

ВИКОРИСТАННЯ КАЛУСНИХ ТКАНИН КУКУРУДЗИ У СЕЛЕКЦІЇ *IN VITRO* НА СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ

Т. М. Сатарова, доктор біологічних наук;

О. Є. Абраїмова, К. В. Деркач

Інститут сільського господарства степової зони НААН України

*Показана можливість використання калусних тканин кукурудзи у селекції *in vitro* на стійкість до абіотичних факторів (хлоридного засолення та гербіцидного навантаження). В результаті клітинної селекції відібрані калуси, які характеризуються інтенсивним формуванням морфогенних тканин під дією стресових факторів *in vitro*. На базі відселектованих калусів отримані рослини-регенеранти.*

Ключові слова: кукурудза, хлоридне засолення, гербіцидне навантаження, селекція *in vitro*, калусна тканина.

За рахунок стійкості до стресових факторів навколишнього середовища можливо забезпечити високу продуктивність культурних рослин та якість врожаю. Одним з основних завдань сучасної селекції кукурудзи є створення генотипів кукурудзи зі стійкістю до абіотичних факторів, в тому числі до хлоридного засолення та гербіцидного навантаження.

Засолення ґрунту, зокрема хлоридне, є особливо актуальною проблемою у Дніпропетровській і Херсонській областях, оскільки хлорид-іони, накопичуючись у ґрунті, створюють надлишковий осмотичний тиск і тим самим порушують процеси водообміну в рослинному організмі.

Гербіцидне навантаження пригнічує ростові процеси не тільки у бур'янів, але й в культурних рослин, в тому числі й кукурудзи. Баста – контактний гербіцид широкого спектра дії, діюча речовина якого гліюфосинат амонію (рацемічна суміш D- та L-ізомерів фосфінотрицину). L-ізомер фосфінотрицину – активна складова гліюфосинату амонію, структурний аналог глутамат. Фосфінотрицин в рослинному організмі блокує діяльність глутамінсинтетази, яка в разі присутності АТФ, є каталізатором перетворення глутаміну з глутамату та аміаку, приймає участь у знешкодженні аміаку в тканинах. Якщо активність даного ферменту відсутня, то рослина гине від нестачі глутаміну та накопиченого аміаку.

Відбір стійких до певних абіотичних факторів рослин кукурудзи у польових умовах є високозатратним процесом. Застосування калусних тканин кукурудзи у селекції *in vitro* дає можливість вести роботу на незначних земельних площах, значно економити посівний матеріал і звести до мінімуму використання сільгосптехніки. Клітинна селекція з успіхом пройшла випробування при створенні стійких до дії навколишніх умов форм пшениці [1], буряку [2].

Мета роботи – оцінка можливості використання калусних тканин кукурудзи в селекції *in vitro* на стійкість до хлоридного засолення і гербіцидного навантаження.

Об'єктами досліджень були лінії кукурудзи: ДК633/266, ДК298, ДК675 та PLS61. Донорні рослини вирощували у польових умовах згідно з методичними рекомендаціями по проведенню польових дослідів з кукурудзою [3]. Для індукції калусогенезу незрілі зародки ліній кукурудзи довжиною 1–1,5 мм на 10–12-ту добу після штучного запилення експлантували щитком догори на модифіковане живильне середовище N₆ (Chu, 1975) з додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 690 мг/л L-проліну, 10 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти, 0,1 мг/л абсцизової кислоти та 30 г/л сахарози [4] (при отриманні калусів для вивчення хлоридного засолення) чи 20 г/л сахарози та 20 г/л манітолу (при отриманні калусів для вивчення гербіцидного навантаження). Для моделювання хлоридного засолення калуси ліній ДК633/266 та ДК298, отримані на 120-у добу культивування на контрольному середовищі (без натрію хлориду), пасивувались на середовища з різним вмістом натрію хлориду (6 г/л або 30 г/л) у кількості 50 шт. в кожному з варіантів досліду. Після 120 діб культивування на цих середовищах половину отриманих

калусів пересаджували на середовища того ж складу, а решту – на середовище, яке містило 60 г/л натрію хлориду. Ефективність культивування на контрольному середовищі і на фоні різних концентрацій натрію хлориду оцінювали за масою та діаметром культивованих калусів. Індекс маси розраховували як відношення кінцевої сирової маси калусу до початкової, а діаметру – як відношення кінцевого діаметру калусу до початкового, у відсотках. Дані, які характеризують масу і діаметр калусів при культивуванні протягом перших 120 діб на середовищах з різним вмістом натрію хлориду, наведені у таблицях 1 та 2; протягом наступних діб – у таблиці 3.

1. Калусогенез лінії кукурудзи ДК633/266 на середовищах з натрію хлоридом

ДИС*	Тривалість культивування при дії натрію хлориду, діб	Вміст NaCl у середовищі, г/л	Середній діаметр калусу, мм	Середня маса калусу, мг	Індекс діаметру, %	Індекс маси, %
120	0	0	7,36 ± 0,25	155,3 ± 7,2	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
		6	7,32 ± 0,26	156,0 ± 5,2	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
		30	7,28 ± 0,24	156,5 ± 6,2	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
150	30	0	7,46 ± 0,21	135,1 ± 7,7	101,36 ± 0,09	86,99 ± 0,13
		6	7,42 ± 0,22	120,9 ± 4,8	101,37 ± 0,09	77,52 ± 0,08
		30	7,34 ± 0,23	122,0 ± 5,5	100,82 ± 0,09	77,92 ± 0,09
180	60	0	7,48 ± 0,44	145,3 ± 19,4	101,63 ± 0,14	93,56 ± 0,26
		6	7,46 ± 0,23	126,7 ± 5,0	101,91 ± 0,10	81,25 ± 0,08
		30	7,38 ± 0,22	133,5 ± 5,9	101,37 ± 0,09	85,30 ± 0,10
210	90	0	7,60 ± 0,52	151,3 ± 38,4	103,26 ± 0,16	97,42 ± 0,50
		6	7,52 ± 0,24	127,6 ± 5,3	102,73 ± 0,10	81,83 ± 0,09
		30	7,42 ± 0,22	135,5 ± 6,0	101,92 ± 0,09	86,54 ± 0,10
240	120	0	7,72 ± 0,59	175,5 ± 63,0	104,89 ± 0,18	113,03 ± 0,80
		6	7,56 ± 0,23	129,8 ± 5,1	103,28 ± 0,10	83,23 ± 0,09
		30	7,42 ± 0,30	130,8 ± 5,9	101,92 ± 0,09	83,57 ± 0,10

ДИС* – кількість діб в культурі in vitro.

2. Калусогенез лінії кукурудзи ДК298 на середовищах з натрію хлоридом

ДИС	Тривалість культивування при дії натрію хлориду, діб	Вміст NaCl у середовищі, г/л	Середній діаметр калусу, мм	Середня маса калусу, мг	Індекс діаметру, %	Індекс маси, %
120	0	0	7,62 ± 0,34	162,7 ± 6,4	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
		6	7,44 ± 0,33	154,5 ± 6,6	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
		30	7,26 ± 0,35	153,6 ± 7,6	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
150	30	0	7,72 ± 0,33	192,1 ± 13,9	101,31 ± 0,12	118,13 ± 0,19
		6	7,58 ± 0,32	164,9 ± 7,6	101,88 ± 0,12	106,73 ± 0,13
		30	7,40 ± 0,32	167,6 ± 8,8	101,93 ± 0,13	109,09 ± 0,16
180	60	0	8,90 ± 0,54	218,3 ± 25,5	116,80 ± 0,17	134,19 ± 0,33
		6	7,72 ± 0,34	155,5 ± 8,3	103,76 ± 0,13	100,67 ± 0,14
		30	7,42 ± 0,30	152,5 ± 8,0	102,20 ± 0,13	99,25 ± 0,14
210	90	0	8,98 ± 0,55	231,7 ± 27,1	117,85 ± 0,18	142,47 ± 0,35
		6	7,76 ± 0,34	159,1 ± 8,6	104,30 ± 0,13	102,98 ± 0,14
		30	7,46 ± 0,31	153,9 ± 7,6	102,75 ± 0,13	100,15 ± 0,14
240	120	0	9,22 ± 0,64	294,3 ± 47,8	121,00 ± 0,20	180,96 ± 0,61
		6	7,76 ± 0,34	155,1 ± 11,4	104,30 ± 0,13	100,40 ± 0,17
		30	7,46 ± 0,31	145,2 ± 7,6	102,75 ± 0,13	94,47 ± 0,14

Для моделювання гербіцидного навантаження стабілізовану калусну тканину ліній ДК675 та PLS61, отриману на 200-ту добу культивування на контрольному (безгербіцидному) середовищі, перенесли на середовище, що містило гербіцид баста в перерахунку на вміст діючої речовини фосфінотрицину – 3,0 мг/л. Ефективність культивування на контрольному середовищі та на фоні фосфінотрицину оцінювали за приростом сирої маси культивованих калусів (табл. 4).

3. Динаміка зміни сирої маси калусів кукурудзи після трансплантування на середовища з різним вмістом натрію хлориду

Вміст NaCl у попередньому середовищі, г/л	Вміст NaCl у середовищі культивування С, г/л	Тривалість культивування на середовищі С, діб					
		30		60			
		середня сира маса калусу, мг	Індекс маси, %	середня сира маса калусу, мг	Індекс маси, %	середня суха маса калусу, мг	середня вологість калусу, %
ДК633/266							
0	0	175,1 ± 88,4	98,58 ± 1,35	183,5 ± 107,5	103,31 ± 1,54	9,9 ± 4,2	94,59 ± 9,23
	60	181,3 ± 99,9	104,52 ± 1,66	185,8 ± 100,7	107,12 ± 1,69	21,9 ± 11,6	88,21 ± 13,16
6	6	117,8 ± 6,5	88,86 ± 0,14	121,8 ± 7,0	91,86 ± 0,15	8,2 ± 0,8	93,25 ± 10,24
	60	129,1 ± 8,0	101,59 ± 0,17	135,3 ± 8,3	106,49 ± 0,18	15,3 ± 1,3	88,71 ± 12,92
30	30	113,0 ± 6,8	88,50 ± 0,15	118,0 ± 7,1	92,42 ± 0,16	11,7 ± 0,8	90,07 ± 12,21
	60	138,0 ± 9,9	103,01 ± 0,20	143,5 ± 10,6	107,12 ± 0,21	18,0 ± 1,5	87,47 ± 13,51
ДК298							
0	0	348,6 ± 82,5	110,81 ± 0,79	427,7 ± 101,5	135,97 ± 0,97	35,6 ± 8,4	91,68 ± 11,28
	60	321,8 ± 89,2	117,39 ± 0,76	309,3 ± 93,0	112,84 ± 0,78	36,5 ± 11,7	88,20 ± 13,17
6	6	137,3 ± 14,0	90,24 ± 0,29	150,3 ± 23,0	98,77 ± 0,39	14,6 ± 2,6	90,31 ± 12,08
	60	162,3 ± 18,1	102,68 ± 0,29	167,5 ± 20,2	105,96 ± 0,31	20,4 ± 3,0	87,81 ± 13,36
30	30	127,3 ± 11,6	85,77 ± 0,21	129,2 ± 11,8	87,06 ± 0,21	15,2 ± 1,4	88,20 ± 13,17
	60	137,4 ± 8,7	96,83 ± 0,18	140,2 ± 8,8	98,80 ± 0,18	18,8 ± 1,2	86,61 ± 13,90

Обробку даних проводили згідно з статистичними методами [5]. Дані в таблицях представлені у вигляді $\bar{x} \pm mt_{0,05}$, де \bar{x} – середнє арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Ст'юдента при рівні значущості 0,05.

4. Вплив фосфінотрицину на приріст сирої маси калусів кукурудзи

Лінія	Вміст фосфінотрицину в середовищі, мг/л	Приріст сирої маси калусу за 20 діб, мг	Лім значень приросту сирої маси калусів за 20 діб, мг
PLS61	0	82,0 ± 13,6	25,4 ÷ 229,4
	3,0	21,8 ± 5,9	0,7 ÷ 94,5
ДК675	0	364,0 ± 59,5	150,7 ÷ 592,0
	3,0	97,4 ± 13,8	12,4 ÷ 225,8

У обох ліній протягом культивування спостерігалось підвищення значень індексу діаметру калусів (табл. 1, 2). У контрольному варіанті зростання показників було найбільшим, а на середовищах з натрію хлоридом – найменшим. Лінія ДК298 характеризувалась більшим варіюванням індексу діаметру залежно від середовища культивування, ніж лінія ДК633/266. У лінії ДК633/266 зменшення індексу маси зафіксовано через 30 діб від початку експерименту з подальшим поступовим зростанням його значень. У лінії ДК298 спостерігалось зниження індексу маси на 60 та 120-ту добу, тобто відбувалося ступінчате коливання приросту маси. На 240-у добу в обох ліній остаточно проявився інгібуючий ефект натрію

хлориду порівняно з контролем.

Через 30 діб культивування калусів, перенесених на середовища з різним вмістом натрію хлориду, простежувалася тенденція до зростання маси калусів на середовищі з 60 г/л натрію хлориду і тенденція до зменшення їх маси при культивуванні на середовищах попереднього складу (див. табл. 3). Через 60 діб після розподілу калусів індекс маси зростав порівняно з даними, зафіксованими на 30-у добу після перенесення калусів. Виключенням став індекс маси у лінії ДК298 при перенесенні її калусів з контрольного середовища на середовище з концентрацією 60 г/л натрію хлориду.

У калусів, культивованих останні 60 діб на середовищі з концентрацією 60 г/л натрію хлориду, суха маса була вищою порівняно з калусами, які культивувалися на середовищах попереднього складу. Протилежні результати одержані щодо вологості калусів. Вони свідчать про осмотичну дію натрію хлориду.

Регенерація відселектованих калусів проводилася на середовищі без натрію хлориду. Відселектовані калуси лінії ДК633/266 характеризувалися втратою регенераційного потенціалу, причому індекс маси залежно від вмісту натрію хлориду у середовищі культивування коливався у вузькому діапазоні, ніж у лінії ДК298. На базі відібраних калусів лінії ДК298 на середовищі з концентрацією 6 г/л натрію хлориду були отримані рослини-регенеранти, які є потенційно стійкими до хлоридного засолення; планується тестування зразків у польових умовах.

При гербіцидному навантаженні у ліній PLS61 та ДК675 фосфінотрицин викликав інгібування проліферативної активності калусної тканини порівняно з контролем (див. табл. 4). Забарвлення калусів на селективному середовищі коливалося від темно-жовтого до бурого. Калусна тканина лінії PLS61 ущільнювалась, а лінії ДК675 оводнювалась і втрачала здатність до морфогенезу. Впродовж 20 діб вирощування на селективному середовищі нами було відібрано калусні лінії обох генотипів, які відзначалися найбільшим приростом сирої маси та збереженням здатності до морфогенезу.

Для отримання рослин-регенерантів та перевірки регенераційної здатності отримані калуси були перенесені на середовища того ж складу, але без ауксинів. Калуси лінії ДК675, вирощені на середовищі з фосфінотрицином, втрачали здатність до морфогенезу та проліферували за рахунок обводнених значно вакуолізованих клітин. Відселектований матеріал лінії PLS61 сформував в середньому 0,35 проростка на калус (порівняно з контрольним – 1,2 проростка на калус). Отримані проростки або не укорінювалися зовсім, або мали слабку кореневу систему, на відміну від отриманих на контрольному середовищі рослин-регенерантів.

Таким чином, в результаті проведеної роботи показана можливість використання калусних тканин кукурудзи в селекції *in vitro*, а також відібрані калуси, здатні рости на середовищі з високим вмістом натрію хлориду чи в присутності діючої речовини гербіциду баста – фосфінотрицину, та отримані рослини-регенеранти з відселектованих калусів.

Бібліографічний список

1. Дубровна О. В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля / О. В. Дубровна, Б. В. Моргун // Физиол. и биохим. культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 6 (242). – С. 463–475.
2. Чугункова Т. В. Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків / Т. В. Чугункова // Физиол. и биохим. культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 6 (242). – С. 509–515.
3. Методика проведення польових дослідів з кукурудзою: методичні рекомендації / Підгот. Є. М. Лебідь, В. С. Циков, Ю. М. Пащенко [та ін.]. – Дніпропетровськ, 2008. – 27 с.
4. Сатарова Т. М. Оцінка реципрокного ефекту в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер / Т. М. Сатарова, К. В. Деркач, О. Є. Абраїмова // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2011. – № 40. – С. 20–24.
5. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології: [підручник] / Атраментова Л. О., Утевська О. М.. – Х.: ХНУ ім. В. Н. Каразіна. – 2007. – 288 с.