

ГЕНЕТИКА, ЦИТОЛОГИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 58.085

КУЛЬТУРА ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ДИПЛОИДНЫХ И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

Т. А. Алаторцева, А. Ю. Колесова

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
E-mail: AlatortsevaTA@mail.ru, kolesovaau@yandex.ru*

Представлены результаты культивирования зрелых зародышей диплоидных и тетраплоидных форм кукурузы. Испытано 9 вариантов питательной среды с разным количеством ауксина 2,4-Д и сахарозы. Показана возможность создания морфогенных каллусных штаммов от доноров с предрасположенностью к партеногенезу *in vivo*.

Ключевые слова: кукуруза, зрелые зародыши, эмбриогенный каллус, диплоидные и тетраплоидные формы.

MATURE EMBRYO CULTURE DIPLOID AND TETRAPLOID FORMS OF MAIZE

T. A. Alatortseva, A. Yu. Kolesova

The results of the culture of mature embryos of diploid and tetraploid forms of maize are presented. The 9 variants of culture medium with different amounts of 2,4-

D and sucrose are tested. The possibility of creating morphogenic callus strains from donors with a predisposition to parthenogenesis *in vivo*.

Key words: maize, mature embryo, embryogenic callus, diploid and tetraploid forms.

Большой проблемой, сдерживающей активное использование методов клеточной инженерии в селекции злаков, является сравнительно низкий уровень регенерации растений (Jia et al., 2008). Практически ценные линии и гибриды кукурузы не всегда удаётся воспроизвести в культуре *in vitro* (Хиккадуве, 1994; Алаторцева, Тырнов, 2000, 2008а, б, в; Ляпустина, 2010). В связи с этим необходим поиск форм-доноров с высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом, сохраняющих это качество при гибридизации с другими более ценными сортами.

Как показали наши исследования, в качестве претендентов на донорство могут быть рассмотрены линии кукурузы, имеющие предрасположенность к партеногенезу *in vivo* и обладающие морфогенетической активностью *in vitro*. Исходя из этого цель настоящей работы заключалась в изучении возможности использования культуры зрелых зародышей апо- и амфимиктичных форм кукурузы для получения регенерационно-способных каллусных штаммов разной ploidy (2n и 4n).

Материал и методика

Материалом исследования являлись линии и формы кукурузы:

АТ-1 – диплоидная партеногенетическая линия, имеет склонность к автономному развитию яйцеклетки при задержке опыления (Тырнов, 2002);

Крп-1 (Краснодарская популяция-1) – тетраплоидная форма, получена в Краснодарском НИИ сельского хозяйства;

№ 562 и № 556 – тетраплоидные формы, склонные к партеногенезу. Получены в результате гибридизации тетраплоидных растений Крп-1 и диплоидной линии АТ-1.

Эксплантами служили зрелые зародыши кукурузы, выделенные из сухих зерновок, предварительно обработанных стерилизующими растворами этанола и «Белизны». Изолированные зародыши помещали на поверхность питательной среды щитком вниз и культивировали в темноте при температуре 25±2°C. Питательная среда содержала макро- и микроэлементы МС, витамины, агар-агар, а также в различных сочетаниях сахарозу и ауксин 2,4-Д. Всего 9 вариантов сред. рН среды доводили раствором NaOH до уровня 5.8–6.1.

Результаты и их обсуждение

Наблюдение за эксплантами показало, что их морфогенетическая активность *in vitro* зависит как от генотипических особенностей доноров (склонности последних к апо- или амфимиксису), так и от состава питательной среды. Культивируемые зародыши всех донорных форм были способны к прорастанию и формированию растений, которые в зависимости от наличия или отсутствия в среде 2,4-Д развивались, соответственно, без корней или с корнями (рис. 1).

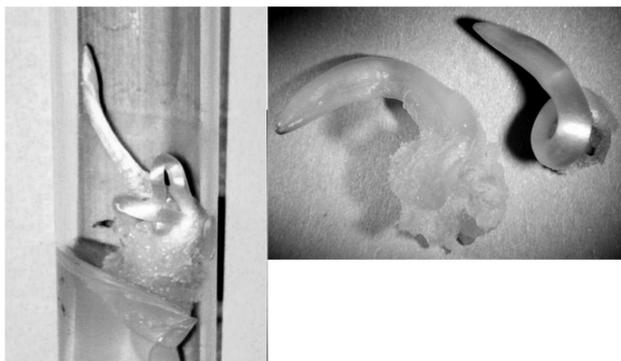


Рис. 1. Прорастание зародышей на питательной среде, содержащей 2,4-Д

Проростки, возникшие на среде с 2,4-Д, продуцировали каллус. Его образование начиналось с глобулярных структур, которые далее трансформировались в каллус ризогенного типа или морфогенный, образующий эмбриониды (рис. 2). Последний был отмечен только у линий и форм с предрасположенностью к партеногенезу (АТ-1; № 562 и № 556).

Сравнение результатов культивирования эксплантов с учётом названных параметров выявило некоторые различия в величине показателей у диплоидной и тетраплоидной форм. У диплоидной линии АТ-1 (табл. 1) частота появления глобулярных структур варьировала от 3,8% (на среде № 7) до 37,7% (на среде № 2), а частота образования морфогенного каллуса – от 0% на безгормональных средах (№ 1, 4, 7) до 5,1–9,9% на средах с 2,4-Д (№ 2, 3, 5, 6, 8, 9), между которыми не оказалось достоверных различий. Здесь же в исходном пассаже можно было наблюдать регенерацию растений из эмбрионидов морфогенного каллуса.

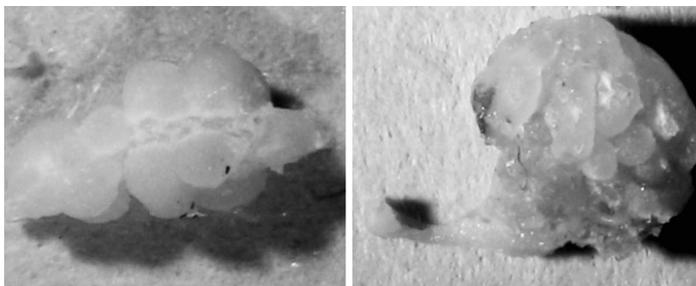


Рис. 2. Формирование морфогенного каллуса в культуре зрелых зародышей кукурузы

У тетраплоидных форм № 562 и № 556 (табл. 2) данные по каллусогенезу оказались выше, однако регенерация в исходном пассаже не наблюдалась. Так, у формы № 562 частота образования глобул колебалась от 0% (среды № 1 и 7) до 37,0% (среда № 3), а у формы № 556 – от 3,8% (среда № 1) до 47,1% (среды № 3 и № 4). Морфогенный каллус у формы № 562 был отмечен с частотой от 0% (среды № 1 и 7) до 23,8% (среда № 8), у формы № 556 – от 0% (среды № 1 и 7) до 21,8% (среда № 9).

Статистическая обработка результатов показала, что для тетраплоидов № 562 и № 556 равнозначно благоприятными для индукции морфогенного или эмбриодогенного каллуса (ЭГК) являются среды, включающие ауксин 2,4-Д, с различными концентрациями сахарозы. Безгормональные варианты неперспективны для морфогенеза.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что в данном случае морфогенетическая активность, свойственная линии АТ-1, сохраняется и у её тетраплоидных гибридов с амфимиктичными линиями. Есть основания полагать, что гибридные формы, сочетающие в себе ценные селекционные качества и высокий морфогенетический потенциал *in vitro*, могут использоваться для создания регенерационных каллусных штаммов.

Выводы

1. Среди 9 изученных генотипических форм кукурузы тенденция к регенерации растений *in vitro* была выявлена только в культуре зародышей доноров с предрасположенностью к партеногенезу *in vivo*.

Таблица 1

Результаты культивирования зрелых зародышей диплоидной линии АГ-1

Генотип донора	Признак	Компоненты питательной среды, № варианта								
		сахароза, 2,0%		сахароза, 4,0%		сахароза, 6,0 %				
		2,4-Д, мг/л	2,4-Д, мг/л	2,4-Д, мг/л	2,4-Д, мг/л	2,4-Д, мг/л	2,4-Д, мг/л			
	0	2,0	3,0	0	2,0	3,0	0	2,0	3,0	
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	
		Частота встречаемости признака, %								
АГ-1	Проростки без корней	1,3	78,3	80	5,0	85,3	56,8	3,8	63,6	75,3
	Проростки с корнями	68,4	0,0	1,2	73,8	0,0	4,1	76,3	1,3	3,7
	Непроросшие зародыши	30,4	21,7	18,8	21,3	14,7	39,2	20,0	35,1	21,0
	Глобулы	8,9	37,7	35,3	10,0	13,3	6,8	3,8	11,7	13,6
	ЭГК	0	5,8	8,2	0,0	5,3	8,1	0,0	5,1	9,9
	Регенеранты	0	4,3	7,1	0,0	3,5	8,1	0,0	5,1	8,6

Таблица 2

Результаты культивирования зрелых зародышей тетраплоидных линий

Генотип донора	Признак	Компоненты питательной среды, № варианта										
		сахароза, 2,0%			сахароза, 4,0%			сахароза, 6,0 %				
		2,4-Д, мг/л	№ 2	№ 3	2,4-Д, мг/л	№ 4	№ 5	2,4-Д, мг/л	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
		0	2,0	3,0	0	2,0	3,0	0	2,0	0	2,0	3,0
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9	№ 8	№ 9
		Частота встречаемости признака, %										
№ 562	Проростки без корней	2,5	85,9	86,4	86,4	77,1	85,2	6,3	81,0	83,7		
	Проростки с корнями	90,1	5,1	1,2	1,2	7,2	4,9	85	4,8	5,8		
	Непроросшие зародыши	7,4	9,0	12,3	12,3	15,7	12,3	8,8	14,3	10,5		
	Глобулы	0	15,4	24,7	24,7	33,7	37,0	0	22,6	17,4		
	ЭГК	0	20,5	17,3	17,3	19,3	22,2	0	23,8	20,9		
№ 556	Проростки без корней	9,0	91,5	80,9	80,9	83,8	88,6	3,7	86,0	87,2		
	Проростки с корнями	79,5	2,8	1,5	1,5	3,8	0	82,7	1,2	1,3		
	Непроросшие зародыши	11,5	5,6	17,6	17,6	12,5	11,4	14,8	12,8	11,5		
	Глобулы	3,8	22,5	47,1	47,1	16,3	11,4	8,6	12,8	15,4		
	ЭГК	0	4,2	16,2	16,2	16,3	13,9	0	17,4	21,8		
Крп-1	Проростки без корней	2,9	83,1	15,2	15,2	84,0	84,4	3,6	84,8	86,0		
	Проростки с корнями	90	4,2	5,1	5,1	1,2	1,3	86,7	5,1	3,5		
	Непроросшие зародыши	7,1	18,3	24,1	24,1	14,8	15,6	9,6	10,1	10,5		
	Глобулы	0	5,6	7,6	7,6	6,2	7,8	8,4	6,3	9,3		
	ЭГК	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

2. Эффект культивирования зависит от наличия в среде ауксина 2,4-Д.

3. В присутствии ауксина 2,4-Д у апомиктичных ди- и тетраплоидных форм обычно происходит блокирование корнеобразования, замедленное развитие побега и образование морфогенного каллуса (ЭГК) через формирование глобулярных структур.

4. В равной степени благоприятными для индукции морфогенеза для эксплантов разной пloidности являются среды № 2, № 3, № 5, № 6, № 8 и № 9.

5. Использование в качестве эксплантов зрелых зародышей апомиктичных ди- и тетраплоидных форм кукурузы позволяет получать морфогенные регенерационноспособные каллусные штаммы соответствующей пloidности.

Список литературы

Алаторцева Т. А., Тырнов В. С. Разработка методов клонирования *in vitro* гаплоидных и диплоидных форм кукурузы // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии : материалы II междунар. науч. конф. М., 2000. С. 171–172.

Алаторцева Т. А., Тырнов В. С. Влияние питательной среды и генотипа на морфогенез в культуре зрелых зародышей кукурузы // Бюл. Бот. сада Саратов. ун-та. 2008а. Вып. 7. С. 179–183.

Алаторцева Т. А., Тырнов В. С. Культура *in vitro* партеногенетических зародышей кукурузы // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : тез. IX междунар. конф. Звенигород, 2008б. С. 10.

Алаторцева Т. А., Тырнов В. С. Новообразование и регенерация в культуре зрелых зародышей кукурузы // Факторы экспериментальной эволюции организмов : в 5 т. Киев, 2008в. Т. 5. С. 245–248.

Ляпустина О. В. Культура ізольованих зернівок як біотехнологічна система дорощування зиготичних зародків кукурудзи *in vitro* // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Медицина. 2010. Вип. 18, т. 2. С. 49–57.

Тырнов В. С. Гаплоидия и апомиксис // Репродуктивная биология, генетика и селекция : сб. науч. тр., посвящ. 90-летию со дня рожд. проф. С. С. Хохлова. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2002. С. 32–46.

Хиккадуве В. С. Регуляция морфогенеза в культуре ткани кукурузы *in vitro* : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1994. 20 с.

Lia X. X., Zhang J. W., Wang H. N., Kong W. P. Efficient Maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro* // Maydica. 2008. Vol. 53. P. 239–248.