Plant Journal.* – 2005. – Vol. 42. – P. 69–83.
11. **Regeneration** of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*) / J. Zhang, W. H. Dong, A. Galli et al. // *Plant Cell Reports.* – 1999. – Vol. 19. – P. 128–132.
12. **Singletary G. W.** Nitrogen-induced changes in the growth and metabolism of developing maize kernels grown *in vitro* / G. W. Singletary, F. E. Below // *Plant Physiol.* – 1990. – Vol. 92. – P. 160–167.
13. **The effects** of modifying sucrose concentration on the development of maize kernels grown *in vitro* / B. G. Cobb, D. J. Hole, J. D. Smith et al. // *Annals of Botany.* – 1988. – Vol. 62. – P. 265–270.
14. **Uchiumi T.** Establishment of an *in vitro* fertilization system in rice (*Oryza sativa* L.) / T. Uchiumi, I. Uemura, T. Okamoto // *Planta.* – 2007. – Vol. 226. – P. 581–589.
15. **Zea mays** embryo sacs in culture. Plant regeneration from 1 day after pollination embryos / M. K. Campenot, G. Zhang, A. J. Culter et al. // *Amer. J. Bot.* – 1992. – Vol. 79. – P. 1368–1373.
16. **Zhao J.** Isolation and *in vitro* culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. / J. Zhao, C. Zhou, H. Y. Yang // *Plant Cell Reports.* – 2000. – Vol. 19. – P. 321–326.
17. **Zygote implantation** to cultured ovules leads to direct embryogenesis and plant regeneration of wheat / J. Kumlehn, R. Brettschneider, H. Lorz et al. // *Plant J.* – 1997. – Vol. 12. – P. 1473–1479.

Надійшла до редакції 26.01.2010