

УДК 581.143.6:633.15

ВПЛИВ ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ЗБЕРЕЖЕННЯ МОРФОГЕННОСТІ КАЛУСІВ КУКУРУДЗИ ЗА ТРИВАЛОГО КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO*

К.В. ДЕРКАЧ

О.Є. АБРАІМОВА

Т.М. САТАРОВА – доктор біол. наук, професор

ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН

Постановка проблеми. Використання калусних тканин сільськогосподарських рослин, в тому числі кукурудзи, має широкі можливості у селекційній науці і практиці. Калусні тканини використовують у генетичній трансформації, клітинній селекції, отриманні соматоклональних варіантів тощо.

При застосуванні системи *in vitro* у кукурудзи важливим є пошук чутливих до калусогенезу ліній, а також збереження їх морфогенного потенціалу і проліферативної активності *in vitro* з метою отримання рослин-регенерантів. Морфогенний потенціал ліній кукурудзи змінюється з року в рік і залежить від низки факторів: стану донорної рослини, типу, розміру, стадії розвитку і генотипу експланту [1-3]. Загалом, стрімке зниження морфогенності калусів, отриманих з незрілих зародків кукурудзи, спостерігається вже впродовж 30-60 діб культивування *in vitro* [4]. Проте відомо про калусну тканину, отриману з незрілих зародків кукурудзи, яка підтримувалась в культурі *in vitro* протягом п'яти років зі збереженням морфогенного потенціалу і проліферативної здатності [5].

Введення незрілих зародків кукурудзи в культуру *in vitro* припадає на липень-серпень. Індукція калусогенезу зазвичай триває приблизно 30 діб, в результаті чого формується калусна тканина. Індукція регенерації триває зазвичай 15-30 діб, в результаті чого утворюються рослини-регенеранти. Тривалість регенерації становить приблизно 1-4 місяці залежно від генотипу і складу регенераційного середовища. Тривале збереження (120 і більше діб) морфогенності субкультивованих калусів дозволяє отримувати рослини-регенеранти не у вересні-жовтні, а у лютому-березні, які після дорощування у біологічних склянках можуть бути висаджені у ґрунт в умови природних освітлення та температури. Це дозволить відмовитися від кошовного штучного клімату та убезпечить від негативних наслідків його використання (утворення частково чи повністю стерильних рослин-регенерантів, карликовість тощо).

Стан вивчення проблеми. Відомо, що використання антибіотику цефотаксиму (напівсинтетичного аналогу цефалоспорино) здатне стимулювати морфогенез, прискорювати диференціювання калусу, що дозволяє отримувати максимальну кількість рослин-регенерантів у короткий строк, проте не впливає на частоту індукції та активність росту ембріогенного калусу [6-7]. Манітол здатен збільшувати загальну частоту калусогенезу і ефективність субкультивування [8], сприяти утворенню морфогенної калусної тканини I типу в культурі незрілих зародків кукурудзи, проте негативно впливати на приріст сирої маси морфогенних калусів [9]. Вивчення впливу цих речовин (манітолу та цефотаксиму) проводилося на стадії індукції калусогенезу у обмеженого кола генотипів кукурудзи. Вплив на тривале (до 120 діб і більше) збереження морфогенності калусів ліній кукурудзи не проводилося.

Завдання і методика досліджень. Мета даної роботи – оцінка впливу фізіологічно активних речовин (манітолу та цефотаксиму) на збереження морфогенності калусів кукурудзи за тривалого субкультивування *in vitro*.

Об'єктом дослідження виступала калусна тканина комерційних ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер ДК633/266, ДК633/325, ДК212, ДК298 та модельних ліній PLS61, A188, Chi31. Експлантатами для отримання калусної тканини виступали незрілі зародки кукурудзи, довжиною 1-1,5 мм, отримані на 10-12-у добу після штучного запилення.

Для визначення впливу манітолу на субкультивування калусів 60-добова калусна тканина ліній ДК633/266 та Chi31 (табл. 1), отримана на модифікованому середовищі N₆ [4] (середовище К), висаджувалася на середовище такого ж складу, але з заміною 30 г/л сахарози в ньому на 20 г/л сахарози та додаванням 30 г/л манітолу (середовище М). Вплив манітолу на стан культивованих калусів досліджували протягом 60–90-а діб культивування з пересадкою на свіжі живильні середовища відповідного складу через кожні 15 діб. Для оцінки калусної культури використовували показник частоти збереження морфогенних калусів. На середовище з манітолом початково були висаджені лише неморфогенні калуси лінії Chi31.

Для визначення впливу цефотаксиму (Цт) на індукцію калусогенезу та подальше збереження морфогенності калусів індукцію калусогенезу проводили на середовищах з певним вмістом цієї речовини (150 чи 300 мг/л). Починаючи з 31-ї доби культивування *in vitro* цефотаксим виключали з живильного середовища. Вплив цефотаксиму середовища індукції калусогенезу на формування морфогенних калусів оцінювали на 30-у добу культивування *in vitro*. Для цього використовували показники частоти утворення морфогенних калусів, частоти утворення калусів I типу та II типу. Подальше збереження морфогенності калусів оцінювали на 60-, 90- та 120-у добу культивування *in vitro* із застосуванням показника частоти збереження морфогенних калусів.

Як контрольне в обох випадках використовували модифіковане середовище N₆ [4] (середовище К). Культивування проводили у темряві при 25-27°C.

Частоту утворення морфогенних калусів, калусів I (компактні, швидко переходять до регенерації, нездатні до тривалого культивування *in vitro*) та II (пухкі, здатні до тривалого підтримання в культурі *in vitro*) типів визначали як процентне відношення кількості зародків з певним типом реакції до загальної кількості культивованих зародків. Частоту збереження морфогенних калусів визначали як процентне відношення кількості морфогенних калусів до загальної кількості культивованих калусів. Статистичну обробку даних проводили згідно з [10]. Дані в таблицях представлені у вигляді $\bar{x} \pm m_{0,05}$, де \bar{x} – середнє арифметичне

значення показника, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05.

Результати досліджень. Вплив манітолу на субкультивування калусів представлено в таблиці 1. Впродовж культивування частота збереження морфогенних калусів у контролі знижувалася у обох досліджуваних ліній. Калуси темнішали, ставали обводненими і перетворювалися на суцільні аморфні структури без виділення будь-яких морфогенних структур. Час-

тота збереження морфогенних калусів, культивованих на середовищі з манітолом зростала за рахунок вторинного росту калусів. Вторинний ріст проявлявся у вигляді формування проліферуючих морфогенних структур на поверхні аморфних калусів. У лінії ДК633/266 частота збереження морфогенних калусів зростає з 13,89 до 88,89%, а у лінії Chi31 – з 0 до 46,34%.

Таблиця 1 – Вплив манітолу на субкультивування калусів ліній кукурудзи

Лінія	DIC*	Тривалість культивування на середовищі з манітолом, діб	Середовище субкультивування	Кількість культивованих калусів, шт.	Частота збереження морфогенних калусів, %
ДК633/266	60	-	К	135	81,48 ± 6,71
		0	М	180	13,89 ± 5,17
	75	-	К	135	74,07 ± 7,58
		15	М	180	43,89 ± 7,42
	90	-	К	135	58,52 ± 8,51
		30	М	180	88,89 ± 4,70
Chi31	60	-	К	125	58,40 ± 8,85
		0	М	82	0
	75	-	К	125	50,40 ± 8,98
		15	М	82	0
	90	-	К	125	44,80 ± 8,93
		30	М	82	46,34 ± 11,08

* – загальноприйняте позначення для показника «кількість діб культивування в культурі in vitro» (days in culture in vitro).

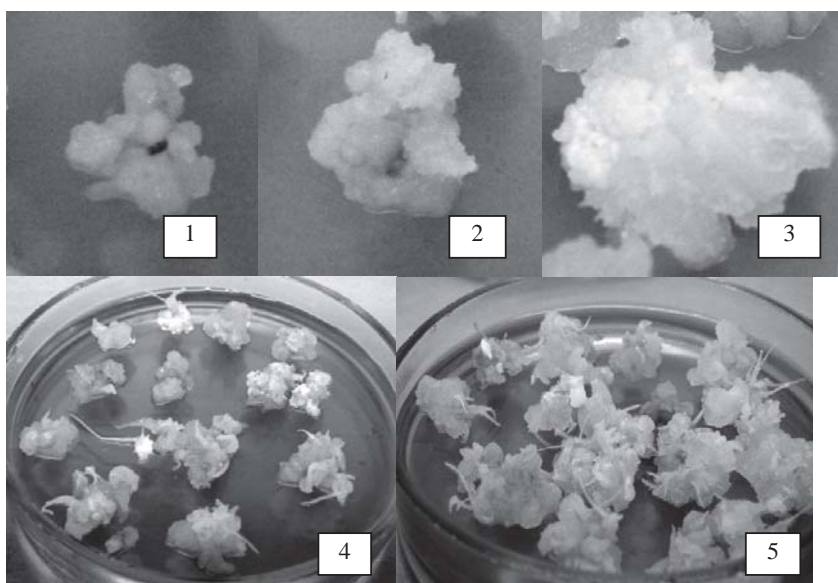


Рисунок. Вплив вмісту манітолу у середовищі індукції на морфогенність калусів лінії ДК633/266:
 1 – неморфогенний калус перед посадкою на середовище з манітолом (60 DIC);
 2 – вторинний ріст калусу після 15 діб на середовищі з манітолом (75 DIC);
 3 – калус II типу, який утворився після 30 діб культивування на середовищі з манітолом (90 DIC);
 4 – калуси, які протягом 60-90 DIC культивувались на середовищах з манітолом;
 5 – калуси, які протягом 60-90 DIC культивувались на середовищах без манітолу.

Вплив вмісту манітолу середовища субкультивування на морфогенність калусів лінії ДК633/266 представлено на рис. Присутність манітолу у середовищі культивування проважувало вторинний ріст неморфогенних калусів, стримуючи їх проліферацію.

Таким чином, додавання манітолу до середовища культивування стимулювало вторинний ріст морфогенних структур на поверхні аморфних калусів. Манітол підвищував ефективність субкультивування, сприяв за-

тримці старіння калусів, підтримував їх морфогенний потенціал. Разом з тим калуси, культивовані на середовищах з манітолом, відрізнялися меншими розмірами, у порівнянні з калусами, отриманими у контролі.

Цефотаксим впливав на частоту утворення морфогенних калусів залежно від генотипу (табл. 2). Підвищення значень частоти утворення морфогенних калусів під впливом 150 мг/л цефотаксиму середовища індукції калусогенезу спостерігалось лише у

лінії ДК633/325. У лінії ДК212 концентрація 150 мг/л цефотаксиму значно інгібувала утворення морфогенних калусів. Інші досліджені лінії характеризувалися відсутністю помітної реакції на даний антибіотик у концентрації 150 мг/л. Концентрація 300 мг/л цефо-

таксиму суттєво не збільшувала частоту утворення морфогенних калусів у жодній з ліній. Цефотаксим середовища культивування сприяв утворенню пухкої морфогенної тканини II типу.

Таблиця 2 – Вплив цефотаксиму на індукцію калусогенезу ліній кукурудзи (у 30- добовій культурі)

Лінія	Вміст Цт у середовищі індукції калусогенезу, мг/л	Кількість культивованих зародків, шт.	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів I типу, %	Частота утворення калусів II типу, %
ДК212	0	120	92,50 ± 4,83	0,83 ± 1,67	91,67 ± 5,07
	150	175	32,57 ± 7,11	0	32,57 ± 7,11
	300	150	78,00 ± 6,79	0	78,00 ± 6,79
ДК298	0	252	87,70 ± 4,15	50,79 ± 6,31	36,90 ± 6,09
	150	197	81,73 ± 5,52	26,40 ± 6,30	55,33 ± 7,10
	300	201	84,08 ± 5,17	41,29 ± 6,96	42,79 ± 7,00
ДК633/325	0	203	48,28 ± 7,03	33,50 ± 6,64	14,78 ± 4,99
	150	113	69,03 ± 8,74	8,85 ± 5,37	60,18 ± 9,25
	300	121	59,50 ± 8,96	13,22 ± 6,18	46,28 ± 9,10
PLS61	0	309	95,15 ± 2,45	94,17 ± 2,67	0,97 ± 2,67
	150	73	97,26 ± 3,85	30,14 ± 10,82	67,12 ± 11,07
	300	75	93,33 ± 5,80	49,33 ± 11,62	44,00 ± 11,54
A188	0	173	91,91 ± 4,16	43,93 ± 7,57	47,98 ± 7,62
	150	105	93,33 ± 4,89	25,71 ± 8,57	67,62 ± 9,18
	300	105	92,38 ± 5,20	22,86 ± 8,24	69,52 ± 9,03

Таким чином, для підвищення частоти утворення морфогенних калусів лінії ДК633/325 цефотаксим рекомендовано додавати до середовища індукції у концентрації 150 мг/л.

При подальшому культивуванні калусів, індукованих на середовищі з цефотаксимом, на середовищі без цієї речовини у деяких ліній ефект від цефотаксиму спостерігався у вигляді збереження морфогенності калусів (табл. 3). Тенденція до падіння значень частоти утворення морфогенних калусів спостерігалася як у контролі, так і на середовищах з цефотаксимом. Позитивний вплив цефотаксиму на субкультивування калусів відзначався у ліній ДК298, PLS61 та A188. У лінії PLS61 цефотаксим впливав на підтримання калусів I типу впродовж тривалого періоду культивування.

Згідно з [6], при культивуванні ліній A188 та R91 цефотаксим суттєво не впливав на долю незрілих зародків, які утворювали ембріогенний калус, а також на інтенсивність калусоутворення. Відзначалася відсутність позитивного впливу цефотаксиму на ріст калусів протягом шести досліджуваних пасажів.

Механізм дії цефотаксиму на калусну тканину остаточно не визначено. Найбільш вірогідним є розкладання цефотаксиму в процесі клітинного метаболізму на речовини, які володіють фітогормональною активністю [7].

Таким чином, вплив цефотаксиму на індукцію калусогенезу і субкультивування залежить від генотипових особливостей ліній. Для підвищення значень індукції морфогенного калусу на 30-у добу культивування додавання цефотаксиму у концентрації 150 мг/л до живильного середовища рекомендовано для ліній ДК633/325. З метою тривалого збереження морфогенності калусів індукцію калусогенезу рекомендовано проводити з додаванням цефотаксиму для ліній ДК298, A188 та PLS61.

Висновки та пропозиції. Здатність калусної тканини кукурудзи, отриманої з незрілих зародків, до

тривалого збереження морфогенного потенціалу в умовах *in vitro* генетично зумовлена і може в певній мірі контролюватися компонентами живильного середовища. Манітол провокував вторинний ріст морфогенної калусної тканини на неморфогенних аморфних калусах, хоча дещо стримував проліферативну активність калусів. Для підтримання морфогенності калусної тканини ліній кукурудзи ДК633/266 та Chi31 рекомендовано використання манітолу. Цефотаксим у концентрації 150 чи 300 мг/л (залежно від генотипу лінії) позитивно впливав на індукцію морфогенних калусів та подальше збереження її при тривалому культивуванні *in vitro*. Для підвищення частоти індукції морфогенних калусів лінії ДК633/325 рекомендовано використовувати 150 мг/л цефотаксиму у середовищі індукції калусогенезу. Для підвищення частоти збереження морфогенних калусів ліній ДК298 та A188 рекомендовано використовувати 300 мг/л цефотаксиму у середовищі індукції калусогенезу. Для ліній PLS61 150 мг/л цефотаксиму забезпечують високі показники як частоти утворення, так і частоти збереження морфогенних калусів.

Перспектива подальших досліджень. Можна зазначити, що використання манітолу та цефотаксиму як фізіологічно активних речовин повинно розширити коло генотипів кукурудзи, здатних до тривалого культивування *in vitro*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Сатарова Т.Н. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии: [монография] / Т.Н. Сатарова, В.Ю. Черчель, А.В. Черенков. – Днепропетровск: Новая идеология, 2013. – 552 с.
2. Aguado-Santacruz G.A. *In vitro* plant regeneration from quality protein maize (QPM) / G.A. Aguado-Santacruz, E. García-Moya, J.L. Aguilar-Acuña et al. // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2007. – №43. – P.215–224.

Таблиця 3 – Динаміка калусогенезу під впливом цефотаксиму

Лінія	Вміст Цт у середовищі індукції калусогенезу, мг/л	Тривалість культивування, діб	Кількість культивованих калусів, шт.	Частота збереження морфогенних калусів, %
ДК212	0	60	36	38,89 ± 16,48
	150	60	50	0
	300	60	50	0
ДК298	0	60	175	19,43 ± 6,00
		90	175	9,14 ± 4,37
		120	175	8,57 ± 4,24
	150	60	197	8,63 ± 4,01
		90	197	3,55 ± 2,64
		120	197	3,55 ± 2,64
	300	60	201	15,92 ± 5,17
		90	201	14,93 ± 5,04
		120	201	13,43 ± 4,82
ДК633/325	0	60	50	16,00 ± 10,47
		90	50	14,00 ± 9,91
		120	50	8,00 ± 7,75
	150	60	113	7,08 ± 4,85
		90	113	4,42 ± 3,89
		120	113	4,42 ± 3,89
	300	60	121	11,57 ± 5,84
		90	121	7,44 ± 4,79
		120	-	-
PLS61	0	60	183	20,22 ± 5,95
		90	183	18,03 ± 5,70
		120	183	18,03 ± 5,70
	150	60	73	68,49 ± 10,95
		90	73	68,49 ± 10,95
		120	73	68,49 ± 10,95
	300	60	75	66,67 ± 10,96
		90	75	65,33 ± 11,06
		120	75	65,33 ± 11,06
A188	0	60	75	34,67 ± 11,06
		90	75	16,00 ± 8,52
		120	75	16,00 ± 8,52
	150	60	105	50,48 ± 9,81
		90	105	32,38 ± 9,18
		120	105	26,67 ± 8,67
	300	60	105	37,14 ± 9,48
		90	105	31,43 ± 9,10
		120	105	31,43 ± 9,10

- Green C.E. Plant regeneration from tissues cultures of maize / C.E. Green, H.L. Phillips // Crop Science. – 1975. – 15 (5). – P.417–421.
- Деркач К.В. Динаміка калусогенезу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер / К.В. Деркач // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2012. – Вип. 3, т. 1. – С.24–28.
- Пиралов Г.Р. Особенности роста и дифференциации длительно пассируемой каллюсной культуры линии кукурузы ДК675 / Г.Р. Пиралов, О.Е. Абраимова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2000. – Т.35, №5. – С.372–376.
- Данилова С.А. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима / С.А. Данилова, Ю.И. Долгих // Физиология растений. – 2004. – Т.51, №4. – С.621–625.
- Дубровна О.В. Вплив цефотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці / О.В. Дубровна, А.В. Бавол, М.О. Зінченко та ін. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2012. – Т.44, №3. – С.218–224.
- 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.
- Абраимова О.Е. Вплив манітолу на індукцію морфогенного калусогенезу в культурі *in vitro* у кукурудзи / О.Е. Абраимова, К.В. Деркач, Н.М. Черноусова, Т.М. Сатарова // Modern biotechnology of agricultural plant and biosafety: Abstracts of international scientific conference (September 7-10, 2010). – Odessa. – 2010. – P.73.
- Атраментова Л.О. Статистичні методи в біології / Л.О. Атраментова, О.М. Утэвська. – Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна. – 2007. – 288с.