

ОЦІНКА РЕЦИПРОКНОГО ЕФЕКТУ В КУЛЬТУРІ IN VITRO У ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

Т. М. Сатарова, доктор біологічних наук;

К. В. Деркач¹, О. Є. Абраїмова

Інститут зернового господарства НААН України

Охарактеризовано динаміку калусогенезу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер і їхніх реципрокних гібридів. Виявлено реципрокний ефект за ознаками «загальна частота калусогенезу» і «частота утворення морфогенних калусів», який зберігається протягом 60 діб культивування. Для отримання високої частоти морфогенного калусогенезу рекомендовано при створенні гібридів використовувати лінію ДК420-1 як материнську.

Ключові слова: кукурудза, культура in vitro, реципрокний ефект, калусогенез, лінія.

Лінії зародкової плазми Ланкастер в основному належать до середньостиглої і середньопізньої груп стиглості [1; 2], проте вони широко використовуються для створення скоростиглих генотипів кукурудзи [2], у селекції на абіотичну стійкість [1; 3] та як донори високої комбінаційної здатності [1]. Лінії плазми Ланкастер слугують тестерами до гетерозисних груп Айодент, BSSS, інколи – Лакон [4; 5]. Для одержаних гібридів характерна неоднозначна реакція на середовище, що дає можливість отримувати генотипи з різним рівнем пластичності [6]. Відомо, що інбредні лінії плазми Ланкастер частіше використовують як чоловічу форму при створенні гібридів в зв'язку з їх схильністю до пошкодження шкідниками, ураження хворобами, особливо такими, як стеблова гниль, пузирчаста сажка, а також слабкою стійкістю стебла, низькою продуктивністю, проте зустрічаються і форми з високою стійкістю до вилягання та інших біотичних факторів [7].

Для прискорення і зменшення трудоемності селекційного процесу та розширення генетичного різноманіття вихідного селекційного матеріалу широкого використання набувають біотехнологічні методи. У зв'язку зі значною генотиповою реакцією зразків кукурудзи в культурі in vitro [8] необхідно мати характеристику окремих зародкових плазм, які використовуються в сучасному селекційному процесі за здатністю до калусогенезу та регенерації. Такий моніторинг дає можливість виявити найбільш чутливі зразки в кожній гетерозисній групі, ідентифікувати генотипи для модельного використання, виявити лінії, що здатні проявляти значний гетерозисний ефект в гібридах, визначити характер прояву реципрокного ефекту в гібридів тощо.

Реципрокний ефект – це наявність різниці у прояві ознаки між реципрокними гібридами, які отримують, коли міняються місцями батьківські компоненти схрещувань – з материнського на чоловічий і навпаки. Наявність реципрокного ефекту свідчить про неоднозначний вплив генотипу материнського та чоловічого компонентів схрещування на прояв ознаки у певного гібрида. Основна причина появи реципрокного ефекту пов'язана з материнським успадкуванням, зокрема з цитоплазматичною спадковістю. Як відомо, ДНК присутня не тільки в ядрі, а й в цитоплазмі, зокрема в таких органелах, як пластиди та мітохондрії. Оскільки чоловіча гамета (спермій) – бідноплазменна клітина, а жіноча гамета (яйцеклітина) є великою клітиною зі значною кількістю цитоплазми, то зародок містить лише ядерну ДНК спермія і ядерну та цитоплазматичну ДНК яйцеклітини.

В літературі є відомості про ембріогенний калусогенез ліній кукурудзи та їхніх реципрокних гібридів в культурі незрілих зародків [9]. Характеристика реципрокного ефекту подана відносно андрогенетичної чутливості пиляків кукурудзи [8]. Проте цілеспрямованих досліджень за такими ознаками, як морфогенний калусогенез, утворення калусів певних типів в культурі незрілих зародків генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер, не проводилось.

¹ Науковий керівник доктор біологічних наук Т. М. Сатарова.

Метою нашої роботи було дослідження калусогенного потенціалу у ліній підплазм Мо17 та Oh43 зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів.

Матеріалом для дослідження слугували дві перспективні у селекційному відношенні лінії кукурудзи зародкової плазми Ланкастер, які належать до різних підплазм: лінія ДК633 (підплазма Мо17) та лінія ДК420-1 (підплазма Oh43), а також їхні прямий і зворотний гібриди.

Донорні рослини вирощували в польових умовах згідно з методичними рекомендаціями по проведенню польових дослідів із кукурудзою [10]. Для індукції калусогенезу незрілі зародки довжиною 1–1,5 мм на 10-12 добу після штучного запилення експлантували щитком догори на живильне середовище N₆ (Chu, 1975) з додаванням 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 690 мг/л L-проліну, 60 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти. Культивування зародків проводили при 25–27°C, у темряві. Результати аналізували на 30-ту та 60-ту добу культивування.

Класифікація калусів прийнята нами згідно з С. Е. Green, Y. L. Phillips (1975). Калуси, що утворилися, розподіляли на морфогенні або неморфогенні. Серед морфогенних калусів розрізняли калуси типу I і типу II. До типу I належали калуси, що ростуть повільно, білі або жовті, щільні, компактні, швидко переходять до регенерації і не здатні до тривалої підтримки в культурі; до типу II – калуси зі швидким ростом, зовні м'які, крихкі, білі або блідо-жовті, часто прозорі, здатні до тривалої підтримки в культурі при регулярному пасивуванні на свіже живильне середовище.

Загальну частоту калусогенезу розраховували як процентне відношення кількості зародків, що утворили на щитку калус будь-якого типу, до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Частоту утворення морфогенних калусів, калусів типу I і типу II розраховували як процентне відношення кількості зародків з відповідним типом калусу до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Частоту спонтанної регенерації визначали як процентне відношення кількості культивованих зародків з калусами, які на індуктивному живильному середовищі були здатні утворювати пагони з клітин калусної тканини, до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу. Статистична обробка експериментальних даних виконана за методикою Г. Ф. Лакіна [11]. 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.

В таблиці 1 наведено частоту загального калусогенезу, частоту утворення морфогенних калусів, калусів типу I і типу II на 30-ту добу культивування.

Утворення калусів протягом першого місяця культивування спостерігалось у лінії ДК420-1 (підплазма Oh43) та прямого гібрида ДК420-1хДК633 – 94,1–95,5%. Для генотипів характерним було утворення морфогенного калусу, калусів типу I і типу II. Гібрид ДК420-1хДК633 утворював в основному калус типу I, тимчасом як лінія ДК420-1 – обидва типи калусів, але при цьому дещо переважали калуси типу II. Лінія ДК633 підплазми Мо17 та зворотний гібрид ДК633хДК420-1, де ця лінія слугувала материнською, до 30-ї доби культивування калуси не утворювали. Спонтанна регенерація форм, що утворювали калуси у перший місяць культивування, не спостерігалася.

Отже, впродовж першого місяця культивування генотипів, що досліджувалися за здатністю до калусогенезу всіх типів, спостерігався чіткий реципрокний ефект. Гібрид з участю двох ліній стає позитивним до культивування лише при наявності чутливої лінії ДК420-1 як материнської. Якщо материнською формою є нечутлива лінія ДК633, то і гібрид ДК633х ДК420-1 виявляє негативну реакцію, незважаючи на те, що чоловіча лінія здатна до калусогенезу. Оскільки обрані лінії походять від певних підплазм зародкової плазми Ланкастер, зазначимо, що здатність до калусогенезу в гібрида з'являється, коли материнською є лінія підплазми Oh43, і зникає – коли материнська лінія належить до підплазми

Мо17. У гібрида ДК420-1хДК633 за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I спостережується позитивний гетерозис.

1. Калусогенез в 30-добовій культурі незрілих зародків кукурудзи лінії зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів

Генотип	Підплазма плазми Ланкастер	Кількість культивованих зародків, шт	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК420-1	Oh43	239	94,1 ± 3,0	59,4 ± 6,4	16,3 ± 4,8	43,1 ± 6,4
ДК633	Mo17	445	0	0	0	0
ДК420-1хДК633	Oh43, Mo17	134	95,5 ± 3,6	92,5 ± 4,6	91,8 ± 4,8	0,8 ± 1,5
ДК633хДК420-1	Mo17, Oh43	259	0	0	0	0

Після аналізу на 30-ту добу від експлантації всі культивовані зародки були пересаджені на свіже живильне середовище того ж складу і культивувалися наступні 30 діб за ідентичних умов. У таблиці 2 наведено дані, що характеризують стан експлантів на 60-ту добу культивування. Всі показники розраховані відповідно до загальної кількості зародків, культивованих на момент аналізу.

2. Калусогенез в 60-добовій культурі незрілих зародків кукурудзи лінії зародкової плазми Ланкастер та їхніх реципрокних гібридів

Генотип	Кількість культивованих зародків, шт	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК420-1	225	17,3 ± 5,1	17,3 ± 5,1	0
ДК633	363	10,2 ± 3,2	8,0 ± 2,9	2,2 ± 1,5
ДК420-1хДК633	128	91,4 ± 5,0	91,4 ± 5,0	0
ДК633хДК420-1	258	2,4 ± 1,9	2,4 ± 1,9	0

У лінії ДК420-1 в період з 30-тої по 60-ту добу культивування спостерігалось значне зниження морфогенного потенціалу калусів за рахунок переходу калусів типу II у неморфогенні. Разом з тим, частота утворення калусів типу I утримувалася на вихідному рівні. Калусогенний потенціал прямого гібрида ДК420-1хДК633 також зберігався. У цього гібрида, як і в перший місяць, переважно утворювався калус типу I та зберігався значний гетерозис за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I. Лінія ДК633 у перший місяць культивування була нечутливою, але впродовж наступних 30-ти діб сформувала морфогенні калуси – 10,2%. Формувалися калуси обох типів, переважно щільні, компактні (тип I). У зворотного гібрида ДК633хДК420-1 спостерігався слабкий морфогенний калусогенез (2,4%) типу I. З усіх генотипів, що досліджувалися, лише у лінії ДК633 на 60-ту добу культивування була відмічена спонтанна регенерація на рівні 0,55%.

Отже, протягом другого місяця культивування відбуваються суттєві зміни у зразків щодо калусогенезу. Нечутлива у перший місяць лінія ДК633 та гібрид, для якого вона є материнською, при більш тривалому культивуванні виявляють певну здатність до утворення морфогенних калусів. Тобто лінія ДК633 має слабшу здатність до калусогенезу, ніж ДК420-1 і проявляється вона значно повільніше. Разом з тим, характер прояву реципрокного ефекту в даній добірці генотипів, виявлений на 30-ту добу культивування, зберігається і в подальшому при культивуванні. На 60-ту добу культивування відмічався позитивний гетерозис у прямого гібрида та від'ємний гетерозис у зворотного гібрида за частотою утворення морфогенних калусів та калусів типу I.

Загалом здатність до калусогенезу в кукурудзи, в тому числі і морфогенного, контролюється ядерними генами [12]. Разом з тим, дослідженнями В. Г. Чернишової [9] з впливу різних типів цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) на індукцію незрілими зародками кукурудзи ембріогенної калусної тканини *in vitro* виявлено, що цитоплазматичний фактор, що інгібує соматичний ембріогенез, пов'язаний з ЦЧС, але не залежить від її типу. У досліджених нами генотипів плазми Ланкастер реципрокний ефект спостерігався за відсутності ЦЧС і можливо пов'язаний з іншим цитоплазматичним чинником, який регулює калусогенез. Участь ядерних генів у визначенні здатності до морфогенного калусогенезу та калусогенезу типу I підтверджується в нашому дослідженні наявністю гетерозису за даними ознаками. Його прояв може забезпечуватися наддомінуванням типом взаємодії алельних генів та специфічними типами взаємодії неалельних генів.

Таким чином, у лінії зародкової плазми Ланкастер виявлено реципрокний ефект за здатністю до загального та морфогенного калусогенезу, зокрема утворення компактного калусу типу I. Реципрокний ефект зберігається протягом тривалого періоду культивування. Для забезпечення високого рівня калусогенезу рекомендовано включати до складу гібридів донорну лінію ДК420-1 як материнський компонент.

Бібліографічні посилання

1. *Дзюбецький Б. В.* Варіювання тривалості періоду «сходи – цвітіння жіночих суцвіть» залежно від умов року, строку сівби та генотипів батьківських форм гібрида / *Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, О. В. Воскобойник, О. О. Нетреба* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2009. – № 37. – С. 22–26.
2. *Олешко О. Г.* Оцінка нових самозапильних ліній кукурудзи, споріднених з генетичною плазмою Ланкастер / *О. Г. Олешко* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2003. – № 21–22. – С. 65–69.
3. *Боденко Н. А.* Добір та оцінка вихідного матеріалу на посухо- та жаростійкість для селекції середньостиглих гібридів кукурудзи: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція рослин» / *Н. А. Боденко*. – Дніпропетровськ, 2003. – 19 с.
4. *Дзюбецький Б. В.* Підбір тестерів для ліній плазми Лакауне в зв'язку з селекцією на адаптивність до умов Степу / *Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель, М. Б. Грабовський* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2003. – № 21–22. – С. 24–27.
5. *Мустяца С. И.* Использование зародышевой плазмы гетерозисных групп BSSS, Рейд и Айодент в селекции скороспелой кукурузы / *С. И. Мустяца, С. И. Мистерец* // Кукуруза и сорго. – 2007. – № 6. – С. 8–12.
6. *Шевченко С. О.* Адаптивна здатність тесткросних гібридів, одержаних за участю нових ліній кукурудзи плазми Ланкастер / *С. О. Шевченко* // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2007. – № 31–32. – С. 63–66.
7. *Гриднева Н. М.* Устойчивость линий кукурузы к стеблевым гнилям, ломкости стебля и пузырьчатой головне / *Н. М. Гриднева* // Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Краснодар. – 1999. – С. 92–96.
8. *Сатарова Т. М.* Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. доктора біол. наук: 03.00.20 / *Сатарова Тетяна Миколаївна*. – Дніпропетровськ, 2002. – 537 с.
9. *Чернышева В. Г.* Влияние ЦМС на индукцию эмбриогенной калусной ткани кукурузы / *В. Г. Чернышева, З. Б. Шамина* // Генетика. – 1990. – Т. 26, № 8. – С. 1435–1439.
10. *Филев Д. С.* Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой / *Д. С. Филев, В. С. Циков, В. И. Золотов*. – 1980. – 54 с.
11. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / *Г. Ф. Лакин*. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
12. *Tomes D. T.* The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm / *D. T. Tomes, O. S. Smith* // Theor. Appl. Genet. – 1985. – Vol. 70, № 5. – P. 505–509.