

АБРАЙМОВА О.Є.<sup>1</sup>, ДЕРКАЧ К.В.<sup>1</sup>, САТАРОВА Т.М.<sup>1,2</sup>, ШЕВЧЕНКО Н.В.<sup>2</sup>,  
ЧЕРНОУСОВА Н.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Державна установа Інститут сільського господарства степової зони НААН України,  
Україна, 49027, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14, e-mail: abraimovaolga@gmail.com

<sup>2</sup> ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет»,  
Україна, 49005, м. Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8, e-mail: ShevchenkoNV@i.ua

<sup>3</sup> Державний заклад «Дніпропетровська медична академія» МОЗ України,  
Україна, 49044, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 9, e-mail: tala\_cher@yahoo.co.uk

## ВПЛИВ МАНІТОЛУ НА ІНДУКЦІЮ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ МОРФОГЕННОЇ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ У КУКУРУДЗИ

Кукурудза є однією з найпоширеніших злакових культур у світовому та вітчизняному агропромисловому виробництві. Спектр використання її зерна на різних стадіях стиглості, качанів та зеленої маси, а також продуктів їх переробки дуже великий. Тому селекційні програми по створенню нових гібридів кукурудзи мають за мету не тільки отримання високих врожаїв, але й створення генотипів з заданими характеристиками і властивостями, що не спостерігалися у батьківських форм [1].

Процес калюсогенезу разом з регенерацією рослин в культурі *in vitro* у кукурудзи є базовим для розгортання спеціалізованих біотехнологічних досліджень – отримання соматиклонів, клітинної та тканинної селекції *in vitro*, генетичної інженерії, які спрямовуються на підвищення ефективності селекційного процесу та переходять на більш високий рівень генетичного маніпулювання. Формування калюсної тканини знаходиться під контролем значної кількості внутрішніх та зовнішніх факторів, оптимізація за якими здатна привести до збільшення його результативності [2–4]. Сам процес калюсогенезу треба розглядати як певний перебіг фаз: індукція морфогенного калюсогенезу різних типів, субкультивування для довготривалого підтримання калюсної тканини в культурі, субкультивування для переходу до регенерації рослин, кожна з яких зазнає впливу специфічних саме для неї факторів та повинна відповідати певним вимогам.

Одним з основних факторів, які діють впродовж всього культивування калюсної тканини, є склад живильного середовища. Оскільки калюсогенез є підґрунтям для регенерації рослин, суттєвим також є опосередкований вплив компонентів середовища для індукції калюсогенезу та субкультивування на інтенсивність та якісні показники

регенерації. До складу середовищ, що використовуються в культурі *in vitro* кукурудзи як обов'язкові компоненти включаються вуглеводи як джерело вуглецю та енергії, найчастіше сахароза, яка є регулятором осмотичного тиску в клітині. Існують повідомлення про те, що концентрація сахарози здатна впливати на тип калюсу, а інші вуглеводи, зокрема, мальтоза, сорбітол, манітол, не менше, а іноді і ефективніше, ніж сахароза, здатні впливати на проліферацію калюсної тканини, ступінь і тип її диференціації [5].

Дослідження впливу манітолу як компонента в середовищах для індукції, субкультивування та регенерації заслуговує уваги, оскільки манітол одночасно може використовуватися і як джерело вуглецю, і виступати осмотично активною речовиною. Незважаючи на окремі роботи, що висвітлювали питання впливу манітолу на культуру тканин кукурудзи [6, 7], комплексного вивчення впливу манітолу на калюсну тканину для широкого кола генотипів різних зародкових плазм кукурудзи на всіх етапах її культивування не проводилося. Необхідність досліджень впливу манітолу підтверджується ще й тим, що цей вуглевод застосовується в генетичній інженерії як осмотично активна речовина при короткотривалій експлантації зародків, молодих калюсів і зрілих калюсних культур для полегшення процесу введення в клітини сторонньої ДНК [8].

Метою даного дослідження було вивчити вплив манітолу у складі індукційного живильного середовища з подальшим контролем регенераційного потенціалу у отриманих морфогенних калюсів.

## Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували лінії кукурудзи *Zea mays* L., які відносяться до відповідних типів зародкової плазми Chi31 (тип зародкової плазми Chi31), CO125 (Flint), ДК165/403 (Iodent), ДК675 (Lancaster), CM105, W38 і W64A (Reid), ДК2/66 (Lacaune) і PLS61 (PLS61).

Для отримання калусної тканини як експланти використовували незрілі зародки розміром 1–2 мм у віці 9–16 діб після запилення. Стерилізацію рослинного матеріалу проводили етанолом (96 %) протягом 1 хв, після промивання стерильною дистильованою водою обробляли розчином сулеми (0,1 %) з додаванням детергенту Tween-80 протягом 20 хв. Після цього матеріал промивали 5 разів стерильною дистильованою водою.

Для індукції калусогенезу незрілі зародки висаджували на індукційне середовище IndN<sub>6</sub>, яке включало макро- та мікроелементи середовища N<sub>6</sub> за [9], вітаміни за [10], мезо-інозит (100 мг/л), гідролізат казеїну (100 мг/л), L-пролін (690 мг/л), нітрат срібла (10 мг/л), сахарозу (20 г/л), 2,4-Д (1 мг/л) та агар (7 г/л). Середовище IndN<sub>6</sub> + М містило додатково 30 г/л манітолу. Культивування матеріалу проводили при температурі 26 °С у темряві протягом 30 діб.

Для отримання рослин-регенерантів калусну тканину пересаджували в чашки Петрі на живильні середовища для регенерації, які містили

макро- і мікроелементи середовища MS за [11], вітаміни за [8], мезо-інозит (100 мг/л), гідролізат казеїну (100 мг/л), L-пролін (690 мг/л), нітрат срібла (10 мг/л), сахарозу (20 г/л) та БАП (0,1 мг/л). У середовища для регенерації манітол не містили. Після ініціації регенерації невеликі пагони або рослини (3–5 см довжиною) переносили на середовище для дорощування рослин-регенерантів. Культивування на середовищах для регенерації вели при температурі 26 °С на світлі інтенсивністю 5–7 тис. люкс при 16-годинному фотоперіоді та на середовищі для дорощування рослин-регенерантів при температурі 26 °С на світлі інтенсивністю 10–20 тис. люкс при 16-годинному фотоперіоді.

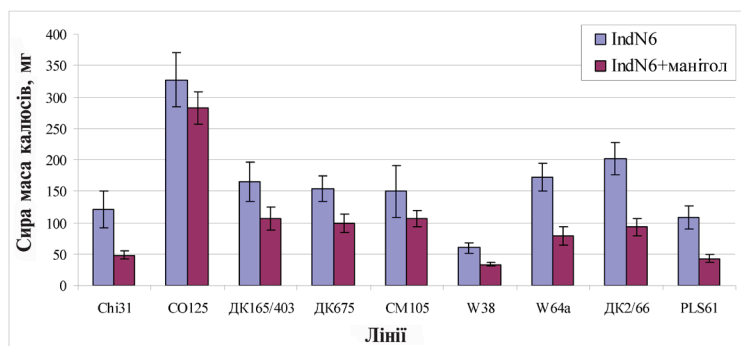
Дані в таблицях представлені у вигляді  $x \pm mt_{0,05}$ , де  $x$  – середнє арифметичне значення показника,  $m$  – помилка середнього арифметичного,  $t_{0,05}$  – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05.

## Результати та обговорення

Дослідження впливу манітолу на утворення морфогенних калусів з незрілих зародків 9 ліній кукурудзи (табл. 1) показало, що на живильному середовищі з манітолом практично у всіх ліній (за винятком високочутливих CM105 (Flint) та W38 (Reid)) спостерігалось значне підвищення частоти формування морфогенної калусної тканини. Це відбувалося переважно за рахунок формуван-

ня калюсів I типу – компактних, непридатних до тривалого субкультивування. У ліній Chi31, ДК675 та W38 на середовищі з манітолом спостерігалася тенденція до збільшення кількості калюсів II типу – крихких, здатних до тривалого збереження регенераційного потенціалу. Манітол стимулював не тільки процес індукції морфогенної тканини, але й значно зменшував ступінь її диференціації. Калюси, які розвивалися на середовищах з манітолом, були більш компактними, формували значно менше органогенних структур, на їх поверхні частіше спостерігалися щиткоподібні формування. Разом з тим, візуальні спостереження та аналіз динаміки приросту сирої маси морфогенної калюсної тканини виявили для більшості ліній уповільнення темпів накопичення сирої маси за наявності в середовищі 30 г/л манітолу.

Результати дослідження впливу на накопичення сирої маси калюсів I типу на індукційних середовищах показали, що манітол призводить до зниження накопичення сирої маси калюсної тканини всіх досліджених ліній (рис. 1). У процесі культивування було відмічено, що для деяких ліній, які схильні при культивуванні до спонтанної регенерації (лінії Chi31 та ДК92/61) або накопичення калюсною тканиною вологи і втрати внаслідок цього морфогенності (лінія ДК675), манітол є необхідною речовиною для збереження морфогенності калюсів.



**Рис. 1.** Вплив 30 г/л манітолу в складі індукційного середовища на накопичення сирої маси калюсів I типу (впродовж перших 30 днів культивування)

Опосередкований вплив манітолу в індукційному середовищі на процес регенерації з отриманої калюсної тканини I типу вивчали на 6 лініях. Калюси I типу через 30 днів після індукції були перенесені на середовище для регенерації. Отримані результати свідчать про позитивний вплив манітолу в індукційному середовищі на формування здатних до регенерації калюсів I типу (табл. 2).

Як видно з представлених даних, для 5 з 6 досліджених ліній кількість пагонів на 1 г калюсної маси при індукції на середовищі з манітолом збільшувалась в 1,2–2,1 рази. Кількість одержаних рослин із калюсів, що сформувалися за присутності манітолу, була вища в 1,3–4,5 рази у 3 з 6 вивчених ліній, що відносилися до зародкових плазм Lancaster, Reid та Lacaune, однак для лінії W64A (Reid) відмічено зменшення числа отриманих проростків з калюсів, які сформувалися на середовищі з манітолом. На калюсній тканині, що була одержана на середовищах без манітолу, було

відмічене підвищене формування листкоподібних структур, які не формували пагони, а згодом некротизувалися, що призводило до швидкого погіршення стану калюсної тканини. Вплив манітолу в складі індукційного середовища на регенераційний потенціал калюсів I типу виявився позитивним для ліній-представників різних типів зародкової плазми. У цілому манітол негативно не впливав на регенераційний потенціал більшості вивчених генотипів.

## Висновки

Дослідження впливу манітолу (30 г/л) в індукційному живильному середовищі на утворення морфогенної калюсної тканини та регенераційний потенціал калюсної тканини I типу показало, що манітол є ефективним компонентом індукційного середовища для формування морфогенних калюсів різних типів, а також для збереження регенераційної здатності нетривало субкультивованих калюсів I типу у більшості вивчених генотипів. Зменшення накопичення сирової маси калюсів на середовищах з манітолом необхідно враховувати при тривалому субкультивуванні калюсної тканини II типу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Сатарова Т.Н., Черчель В.Ю., Черенков А.В. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии [монография]. – Днепропетровск: Новая идеология, 2013. – 552 с.
2. Игнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: [монография]. – Одеса: Астропринт, 2011. – 224 с.
3. Кунах В.А. Биотехнология лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
4. Bhojwani S.S., Dantu P.K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. – Springer, 2013. – 309 p.
5. Yaseen M., Ahmad T., Sablok G., Standardi A., Hafiz I.A. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development // Molecular Biology Reports. – 2013. – 40. – P. 2837–2849.
6. Sun L., Wu Y., Zou H., Su S., Li S., Shan X., Xi J., Yuan Y. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2013. – 113. – P. 103–119.
7. Matheka J.M., Magiri E., Rasha O.A., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) // Biotechnology. – 2008. – 7, N 4. – P. 641–650.
8. Нітовська І.О., Дуплій В.П., Рудас В.А., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Моргун Б.В. Оптимізація умов трансформації калюсних ліній кукурудзи за допомогою детекції транзійтної експресії гена бета-глобонідази // В зб. «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології». – 2012. – 4. – С. 587–592.
9. Chu Ch.-Ch., Wang Ch.-Ch., Sun Ch.-S., Hsu Ch., Yin K.-Ch., Chu Ch.-Y., Bi F.-Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources // Sci. Sin. – 1975. – 18, N 5. – P. 959–668.
10. Duncan D.R., Williams M.E., Zehr B.E., Widholm J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes // Planta. – 1985. – 165, N 3 – P. 322–332.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–497.

ABRAIMOVA O.E.<sup>1</sup>, DERKACH K.V.<sup>1</sup>, SATAROVA T.M.<sup>1,2</sup>, SHEVCHENKO N.V.<sup>2</sup>, CHERNOUSOVA N.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Steppe Zone Institute of the Natl. Acad. Agr. Sci. of Ukraine, Ukraine, 49027, Dnipropetrovsk, Dzerzhinskogo str., 14, e-mail: abrainovaolga@gmail.com

<sup>2</sup> Ukrainian State University of Chemical Technology, Ukraine, 49005, Dnipropetrovsk, Gagarin av., 8, e-mail: ShevchenkoNV@i.ua

<sup>3</sup> State Establishment «Dnipropetrovsk Medical Academy», Ukraine, 49044, Dnipropetrovsk Dzerzhinskogo str., 9, e-mail: tala\_cher@yahoo.co.uk

## THE INFLUENCE OF MANNITOL ON INDUCTION OF MAIZE MORPHOGENIC CALLUS AND THEIR REGENERATION ABILITY

**Aims.** In maize (*Zea mays* L.) callusogenesis on immature embryos is the basis for obtaining somaclones, cell selection, genetic engineering. The aim of the study was to examine the effect of mannitol in an induction medium on obtaining and regeneration capacity of morphogenic calli. **Methods.** Plant tissue culture method for assessing morphogenetic reaction of 9 maize lines was used. **Results.** Mannitol significantly increased frequencies of morphogenic calli induction, reduced their differentiation, but inhibited fresh weight accumulation. Calli obtained on the mannitol contained medium had improved regeneration ability. **Conclusions.** Mannitol is an effective component for the induction of morphogenic calli of different types and for maintenance of regeneration ability of callus tissue of type I.

**Keywords:** mannitol, maize, culture *in vitro*, morphogenic callus, regenerants.