

Индукция каллуса у зрелых зародышей кукурузы

Т. Н. Чеченева, Л. В. Лучко, М. О. Дыкун

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 152, Киев, 252143, Украина

Исследовали возможность индукции каллуса I и II типов из зрелых зародышей инбредных линий кукурузы. Установлено, что использование в качестве эксплантов зрелых зародышей от предварительно отобранных соматональных вариантов обеспечивает повышение общего уровня каллусообразования по сравнению со зрелыми зародышами от исходных инбредных линий. Кроме того, положительный результат достигается за счет модификации питательной среды: добавление гидролизата казеина при индукции каллуса, 6-бензиламинопурина — при индукции регенерации. Указанные подходы более эффективны для линий с низким регенерационным потенциалом.

Введение. Генетическая изученность и практическая значимость делают кукурузу ценным объектом генетических исследований, проводимых на клеточном и молекулярном уровнях.

Для культуры ткани кукурузы описано формирование каллусной ткани трех типов: морфогенной, эмбриогенной и без регенерационного потенциала [1]. По частоте образования тотипотентного каллуса от общего числа первичных эксплантов, интенсивности и продолжительности сохранения регенерационного потенциала инбредные линии кукурузы делятся на три группы [2, 3]. Первая группа — линии, регенерационный потенциал которых ограничен двумя месяцами, частота тотипотентного каллуса низкая. Вторая группа — линии, характеризующиеся колебаниями исследуемых признаков в 2—3 раза в зависимости от погодных условий. Третья группа — линии, стабильно сохраняющие способность формировать растения в течение не менее полугода с высокой частотой тотипотентного каллуса (до 30 %).

Имеются данные, свидетельствующие о генетическом контроле признака регенерационной способности у кукурузы [2, 4—6]. Кроме того, изменения в составе питательной среды [7], различная предварительная обработка эксплантов [8] сказываются на регенерационной способности каллусной ткани кукурузы.

Наиболее существенными компонентами пита-

тельных сред, влияющими на каллусообразование и регенерацию у кукурузы, являются фитогормоны и сахароза. Чаще всего для индукции каллуса в культуре ткани кукурузы используется регулятор роста 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). При понижении содержания 2,4-Д в среде с 2 до 0,25 мг/л и далее до полного его исключения наблюдается позеленение каллуса и регенерация растений на свету [9].

По имеющимся литературным [2, 9] и собственным экспериментальным данным, лучшим эксплантом для индукции тотипотентного каллуса у злаков, в том числе и у кукурузы, являются незрелые зародыши размером 1,0—1,5 мм, что соответствует приблизительно 14 дням после опыления.

Следует подчеркнуть, что узкий сезонный промежуток для отбора эксплантов представляет собой существенное препятствие для экспериментальных работ, работ по клеточной селекции и генетической инженерии. В этом смысле более удобным было бы использование в качестве исходных эксплантов зрелых зародышей кукурузы.

Однако уровень образования тотипотентного каллуса — морфогенного (I тип) и эмбриогенного (II тип) [2] — существенно ниже, чем из шитка незрелых зародышей.

Цель настоящей работы — исследование способов повышения индукции тотипотентного каллуса из зрелых зародышей различных генотипов кукурузы.

Материалы и методы. В качестве исходного

материала использовали сухие зрелые семена инбредных линий кукурузы Пионер 346, Oh 43 (получены в отделе экспериментального мутагенеза Института физиологии растений и генетики НАН Украины) и CS 38 (получена нами в 1987 году), а также семена от растений-регенерантов из указанных инбредных линий (R6). Соматоклональные растения-регенеранты были выращены нами из культуры незрелых зародышей после культивирования каллуса в течение 3—4 месяцев до индукции регенерации. Такие соматоклональные варианты обозначены в тексте, как П 346-с, Oh 43-с, CS 38-с.

Каллусные культуры индуцировали из зрелых зародышей кукурузы (изолированных из предварительно простерилизованных и замоченных на 1 сут семян). Выделенные и мелко порезанные зрелые зародыши культивировали на модифицированной агаризованной питательной среде (МСм), содержащей 2 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарозы с добавлением 1 г/л аспарагина, 30 г/л маннита [1, 9]. Для повышения частоты каллусообразования к этой основной среде добавляли 100 мг/л гидролизата казеина.

Культивировали в темноте при температуре 22—24 °С в течение месяца. Далее после пересадки каллусы переносили на свет (освещенность 2000 лк, 16-ч фотопериод), к концу посева учитывали тип каллусообразования.

Полученные данные обрабатывали статистически [12].

Регенерационный потенциал полученных каллусов оценивали на основной питательной среде (без 2,4-Д) и в варианте с добавлением б-бензиламинопурина (БАП, 3,5 мг/г).

Результаты и обсуждение. Экспланты из измельченных тканей зрелых зародышей кукурузы при помещении в культуральную среду обнаруживают несколько реакций: каллусообразование (различные типы), корнеобразование, прорастание, отсутствие развития (таблица).

Поскольку общий уровень каллусообразования у исходных линий П 346 и Oh 43 низкий, а у линии CS 38 едва достигает среднего уровня, нами были испытаны в качестве исходного материала зрелые зародыши из зерновок соматоклональных вариантов этих линий. Следует отметить, что использовали такие соматоклональные варианты, которые были специально отобраны в ряду поколений по повышенному относительно контроля уровню регенерационного потенциала каллуса из незрелых зародышей. Такой подход обеспечил достоверное возрастание общего уровня каллусообразования у всех трех исследуемых генотипов.

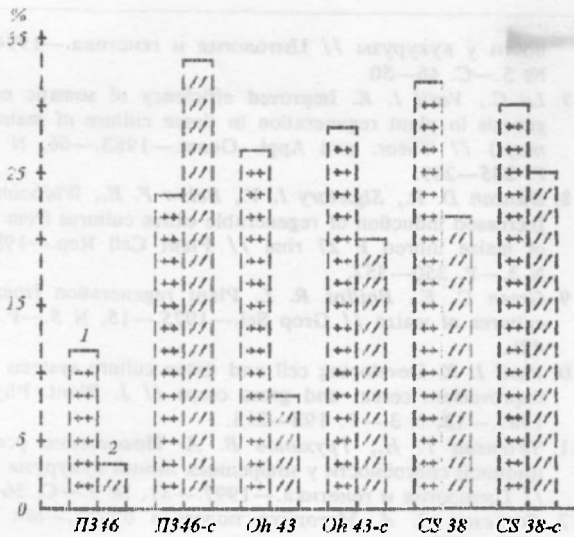
Каллусообразование у соматоклонов уменьшается в направлении CS 38-с → Oh 43-с → П 346-с, как и у исходных линий. При этом существенно уменьшилось нежелательное корнеобразование при индукции каллуса у П 346-с, Oh 43-с, CS 38-с по сравнению с исходными линиями.

Генотип исходной инбредной линии оказал определяющее влияние и на тип каллусообразования (рисунок).

Соматоклональные варианты обеспечивали достоверное повышение уровня тотипотентного каллусообразования (типы I + II) у генотипов П 346 и Oh 43 с его соответственно низким исходным уровнем. У CS 38 с более высоким исходным уровнем тотипотентного каллусообразования достоверных

Реакция *in vitro* зрелых зародышей кукурузы

Генотип	Среда	Количество зародышей	Каллус, %	Корни, %	Прорастание, %	Отсутствие развития, %
П 346	МСм	80	15,0±1,7	68,0±3,8	7,0±0,7	10,0±1,12
П 346-с	МСм	60	56,6±4,6	16,7±2,0	3,4±0,4	23,3±3,02
П 346-с	МСм + к	128	54,7±4,7	15,6±1,3	14,1±1,2	15,6±2,5
Oh 43	МСм	70	34,3±4,1	51,4±6,0	11,4±1,4	2,9±0,3
Oh 43-с	МСм	60	46,7±6,0	30,0±3,9	13,3±1,7	16,0±1,2
Oh 43-с	МСм + к	60	59,9±3,6	23,0±3,0	10,0±1,3	8,0±1,0
CS 38	МСм	116	51,7±4,8	20,7±1,7	20,7±2,8	6,9±0,6
CS 38-с	МСм	80	55,0±4,2	10,1±1,4	20,0±2,2	15,0±1,7
CS 38-с	МСм + к	72	52,7±6,3	11,1±1,3	22,3±2,4	13,9±1,6



Частота каллусообразования зрелых зародышей из инбредных линий кукурузы при добавлении гидролизата казеина: 1 — I + II тип; 2 — III тип

отличий между исходной линией и соматональными вариантами не обнаружено.

По имеющимся литературным данным, значительное влияние на уровень каллусообразования у кукурузы оказывает, кроме фитогормонов, сахарозы, и гидролизат казеина как аминокислотный комплекс [13]. Добавление в состав среды 100 мг/л казеина обеспечило достоверное повышение уровня общего каллусообразования (типы I + II + III) из зрелых зародышей зерновок П 346, Oh 43 по сравнению как с исходной линией, так и с соматональными вариантами (рисунок).

Для линии CS 38 данный эффект отсутствовал, что указывает на необходимость и возможность поиска иных способов повышения уровня каллусообразования у кукурузы.

Регенерационный потенциал сформированного тотипотентного каллуса из зрелых зародышей инбредных линий и соматональных вариантов кукурузы оценивали после пересадки на регенерационный вариант среды МСм. При этом отмечено появление на поверхности каллусов очагов позеленения и единичных прорастающих соматических эмбрионов к концу пассажа. Регенерационный потенциал каллуса из зрелых зародышей инбредных линий и соматональных вариантов уменьшается в направлении CS 38 → Oh 43 → П 346. Кроме того, испытывали влияние на индукцию регенерации допол-

нительного субкультивирования в течение пассажа с БАП. Уже через 7—8 дней после начала пассажа на среде с 3,5 мг/л БАП на свету возникали многочисленные очаги позеленения, при рассмотрении под микроскопом обнаруживались соматические эмбрионы. Таким образом, подтверждено положительное влияние на индукцию регенерации в каллусе из зрелых зародышей кукурузы субкультивирования с БАП. Аналогичный эффект показан ранее на каллусе из незрелых зародышей [11].

Использование более высоких концентраций БАП и более продолжительное время субкультивирования стимулировали корнеобразование на ранних этапах регенерации.

Следовательно, в настоящей работе мы наблюдали различия в интенсивности и типах каллусообразования из зрелых зародышей инбредных линий кукурузы и их соматональных вариантов, что, видимо, можно объяснить неодинаковым спектром эндогенных фитогормонов в исходных эксплантах, возникшим вследствие культивирования *in vitro*. Подобные различия отмечены при индукции каллусообразования из различных соматических тканей проростков кукурузы [13].

Таким образом, за счет методических улучшений (состав среды, подбор исходного материала) каллусообразование и регенерация растений путем соматического эмбриогенеза оказались реальными при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей кукурузы.

Кроме того, полученные данные по индукции каллуса из зрелых зародышей соматональных вариантов исходных линий подтверждают генетическую обусловленность каллусообразования у кукурузы [6] и возможность отбора по данному признаку.

Т. М. Чеченева, Л. В. Лучко, М. О. Дикун

Индукція каллусу у зрілих зародків кукурудзи

Резюме

Досліджено можливості індукції різних типів каллусоутворення із зрілих зародків інбредних ліній кукурудзи. Встановлено, що використання зрілих зародків від соматональних варіантів вихідних ліній забезпечує підвищення рівня каллусоутворення. Додавання у середовище для індукції каллусу гідролізату казеїну, та для індукції регенерації 6-бензіламінопуричу сприяло отриманню позитивного результату.

T. N. Checheneva, L. V. Luchko, M. O. Dykun

Callus induction in mature corn embryos

Summary

Ways of increasing of totipotent callus induction for mature embryo corn inbred lines were investigated. Using mature embryos from mature corn grains of somaclonal variants of tested lines led to the

increasing of callus formation level. Best results were obtained when casein hydrolysate was added to callus induction medium and 6-benzylaminopurine was added to regeneration medium.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas D. T., Smith O. S. The effect parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays*) germoplast // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 5.—P. 505—509.

2. Чеченева Т. Н., Моргул В. В., Рубан Т. А. Регенерация растений из разных типов каллусных тканей инбредных линий и гибридов кукурузы // Докл. АН УССР. Сер. Б.—1988.—№ 11.—С. 80—83.

3. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Побеговый морфогенез и соматический эмбриогенез в культуре ткани кукурузы // Экспериментальная генетика растений в ускорении селекционного процесса.—Киев: Наук. думка, 1989.—С. 120—128.

4. Hodges T. K., Kato K. K., Imbrie C., Veswar M. R. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize // Biotechnology.—1986.—4, N 3.—P. 219—223.

5. Чернышова В. Г., Долгих Ю. И., Шамина Э. Б., Бутенко Р. Г. Влияние генетических характеристик исходных растений на морфогенный потенциал каллусных клеток кукурузы // Докл. АН СССР.—1988.—300, № 1.—С. 227—229.

6. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Генетическая обусловленность каллусообразования и регенерационной способ-

ности у кукурузы // Цитология и генетика.—1994.—28, № 5.—С. 46—50.

7. Lu C., Vasil I. K. Improved efficiency of somatic embryo genesis in plant regeneration in tissue culture of maize (*Zea mays*) // Theor. and Appl. Genet.—1983.—66, N 3/4.—P. 285—289.

8. Duncan D. R., Sigletary I. V., Below F. E., Widholm I. M. Increased induction of regenerable callus cultures from kernels of maize inbred F 27 rhm // Plant Cell Rep.—1989.—8, N 3.—P. 350—352.

9. Green C. E., Philips R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize // Grop Sci.—1975.—15, N 5.—P. 417—421.

10. Vasil I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement cereal and grass crops // J. Plant. Physiol.—1987.—12, N 3.—P. 193—218.

11. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Повышение регенерационной способности у инбредных линий кукурузы *in vitro* // Цитология и генетика.—1997.—31, № 2.—С. 36—40.

12. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта.—М.: Колос, 1973.—335 с.

13. Кунах В. А., Чеченева Т. Н., Моргул В. В. Получение каллусных тканей от разных по генотипу растений кукурузы // Физиология растений.—1980.—27, № 2.—С. 399—403.

УДК 581.1.083.581.146.6
Поступила в редакцию 02.04.98