

УДК 581.143.6:633.15

К. В. Деркач*, Г. С. Крупська**, О. Є. Абраїмова*, Т. М. Сатарова***

**Інститут сільського господарства степової зони НААН України*

***Дніпропетровський національний університет ім. Олеса Гончара*

****Український державний хіміко-технологічний університет*

ВПЛИВ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА РОЗВИТОК ТА ПРОРОСТАННЯ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Досліджено вплив мінеральної основи живильного середовища та абсцизової кислоти на ізолювані незрілі зародки кукурудзи з метою інтенсифікації їх росту та стримування передчасного проростання. Абсцизова кислота (АБК) на фоні середовища MS викликала затримку як розвитку проростків, так і зародка. Застосування АБК на фоні солей N_6 стримувало розвиток органів проростка на користь росту самого зародка. Для дорощування незрілих зародків кукурудзи довжиною 1 мм із наступним отриманням проростків рекомендується їх культивування на модифікованому середовищі N_6 із додаванням 12 мг/л абсцизової кислоти.

К. В. Деркач*, Г. С. Крупская**, О. Е. Абраимова*, Т. Н. Сатарова***

**Институт сельского хозяйства степной зоны НААН Украины*

***Днепропетровский национальный университет им. Олеса Гончара*

****Украинский государственный химико-технологический университет*

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РАЗВИТИЕ И ПРОРАСТАНИЕ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Исследовано влияние минеральной основы питательной среды и абсцизовой кислоты на изолированные незрелые зародыши кукурузы с целью интенсификации их роста и сдерживания преждевременного прорастания. Абсцизовая кислота (АБК) на фоне среды MS приводила к задержке как развития проростков, так и зародыша. Использование АБК на фоне солей N_6 сдерживало развитие органов проростка в пользу роста самого зародыша. Для дорастивания незрелых зародышей кукурузы длиной 1 мм с последующим получением проростков рекомендуется их культивирование на модифицированной среде N_6 с добавлением 12 мг/л абсцизовой кислоты.

K. V. Derkach*, G. S. Krupskaya**, O. E. Abramova*, T. M. Satarova***

**Institute of Steppe Zone Agriculture of NAAS of Ukraine*

***Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University*

****Ukrainian State University of Chemistry and Technology*

EFFECT OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON THE DEVELOPMENT AND GERMINATION OF MAIZE IMMATURE EMBRYOS IN *IN VITRO* CULTURE

The effect of mineral components of nutrient medium and abscisic acid (ABA) on isolated immature maize embryos is investigated with the aim to intensify their growth and to inhibit their early germination.

Abscisic acid together with MS medium leads to the stasis of the development of both seedlings and embryos. The application of ABA along with N_6 minerals inhibited the development of seedling's organs in favour of embryos growth. For production of seedlings from immature embryos of 1 mm long their cultivation on modified N_6 medium with addition of 12 mg/L of abscisic acid is recommended.

Вступ

У біотехнології рослин існують декілька напрямів, у яких використовується отримання проростків із незрілих зиготичних або соматичних зародків. Зокрема, у кукурудзи при отриманні додаткових генерацій на рік для скорочення селекційного процесу пророщують 20-добові зиготичні зародки довжиною 4-5 мм. Такі зародки не повністю зрілі, але міцні та здатні до формування міцних, добре розвинених проростків, які добре переносять пересадку у ґрунт [4]. Відомо, що при запиленні та заплідненні в культурі *in vitro*, при дорошуванні ізольованих зернівок і запліднених зародкових мішків зиготичні зародки виростають лише до 3 мм і після цього спонтанно починають проростати [9]. Соматичні зародки, які формуються в культурі калусних тканин і в культурі пиляків кукурудзи, часто бувають дуже дрібними за розміром. Такі зародки, досягнувши критичних розмірів 1–3 мм, не розвиваються далі шляхом накопичення маси зародка та збільшення його лінійних розмірів, а починають проростати [3]. Зазначимо, що у кукурудзи зиготичний зародок у зрілому стані має довжину 6–7 мм. Раннє проростання дрібних зародків, на противагу дозріванню, викликає появу слабких проростків, які важко приживлюються у ґрунті.

Мета нашої роботи – розробити склад живильного середовища для затримання передчасного проростання ізольованих незрілих зиготичних зародків кукурудзи, їх росту та можливості подальшого формування проростків із нормально розвиненими пагонами та корінцями. Для досягнення цієї мети дослідили реакцію незрілих зародків на склад мінеральних компонентів живильного середовища ($MS-N_6$) та використовували абсцизову кислоту (АБК), яка відома як регулятор стану спокою у рослин [1; 5].

Матеріал і методи досліджень

У роботі використано гібрид кукурудзи ДК675хYur75, люб'язно наданий відділом селекції Інституту сільського господарства степової зони НААН України. Донорні рослини вирощували в польових умовах за загальноприйнятою методикою польового дослідження [6]. У період викидання волотей і качанів проводили ізоляцію та штучне запилення рослин із використанням паперових ізоляторів. На 12-ту добу після запилення качани видаляли з рослин і переносили до лабораторії. Для проведення експериментів використовували ізольовані незрілі зародки віком 12 діб після запилення. Ізольовані зернівки стерилізували насиченим розчином хлорного вапна та промивали п'ять разів стерильною дистильованою водою. У стерильних умовах ламінар-боксів незрілі зародки видаляли та експлантували на живильні середовища зародковою віссю догори, щитком до середовища. В одному з варіантів дослідження качани на 12-ту добу після запилення витримували перед експлантацією зародків протягом доби за температури +5...+7 °C.

Культивування незрілих зародків проводили на модифікованих живильних середовищах MS та N_6 , до складу яких входили макро- та мікросолі MS за [8] або N_6 за [7], 0,1 мг/л тіаміну, 0,5 мг/л піридоксину, 0,5 мг/л нікотинової кислоти, 2 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 6 % сахарози, 8 г/л агару. Залежно від варіанта дослідження до середовища додавали 12 мг/л АБК (табл. 1). Як бачимо, середовища MS та N_6 розрізняються за вмістом деяких макро- та мікроелементів. Середовище N_6 містить порівняно з MS більше калію та фосфору, менше загального нітрогену (як із нітратних,

так і з амонійних груп), кальцію та магнію. Суттєво різняться ці середовища складом мікроелементів.

Культивування проводили за температури +27 °С, перші 7 діб у темряві, останні – при 16-годинному фотоперіоді за інтенсивності освітлення 5 тис. люкс. Культивування зародків тривало 13 діб. Після закінчення терміну культивування визначали довжину зародка, яку вимірювали по щитку, частку пророслих зародків (%) і частку зародків, що сформували калус (%).

Таблиця 1

Склад живильних середовищ, використаних для культивування ізольованих незрілих зародків кукурудзи

Речовина	Вміст речовини у середовищі, мг/л			
	MSмод.	N ₆ мод.	MSмод. + 12 мг/л АБК	N ₆ мод. + 12 мг/л АБК
Калію нітрат	1900,0	2830,0	1900,0	2830,0
Амонію сульфат	–	463,0	–	463,0
Амонію нітрат	1650,0	–	1650,0	–
Кальцію хлорид двоводний	440,0	166,0	440,0	166,0
Калію дигідрофосфат	170,0	400,0	170,0	400,0
Магнію сульфат семиводний	370,0	185,0	370,0	185,0
Марганцю сульфат чотириводний	22,3	4,4	22,3	4,4
Цинку сульфат семиводний	8,6	1,5	8,6	1,5
Борна кислота	6,2	1,6	6,2	1,6
Кобальту хлорид шестиводний	0,025	–	0,025	–
Міді сульфат п'ятиводний	0,025	–	0,025	–
Натрію молібдат двоводний	0,25	–	0,25	–
Калію йодид	0,83	0,80	0,83	0,80
Заліза сульфат семиводний	27,80	27,80	27,80	27,80
Натрій-EDTA	37,30	37,50	37,30	37,50
Тіамін гідрохлорид	0,1	0,1	0,1	0,1
Піридоксин гідрохлорид	0,5	0,5	0,5	0,5
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5	0,5
6-бензиламінопурин	2	2	2	2
Сахароза	60000	60000	60000	60000
Абсцизова кислота	–	–	12	12
Агар	8000	8000	8000	8000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

Статистична обробка даних проведена за Г. Ф. Лакіним [2]. Дані в таблицях представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного за рівня значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

При культивуванні протягом 13 діб спостерігали реакцію незрілих зародків (табл. 2) у вигляді росту, проростання, формування пагона та кореневої системи та, інколи, калусогенезу. Проростання зародків на середовищах MSмод. та N₆мод. починалося на першу добу культивування. Початок проростання зародків у варіантах з АБК відбувався на три доби пізніше, ніж у контрольних варіантах, незалежно від мінеральної основи середовища. Після третьої доби культивування зародки у варіантах з АБК починали повільно проростати.

При культивуванні лінійні розміри зародків, зокрема довжина щитка, зросли від вихідних 0,98 до 1,55–1,79 мм залежно від варіанта живильного середовища. Певна

тенденція до стримування росту щитка проявилася під впливом АБК на фоні неорганічних компонентів MS (див. табл. 2). Проростання зародків відбувалося на рівні 57–93 % залежно від варіанта досліду. Проявилася тенденція до певного зниження проценту пророслих зародків під впливом абсцизової кислоти. Поодинокі випадки калусоутворення відмічені на середовищах, які за мінеральну основу мали солі MS.

Таблиця 2

Вплив складу живильного середовища на ізолювані незрілі зародки кукурудзи

Середовище	Експлантовано зародків, шт.	Довжина зародка, мм	Частка пророслих зародків, %	Частка зародків, що сформували калус, %
На момент експлантації	–	0,98 ± 0,13	0	0
MSмод.	28	1,75 ± 0,16	93	4
N ₆ мод.	24	1,79 ± 0,23	75	0
Середнє	–	1,77 ± 0,08	84,0 ± 10,2	2
MSмод. + 12 мг/л АБК	23	1,55 ± 0,15	87	4
N ₆ мод. + 12 мг/л АБК	23	1,78 ± 0,16	57	0
Середнє	–	1,67 ± 0,06	72,0 ± 13,2	2

Використання солей N₆ замість MS у варіантах без АБК визначає тенденцію до стримування росту пагона та кореневої системи (табл. 3). На фоні дії АБК при використанні солей N₆ порівняно з MS проявилася слабка тенденція до збільшення довжини пагонів і коренів.

Таблиця 3

Вплив складу живильного середовища на морфобіологічні показники проростків з ізолюваних незрілих зародків кукурудзи

Середовище	Експлантовано зародків, шт.	Довжина пагона, мм	Довжина кореневої системи, мм
MSмод.	28	15,5 ± 3,5	6,2 ± 2,8
N ₆ мод.	24	12,4 ± 2,2	4,8 ± 1,5
Середнє	–	14,0 ± 1,2	5,5 ± 0,9
MSмод. + 12 мг/л АБК	23	5,5 ± 1,7	1,8 ± 0,2
N ₆ мод. + 12 мг/л АБК	23	6,1 ± 1,6	2,1 ± 1,1
Середнє	–	5,8 ± 0,7	2,0 ± 0,3

Як зазначалося раніше, додавання 12 мг/л АБК стримувало початок проростання зародків на три доби. На 13-ту добу від експлантації ізолюваних зародків абсцизова кислота на фоні середовища MS викликала різке стримування росту проростків одночасно з тенденцією до затримування росту зародка (див. табл. 2). Застосування АБК на фоні солей N₆ також обмежувало розвиток органів проростка, але не пригнічувало ріст самого зародка (табл. 2). Можна припустити, що при цьому частина пластичних речовин, які надходять із живильного середовища, використовувалася не на розвиток пагонів і коренів, а на дозрівання самого зародка, зокрема на ріст щитка. Після 13-ї доби від експлантації зародків, на яку проводився аналіз, проростки на середовищах з АБК продовжували активно розвиватися і на 21–24-ту добу наближалися до контрольних проростків за довжиною пагона та коренів, були добре розвиненими та готовими до пересадки у ґрунт.

Таким чином, варіантом середовища, на якому відбувається затримування проростання незрілого зародка на користь його росту, є варіант N₆мод. + 12 мг/л АБК.

Як один із варіантів затримування передчасного проростання ізолюваних незрілих зародків задля їх переважного росту та отримання міцніших проростків роз-

глядали витримування качанів протягом однієї доби при температурі +5...+7 °С. Відмічено, що за період такої холодової передобробки довжина зародків збільшилася з 1 до 1,7 мм. Наступне культивування на зазначених середовищах дозволило отримати міцніші зародки та, одночасно, окремі міцні проростки. Однак холодова передобробка різко збільшувала утворення калусів як на зародковій осі, так і на абаксальній поверхні щитка. У результаті отримані проростки дуже варіювали за розмірами через те, що зародки, на яких утворювалися калуси, формували пригнічені проростки з розміром пагона 1–2 мм, часто без корінців. Із цих причин ми відмовилися від використання у майбутньому холодової передобробки.

Висновки

Реакція незрілих зародків кукурудзи на культивування *in vitro* проявляється у вигляді росту зародка, його проростання та, інколи, калусогенезу. Початок проростання зародків на фоні абсцизової кислоти відбувається на три доби пізніше, ніж у контрольних варіантах, незалежно від мінеральної основи середовища. На середовищах, які мали за мінеральну основу солі MS, відмічено поодинокі випадки калусоутворення. Абсцизова кислота на фоні середовища MS спричинювала різке пригнічення розвитку проростків і тенденцію до стримування росту зародка. Застосування АБК на фоні солей N_6 стримувало розвиток органів проростка, але не пригнічувало ріст самого зародка. Проростки на середовищах з АБК до 21–24-ї доби наближалися до контрольних проростків довжиною пагона та коренів. Холодова передобробка протягом доби різко збільшувала утворення калусів як на зародковій осі, так і на абаксальній поверхні щитка. Для отримання проростків із незрілих зародків довжиною близько 1 мм в біотехнологічних програмах рекомендується їх культивування та пророщування на модифікованому середовищі N_6 із додаванням 12 мг/л абсцизової кислоти.

Бібліографічні посилання

1. **Калинин Ф. Л.** Биологически активные вещества в растениеводстве. – К. : Наук. думка, 1984. – 388 с.
2. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
3. **Сатарова Т. М.** Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.20 – біотехнологія. – К., 2003. – 40 с.
4. **Сатарова Т. Н.** Влияние различных факторов на эмбриокультуру кукурузы // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 4. – С. 51–53.
5. **Сатарова Т. Н.** Реакция незрелых зародышей кукурузы в культуре *in vitro* на длительное воздействие холода / Т. Н. Сатарова, Д. Е. Струнин, П. Н. Галушак // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2007. – Вип. 15, № 3/1. – С. 150–155.
6. **Филев Д. С.** Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой / Д. С. Филев, В. С. Циков, В. И. Золотов. – 1980. – 54 с.
7. **Establishment** of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources / C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun et al. // Sci. Sinica. – 1975. – N 18. – P. 659–668.
8. **Murashige T.** A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – N 15. – P. 473–497.
9. **Satarova T. N.** The development of isolated maize caryopses *in vitro* / T. N. Satarova, O. V. Lyapustina // Maize Gen. Coop. Newslett. – 2010. – Vol. 48. – P. 15–17.

Надійшла до редакції 31.01.2011