

Слюсаренко А.Г. Проблемы масс - клонального размножения растений //Бюллетень ГБС. Выпуск 153. С.57- 61.

УДК 581.48

КУЛЬТУРА *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ РАННЕСПЕЛЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

Т.А. Алаторцева, С.С. Наумова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012 г. Саратов, Астраханская, 83, biofac@sgu.ru

Метод *in vitro* позволяет решать широкий спектр задач, касающихся сохранения и воспроизводства ценных генотипов. При этом успех работы во многом зависит от правильности выбора экспланта. Наиболее распространенными объектами для злаков являются молодые незрелые зародыши как наиболее отзывчивые на условия культивирования. Однако одним из преимуществ культивирования зародышей из зрелых зерновок заключается в том, что работы с ними можно проводить практически круглогодично. Определенный опыт в культивировании зародышей кукурузы уже освещен в литературе (Hisajima, 1994; Муссияка, 1997).

Большое значение имеет разработка методов культивирования скороспелых форм, так как скороспелость является одним из важнейших селекционных признаков, при чем, согласно литературным данным, длительность вегетационного периода является существенным фактором, определяющим морфогенетический потенциал зародышей кукурузы *in vitro* (Пиралов, 1997).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании путей получения регенерантов в культуре зрелых зародышей некоторых скороспелых линий кукурузы.

В задачи работы входило:

- а) изучить морфогенетические тенденции зародышей при разных концентрациях 2,4-Д в среде;
- в) выявить для каждой из линий наиболее оптимальные концентрации ауксина 2,4-Д для индукции каллусогенеза и прорастания зародышей.

Были исследованы 5 линий кукурузы (4 из них новосибирской селекции – Н5, Н9, Н12, Н14 и 1 линия получена в лаборатории генетики Саратовского госуниверситета – С59).

Для выделения зрелых зародышей отбирали сухие зерновки среднего размера. В качестве стерилизующих растворов использовали 75% этанол, раствор гипохлорита натрия (1,3-1,5% активного хлора). Культивирование проводили при естественном освещении на питательной среде, содержащей минеральные соли МС, витамины, сахарозу (2%) и 2,4-Д (2,0 и 4,0 мг/л); рН до автоклавирования составлял 5,8-6,1.

Наблюдение за эксплантами показало, что активность зародышей *in vitro* достаточно сильно зависит от времени года. Так с начала весны до середины лета они прорастают в течение одной недели, а зимой около двух месяцев. От-

мечены случаи, когда эксплантированные зародыши находились в покое 3 месяца, а затем прорастали.

Прорастание зародышей практически всех исследованных форм сопровождалось каллусогенезом, Каллус формировался за счет пролиферации клеток щитка и представлял собой новообразования двух типов, которые мы условно именовали как каллус серый, А-типа и каллус В-типа, белого цвета, размножающийся на исходной среде без образования морфогенных структур. Частота встречаемости каллуса и интенсивность его образования зависела от генотипа донора концентрации ауксина.

Линии Н9 и Н12. При концентрации ауксина 4,0 мг/л в большей степени проявлялась тенденция к образованию каллуса В-типа (соответственно: 81,5 и 59,3%). При этом была ниже частота каллусогенеза А-типа (до 0 и 3,7%).

Линия Н5. На среде с ауксином 2,0 и 4,0 мг/л частоты возникновения каллуса А-типа снижались (до 34,4 и 12,9%), но повышались частоты каллуса В-типа (78,1 и 38,7%).

Линия Н14. Наименьшая частота появления каллуса А-типа установлена при концентрации 4,0 мг/л (6,9%). Частота каллусогенеза В-типа при всех испытанных концентрациях 2,4-Д была сходной.

Линия С59. В отличие от выше названных линий, присутствие 2,4-Д в количестве 4,0 мг/л приводило к снижению частоты каллусогенеза В-типа (3,4%). При уменьшении концентрации ауксина до 2,0 мг/л возрастала частота каллуса А-типа (54,2%), в то время частота каллуса В-типа оказывалась несколько ниже (37,5%).

При дальнейшем культивировании всех линий нам не удалось в каллусе А-типа вызвать какие - либо иные морфогенетические реакции, кроме ризогенеза. Для каллуса В-типа хотя и не был характерен ризогенез, но он также не проявлял тенденций к образованию регенерационных структур, подобных почкам или эмбриоидам.

Для получения растений в качестве эксплантов культивировали фрагменты молодых проростков – листовых дисков, кусочков стебля с узлами, междоузлия. Были испытаны варианты среды: а) без гормонов; б) ИУК- 1,0 мг/л; в) ИУК- 1,0 мг/л; кинетин -1,0 мг/л; г) 2,4-Д, ИУК- 1,0 мг/л.

Использованные в качестве эксплантов листовые диски и кусочки стебля из области междоузлий на всех четырех средах дегенерировали. И только культивирование фрагментов проростков из узловой части оказалось более успешным. На безгормональной среде у всех линий, за исключением Н5 и Н12 на среде, содержащей ИУК совместно с кинетином (у всех линий, кроме Н5) были получены растеньица. В этом случае из одного узла развивались 1-2 растеньица. Подобное «черенкование» проростков более практично по сравнению с регенерацией из каллуса, имеющего, как правило, клетки химерные по ploидности и регенеранты не всегда генетически сходны с родительской донорной формой, особенно если каллус прошел длительное культивирование (Асанова и др., 1997).

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Зрелые зародыши всех изученных пяти линий кукурузы в зависимости от количества 2,4-Д в среде в определенной степени проявляют тенденцию к образованию каллуса А-типа (ризогенного) и В-типа (неризогенного).

2. Индукция неризогенного каллуса В-типа у линий новосибирской селекции интенсивнее происходит в присутствии 2,4-Д в количестве 4,0 мг/л, при этом снижается частота образования ризогенного каллуса А-типа. Для индукции каллуса В-типа у линии С59 предпочтительна концентрация ауксина 6,0мг/л, так как при этом снижается частота каллуса А-типа.

3. Зародыши всех пяти линий в исходном пассаже, независимо от количества 2,4-Д, имеют высокую частоту прорастания. В зависимости от линии она варьирует от 80,6 % до 100%.

4. Неризогенная каллусная ткань на испытанных средах не продуцирует структур, способных к регенерации проростков.

5. На безгормональной среде и на среде, содержащей ИУК и кинетин из фрагментов стебля с узлами молодых проростков можно получать растения. Такой способностью обладают на безгормональной среде линии Н9, Н12, Н14 и С59, на среде с ИУК и кинетином Н9 и Н14 и С59.

6. Полученные результаты могут быть использованы в качестве исходных данных для проведения серии работ по введению скороспелых форм кукурузы в культуру *in vitro*.

Литература

Асанова Д.К. Джокебаева С.А., Колумбаева С.Ж., Иващенко А.Т. Получение полиплоидных форм в культуре зрелых зародышей кормовых злаков // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. Тез. докл. VII междунар. конф. Москва. 25-28 ноября, 1997, С.207.

Пиралов Г.Р. Морфогенетический потенциал линий кукурузы с разной длиной вегетационного периода // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда. Тез. докл. VII междунар. конф. Москва, 25-28 ноября, 1997. С. 149.

Hisajima S. Maize Propagation and Breeding Through the Culture of Reproductive Organs // Biotechnology in Agriculture and Forestry, Maize. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1994 Vol.25 .P.37-49.

Муссияка В.К. Культура тканей кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений. 1997. Т.29. N4. С.234-254.