

УДК 575.1:581.143

Т. Н. Сатарова, Д. Е. Струнин, П. Н. Галушак

*Днепропетровский национальный университет, Институт зернового хозяйства УААН,
Украинский государственный химико-технологический университет*

РЕАКЦИЯ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА ДЛИТЕЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДА

Вивчено вплив тривалої дії низької позитивної температури на ізольовані незрілі зародки різних генотипів кукурудзи при їх зберіганні в умовах *in vitro*. Показано можливість одержання життєздатних зелених проростків після тримісячного зберігання зародків на холоді. Порівнюється здатність до проростання за даних умов зародків ліній та гібридів F_2 . Розглядаються перспективи подальших досліджень для з'ясування умов ефективного зберігання ізольованих незрілих зародків і отримання з них життєздатних проростків.

The influence of the long-term effect of low positive temperature on isolated immature embryos of different maize genotypes during their *in vitro* maintenance was studied. The possibility of obtaining vigorous green seedlings after 3-month cold storage of embryos was shown. The abilities of embryos of different lines and F_2 hybrids to germinate under the given conditions are compared. Perspectives of further investigations to ascertain the conditions of effective maintenance of isolated maize immature embryos and further obtaining vigorous seedlings are discussed.

Введение

Развитие биотехнологии отдельных сельскохозяйственных культур, в том числе и кукурузы, направлено на совершенствование скорости и результативности селекционного процесса. Современный этап селекции кукурузы отличается высокой интенсивностью и быстрой сменой гибридов, предлагаемых производству. В связи с этим на первый план выходит необходимость разработки методов, которые давали бы возможность сократить время проведения отдельных этапов селекционного процесса, таких, например, как перевод линий на цитоплазматическую мужскую стерильность, создание закрепителей стерильности и восстановителей фертильности, проведение отборов на фоне влияния стрессовых факторов и других.

Работа в этом направлении с группами линий и гибридов, различающихся по длине вегетационного периода, а также получение дополнительных генераций в течение года зачастую требует сохранения незрелого селекционного материала до следующего вегетационного периода в жизнеспособном состоянии. Одним из подходов, позволяющих сохранить незрелый селекционный материал, может стать хранение незрелых зародышей на холоде с последующим их проращиванием перед посевом следующего года. В связи с этим требуют детального исследования характер и направленность процессов покоя, дозревания, сохранения жизнеспособности и прорастания зародышей различного возраста в условиях *in vitro*, а также возможности регуляции этих процессов в нормальных и стрессовых условиях.

В литературе рассматривается развитие зародышей кукурузы в условиях *in vitro*, начиная с самых ранних этапов развития [5–7], достаточно подробно изучено прорастание зародышей поздних этапов формирования, в том числе и для использования в биотехнологиях сокращения периода выращивания позднеспелых селекционных форм и перевода линий на цитоплазматическую мужскую стерильность [2–4]. Влияние же на незрелые зародыши в условиях *in vitro* стрессовых факторов, в частности холода, с целью их хранения и последующего проращивания, особенности проведения отборов в таких условиях ранее не изучались.

© Т. Н. Сатарова, Д. Е. Струнин, П. Н. Галушак, 2007

150

Цель данного исследования – определить возможности длительного хранения незрелых зародышей кукурузы при низких положительных температурах, проращивания после снятия действия холода и получения жизнеспособных проростков, описать направления исследований в области сохранения незрелого селекционного материала и вовлечения его в процесс отбора.

Материал и методы исследований

В работе использованы линии и гибриды кукурузы, которые, по данным полевой оценки, проведенной Институтом зернового хозяйства УААН, характеризуются как холодостойкие (линии ДК205/710 и 276-1, гибрид МО425610), среднехолодостойкие (гибрид МО425596) и нехолодостойкие (линия ДК303/427, гибрид МО425599). Семена этих генотипов любезно предоставлены заведующим лабораторией селекции ранне-спелых гибридов кукурузы Института зернового хозяйства УААН, кандидатом сельскохозяйственных наук В. Ю. Черчелем.

Донорные растения линий и гибридов F_1 выращивали в полевых условиях. Для проведения экспериментов использовали незрелые зародыши, полученные от искусственного самоопыления. Таким образом, зародыши имели либо генотип исходной линии, либо генотип гибрида F_2 . Початки отбирали на 20-е сутки после опыления, когда зародыши имели длину 6,5–7,0 мм. Зерновки стерилизовали, зародыши изолировали и эксплантировали на искусственную питательную среду MSзар щитком вниз, к среде. Питательная среда содержала макро- и микросоли MS, 0,25 мг/л тиамин, 0,25 мг/л пиридоксин, 1,30 мг/л никотиновой кислоты, 0,25 мг/л пантотената Ca, 7,70 мг/л глицина, 30 г/л сахарозы, 5 г/л активированного угля, 8 г/л агара. Эксплантацию проводили в культуральные стаканы высотой 20 см и диаметром 4 см, по четыре зародыша на стакан.

Зародыши контрольного варианта сразу после эксплантации проращивали при температуре +27°C на свету в течение 14 суток. В экспериментальных вариантах культуральные стаканы после эксплантации зародышей устанавливали в холодильник с температурой +5...+7°C на 3 и 6 месяцев. По истечении этих сроков зародыши проращивали в течение 14 суток при температуре +27°C на свету в тех же культуральных стаканах, в которых они хранились. На каждый вариант высаживали по 30–50 зародышей. Полученные проростки анализировали по следующим параметрам: число листьев, длина побега, длина корневой системы, цвет листьев. Статистическая обработка данных проведена по Г. Ф. Лакину [1].

Результаты исследований

Морфобиологические показатели проростков, полученных при проращивании изолированных незрелых зародышей различных генотипов кукурузы, хранившихся в течение 0, 3 и 6 месяцев при температуре +5...+7°C в условиях *in vitro*, представлены в таблицах 1–4. Анализ всхожести зародышей и морфобиологических показателей проростков показывает, что через 3 месяца хранения на холоде способными прорасти (всхожими) оставались 100 % зародышей гибридов и от 44 до 75 % зародышей линий (44 % у линии ДК205/710, 73 % – у ДК303/427 и 75 % – 276-1).

В сравнении с контролем проростки, полученные из зародышей, хранившихся 3 месяца на холоде, имели уменьшенное число листьев (в среднем на 50 % у гибридов и на 75 % у линий), более короткие побеги (в среднем короче на 89,8 % у гибридов и на 73,2 % у линий) и более короткую корневую систему (в среднем короче на 87,1 % у гибридов и на 97,2 % у линий). Как следствие уменьшения значений показателей в экстремальных условиях значительно возросли коэффициенты вариации изученных признаков.

Таблица 1

Число листьев проростков, полученных из изолированных незрелых зародышей кукурузы после длительного воздействия холода

Генотип изолированных незрелых зародышей	Длительность хранения на холоде, мес.	Среднее, шт. $\bar{x} \pm m_{\bar{x}} \cdot t_{0.05}$	Снижение к контролю, %	Коэффициент вариации, % $V \pm m_V \cdot t_{0.05}$
Гибрид МО425610 F ₂	0 (контроль)	3,0±0,1	–	16,2±3,4
	3	1,4±0,2	52,7	51,5±10,6
	6	0	100,0	–
Гибрид МО425596 F ₂	0 (контроль)	2,7±0,1	–	19,7±4,4
	3	1,6±0,3	40,7	62,5±9,4
	6	0	100,0	–
Гибрид МО425599 F ₂	0 (контроль)	2,7±0,1	–	19,5±0,4
	3	1,2±0,3	55,6	56,8±15,2
	6	0	100,0	–
Линия ДК205/710	0 (контроль)	2,7±0,1	–	17,3±3,4
	3	0,4±0,1	85,2	114,6±23,4
	6	0	100,0	–
Линия 276-1	0 (контроль)	2,6±0,2	–	25,3±5,0
	3	0,8±0,2	69,2	72,9±18,2
	6	0	100,0	–
Линия ДК303/427	0 (контроль)	3,0±0,2	–	15,6±3,9
	3	0,9±0,1	70,0	27,7±10,1
	6	0	100,0	–

Таблица 2

Длина побегов проростков, полученных из изолированных незрелых зародышей кукурузы после длительного воздействия холода

Генотип изолированных незрелых зародышей	Длительность хранения на холоде, мес.	Среднее, см $\bar{x} \pm m_{\bar{x}} \cdot t_{0.05}$	Снижение к контролю, %	Коэффициент вариации, % $V \pm m_V \cdot t_{0.05}$
Гибрид МО425610 F ₂	0 (контроль)	20,4±1,0	–	18,0±3,8
	3	1,3±0,3	93,5	82,9±17,0
	6	0	100,0	0
Гибрид МО425596 F ₂	0 (контроль)	16,1± 1,2	–	36,2±8,2
	3	3,0±1,1	81,2	120,3±18,2
	6	0	100,0	0
Гибрид МО425599 F ₂	0 (контроль)	17,9±1,6	–	33,2±6,6
	3	1,2±1,2	93,2	273,3±73,1
	6	0	100,0	0
Линия ДК205/710	0 (контроль)	12,1±1,4	–	43,0±8,4
	3	0,2±0,1	98,5	166,1±33,8
	6	0	100,0	0
Линия 276-1	0 (контроль)	12,5±2,0	–	57,9±11,4
	3	0,7±0,2	94,6	79,3±19,8
	6	0	100,0	0
Линия ДК303/427	0 (контроль)	15,7±2,0	–	36,0±9,0
	3	0,4±0,1	97,8	70,9±25,8
	6	0	100,0	0

Таблица 3

Длина корневой системы проростков, полученных из изолированных незрелых зародышей кукурузы после длительного воздействия холода

Генотип изолированных незрелых зародышей	Длительность хранения на холоде, мес.	Среднее, см $\bar{x} \pm m_{\bar{x}} \cdot t_{0.05}$	Снижение к контролю, %	Коэффициент вариации, % $V \pm m_V \cdot t_{0.05}$
Гибрид МО425610 F_2	0 (контроль)	15,8±1,2	–	27,2±5,8
	3	1,4±0,5	91,4	117,1±23,8
	6	0	100,0	0
Гибрид МО425596 F_2	0 (контроль)	12,0±0,9	–	34,7±7,8
	3	2,5±1,1	78,9	135,2±20,4
	6	0	100,0	0
Гибрид МО425599 F_2	0 (контроль)	12,9±1,4	–	38,7±7,8
	3	1,4±1,5	89,3	296,4±79,2
	6	0	100,0	0
Линия ДК205/710	0 (контроль)	14,7±1,3	–	31,9±6,2
	3	0,13±0,05	99,1	138,4±19,6
	6	0	100,0	0
Линия 276-1	0 (контроль)	19,1±1,6	–	31,2±6,1
	3	0,7±0,2	96,6	87,2±21,8
	6	0	100,0	0
Линия ДК303/427	0 (контроль)	15,4±1,8	–	34,2±8,6
	3	0,6±0,1	96,1	75,9±27,6
	6	0	100,0	0

Таблица 4

Прорастание изолированных незрелых зародышей кукурузы после длительного воздействия холода

Генотип изолированных незрелых зародышей	Длительность хранения на холоде, мес.	Среднее $\bar{x} \pm m_{\bar{x}} \cdot t_{0.05}$	Снижение к контролю, %	Коэффициент вариации, % $V \pm m_V \cdot t_{0.05}$
Число листьев, шт.				
Гибриды F_2	0 (контроль)	2,8±0,1	–	18,5±3,9
	3	1,4±0,3	50,0	56,9±11,7
	6	0	100,0	–
Линии	0 (контроль)	2,8±0,2	–	19,4±4,1
	3	0,7±0,1	75,0	71,7±17,2
	6	0	100,0	–
Длина побега, см				
Гибриды F_2	0 (контроль)	18,1±1,3	–	29,1±6,2
	3	1,9±0,9	89,8	158,8±36,1
	6	0	100,0	–
Линии	0 (контроль)	13,5±1,8	–	45,6±9,6
	3	0,43±0,1	96,8	105,4±26,5
	6	0	100,0	–
Длина корневой системы, см				
Гибриды F_2	0 (контроль)	13,6±1,2	–	33,5±7,1
	3	1,8±1,0	87,0	182,9±41,1
	6	0	100,0	–
Линии	0 (контроль)	16,4±1,6	–	32,4±7,0
	3	0,5±0,1	97,2	100,5±23,0
	6	0	100,0	–

В целом проростки, полученные после трехмесячного хранения зародышей на холоде, в особенности у линий, были угнетенными. У гибрида МО425610 F_2 и линий ДК205/710 и ДК303/427 полученные проростки были бесцветными. У гибридов МО425596 F_2 и МО425599 F_2 среди массы бесцветных проростков обнаруживались отдельные зеленые, хорошо развитые растения. У линии 276-1 все проростки были бесцветными, за исключением двух светло-зеленых.

Проведенные исследования показали также, что гибридные зародыши в целом дают более развитые проростки по показателям числа листьев и длины корневой системы, но у них под воздействием холода наблюдается более значительное уменьшение длины побега (89,8 %), чем у линий (73,2 %). Последнее обстоятельство можно объяснить существенными различиями средних значений признака у гибридов и линий. Распределение изученных генотипов по степени снижения показателей проростков из незрелых зародышей, хранившихся 3 месяца на холоде, в сравнении с контролем (см. табл. 1–3) не соответствует их распределению на холодостойкие, среднехолодостойкие и нехолодостойкие по данным полевой оценки. Это еще раз подтверждает тот факт, что способность растения противостоять холоду является комплексным признаком. На различных этапах онтогенеза, *in vivo* и в культуре *in vitro* мишенью непосредственного воздействия данного стрессового фактора являются различные части растения, так что противодействие угнетению обеспечивается, по-видимому, экспрессией различных генов и различными компенсаторными механизмами.

После хранения *in vitro* изолированных незрелых зародышей всех генотипов на питательной среде MSzar на холоде в течение 6 месяцев проростки не были получены.

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о возможности прорастания незрелых зародышей, хранившихся *in vitro* на холоде в течение трех месяцев, но вместе с тем показывают, что полученные проростки являются ослабленными, зачастую не проявляют на свету зеленую окраску листьев. Такая система нуждается в дальнейшей доработке для получения более крепких, хорошо развитых, зеленых проростков. Не исключено, что бесцветность проростков в опытных вариантах связана с неглубоким состоянием покоя при температуре $+5...+7^{\circ}\text{C}$, которое при экспозиции 3 месяца может быть причиной массового их ослабления. Стратегия дальнейших исследований в этом направлении должна касаться усиления состояния покоя в период холододового хранения, увеличения периода хранения и активизации прорастания после снятия действия холода. Необходимо также изучение влияния возникающего комплекса стрессовых условий (изоляция и незрелого состояния зародышей, длительного воздействия низких положительных температур, проращивания на питательной среде) на дифференциацию различных генотипов в F_2 для использования в программах селекции на адаптивную способность. Отдельным направлением в разработке технологии сохранения селекционного материала в незрелом состоянии должно стать изучение соотношения процессов покоя, дозревания и прорастания в зависимости от возраста зародыша в момент изоляции с материнского растения и механизмов их регуляции в культуре *in vitro*.

Библиографические ссылки

1. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. **Сатарова Т. Н.** Влияние различных факторов на эмбриокультуру кукурузы // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 4. – С. 51–53.

3. **Сатарова Т. М.** Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*. – Дис. ... д-ра біол. наук: 03.00.20 – біотехнологія. – К., 2002. – 537 с.
4. **Сатарова Т. Н.** Ускорение селекционного процесса кукурузы с помощью метода эмбриокультуры / Т. Н. Сатарова, Г. Р. Пиралов, Б. В. Дзюбецкий // Вісник аграрної науки. – 1993. – № 8. – С. 50–53.
5. **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 Rep. – 1995. – Vol. 14. – P. 743–747.
6. **Van Lammeren A. A. M.** Development morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.) // Acta Bot. Neerl. – 1986. – Vol. 35. – P. 169–188.
7. **Van Lammeren A. A. M.** Observations on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence and absence of 2,4 D // Acta Bot. Neerl. – 1988. – Vol. 37. – P. 49–61.

Надійшла до редколегії 04.12.2006