

М. О. Макарчук
Уманський національний університет садівництва

ВДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ДЛЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ГІБРИДНОЇ КУКУРУДЗИ (*ZEА MAYS L.*)

Наведено результати досліджень щодо можливості вдосконалення елементів технології мікроклонального розмноження гібридної кукурудзи (*Zea mays L.*). Показано переваги пророщування насіння кукурудзи в чашках Петрі на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері, за температури 20–22 °С і вологості повітря 85–87%, що забезпечило отримання матеріалу для заготовки спроможних до ефективної проліферації експлантів. Зроблено висновок, що технології *in vitro* можуть бути використані як біотехнологічна ланка у селекційному процесі та насінництві для прискореного розмноження гібридів кукурудзи та їх компонентів.

Вступ

Починаючи з другої половини минулого сторіччя методи біотехнології знаходять все більше застосування в селекції та насінництві рослин [1–4]. Для багатьох трав'янистих рослин, насамперед суніці, картоплі, багатьох овочевих, квітково-декоративних, деяких лікарських та інших спроможних до вегетативного розмноження традиційними методами рослин вже розроблено економічно ефективні технології розмноження *in vitro* з високими показниками коефіцієнта розмноження [4–9]. Однак прискорене розмноження як гібридів кукурудзи, так і їх компонентів (насамперед чоловічо-стерильного материнського) *in vitro* має сенс лише тоді, коли в процесі мікроклонування спадковість особини, що розмножується, залишається недоторканою [3, 10, 11].

У селекції кукурудзи виникає низка специфічних труднощів зумовлених моноєцією цієї рослини, потребою в перехресному запиленні для формування якісного насіння, самонесумісністю, що хоча й забезпечує біологічний механізм постійного перехресного запилення, однак ускладнює гомогенізацію вихідного матеріалу методами інбридингу тощо, які гальмують селекційний процес. Тому

розробка і вдосконалення способів прискорення селекції взагалі і зокрема швидкого розмноження найціннішого вихідного матеріалу належить до найважливіших селекційних завдань [12–15]. Найбільші перспективи в цьому напрямі селекціонери кукурудзи пов'язують з біотехнологією, насамперед з мікроклональним розмноженням материнських компонентів гетерозисних гібридів, адже для збереження достатніх рівнів стабільності генотипу під час розмноження чоловічо-стерильних матеріалів традиційними способами доводиться створювати і розмножувати закріплювачі стерильності і виконувати цілий комплекс загайних і вартісних заходів [16–18].

Багато дослідників вважають також привабливими перспективи вегетативного розмноження *in vitro* одержаних унаслідок ручної кастрації і запилення гібридів кукурудзи з виробництвом ембріодного насіння, яке може продукуватися у вигляді придатних до сівби сівалкою гранул, що складаються з гідрогелю, живильного середовища і соматичного ембріода та має оболонку, утворену взаємодією гідрогелю з рослинною дубильною речовиною і карбонатом кальцію [19].

Матеріали та методи досліджень

Експериментальні дослідження проводили у біотехнологічній лабораторії кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва. Вивчали можливість мікроклонального розмноження кукурудзи (*Zea mays* L.) на прикладі гетерозисного гібрида F_1 Піонер-Гран 3978 селекції Ф. М. Парія зі співробітниками [20]. Для підготовки до мікроклонального розмноження з метою відбору найбільш ефективних експлантів гібридів кукурудзи нами було поставлено на пророщування у чашки Петрі по 50 насінин цього гібрида у кожному з чотирьох варіантів. У першому варіанті матеріал пророщували у стерильній дистильованій воді на фільтрувальному папері у світлових умовах, у другому — у такій же воді на фільтрувальному папері у темнових умовах, у третьому варіанті — на ґрунтовій суміші (яка включала 2/3 ґрунту і 1/3 піску) у світлових умовах, а у четвертому — на ґрунтовій суміші (з тим самим співвідношенням ґрунту і піску) у темнових умовах. У першому і третьому варіантах насіння пророщували в термостаті при температурі 20–22 °С. У другому і четвертому — в лабораторній кімнаті за температури 18–20 °С і вологості 75–80%.

Після визначення найкращих умов для пророщування насіння перед нами постало завдання з'ясувати особливості застосування загальнозживаних і нових стерилізаторів та підібрати оптимальні режими для ефективної стерилізації проростків кукурудзи.

Стерилізацію починали зі стерилізації приміщення та інструментів, а потім стерилізували рослинний матеріал. Проростки рослинного матеріалу зрізували скальпелем притримуючи пінцетом, які пропарювали при температурі 180–200 °С. Перед стерилізацією для змивання грибової і бактеріальної інфекції проростки промивали мильною і стерильною водою впродовж 15–20 хвилин. У ламінар-боксі проводили стерилізацію експлантів і переносили їх на живильне середовище Мурасіге і Скуга з половинним вмістом солей.

За стерилізатори використовували гіпохлорит натрію та перкарбонат натрію (відповідно хлоридний та кисневий відбілювачі). Гіпохлорит натрію, як контрольний стерилізатор, застосовували у багаторазово

перевіреній у попередніх дослідах концентрації розводячи комерційний відбілювач «Білізна» стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:3. Перкарбонат натрію використовували у трьох концентраціях: 5, 10 і 20%. Стерилізацію та введення експлантів у стерильну культуру [1, 2, 18], обліки і спостереження здійснювали за загальнозживаними методиками [21, 22]. Статистичний аналіз отриманих даних проводили за Р. Фішером [23].

Результати досліджень та їх обговорення

Успіх мікроклонального розмноження кукурудзи, як і будь-якої іншої рослини, залежить від середовища, умов пророщування, а головне, від наявності (чи відсутності) інфекції не лише на поверхні насіння, а й прихованої інфекції, що може проявитись на певних етапах подальшого розвитку. Внаслідок спостережень за швидкістю проростання насіння з'ясувалось, що у першому варіанті, на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері в світлових умовах, на п'яту добу отримано 26 пророслих насінин, що перевищило 50% від числа поставлених на пророщування, на сьому добу їх кількість становила 36, а на десяту добу досягла 46 шт., що становить 92%. На зволоженому фільтрувальному папері у темнових умовах кількість пророслих насінин була меншою на 6, 7 і 6 шт. відповідно на 5, 7 та 10-у добу (рис. 1).

Аналізуючи діаграму можна дійти висновку, що четвертий (ґрунтові суміші в темнових умовах) і третій (ґрунтові суміші в світлових умовах) варіанти були менш ефективними варіантами пророщування насіння, ніж пророщування на фільтрувальному папері. Так у третьому варіанті на п'яту добу кількість пророслих насінин кукурудзи становила три штуки, на сьому — 11, та 30 на десяту добу. Порівняно з третім варіантом, децю меншу кількість пророслих насінин отримано на ґрунтовій суміші в темнових умовах — одну і чотири штуки відповідно на п'яту і сьому, тоді як на десяту добу кількість пророслого насіння становила 28 штук, що близька до показника пророщування на ґрунтовій суміші в світлових умовах.

Отже, кращі умови для пророщування насіння склалися на дистильованій воді у світлових умовах (рис. 2.). Гіршими вони були на ґрунтовій суміші в темнових умовах (рис. 3).

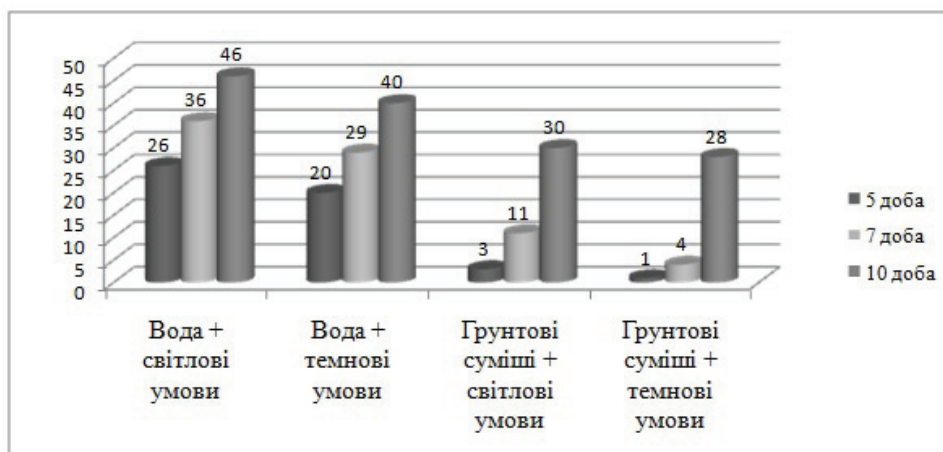


Рис. 1. Кількість пророслого насіння гетерозисного гібриду кукурудзи Піонер-Гран 3978 залежно від середовища та умов пророщування, шт.



Рис. 2. Проростки насіння на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері в світлових умовах



Рис. 3. Проростки насіння на ґрунтовій суміші у темнових умовах

У названих варіантах відповідно отримано 91,6% та 56,4% проростків. За пророщування на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері в темнових умовах вихід стерильного біоматеріалу для *in vitro*, був на 10,8% меншим, ніж у світлових умовах, тоді як на ґрунтових сумішах різниця між світловими і темновими умовами пророщування не виходила за межі HP_{05} (табл. 1).

Слід відмітити, що на початковому етапі культивування *in vitro* бактеріально-грибкові інфекції найменше проявились за використання експлантів отриманих у варіанті пророщування насіння на дистильованій воді у світлових умовах. При цьому частка інфікованих експлантів не перевищувала 17,4, тоді як за пророщування насіння на ґрунтовій суміші у темнових умовах частка інфікованого матеріалу досягла 80,2%. За інших варіантів пророщування насіння відсоток інфікованого матеріалу варіював від 31 до 45 відсотків.

З'ясувалось, що швидкий ріст і розвиток рослинного матеріалу було досягнуто у першому варіанті — при пророщуванні на змоченому дистильованою водою фільтрувальному папері в світлових умовах, температурі 20–22 °C і вологості повітря 85–87%, тому у своїх подальших дослідженнях для пророщування насіння було використано умови першого варіанту рекогносцирувального досліджу.

На поверхні насінини, як і в середині неї (прихована інфекція), може знаходитися велика кількість грибкових і бактеріальних інфекцій, що поглинають

поживні речовини живильного середовища, а також пригнічують та гальмують розвиток експланта. Тому важливим етапом мікроклонального розмноження є

процес стерилізації рослинного матеріалу та підбір стерилізаторів і експозиції стерилізації безпосередньо перед введенням.

1. Якість стерилізації насіння гетерозисних гібридів кукурудзи залежно від середовища та умов пророщування (2014–2015 рр.)

Умови пророщування	Вихід стерильного біоматеріалу для <i>in vitro</i> , %	Кількість інфікованого <i>in vitro</i> матеріалу, %
Вода + світлові умови	91,6	17,4
Вода + темнові умови	80,8	31,1
Ґрунтові суміші + світлові умови	60,8	44,9
Ґрунтові суміші + темнові умови	56,4	80,2
НІР ₀₅	6,2	4,5

Загальноживаною методикою підготовки рослинного матеріалу з пророщеного насіння для отримання незаражених експлантів рекомендується промивання його мильною, а потім дистильованою водою з подальшою стерилізацією та перенесенням на живильне середовище. Однак наші дослідження засвідчили недостатність промивання насіння мильною і дистильованою водою, після якого на експлантах, заготовлених з підготовленого до введення *in vitro* за згаданою технологією матеріалу і введених на живильне середовище, в їх подальшому розвитку на всіх рослинах проявлялася інфекція ще на початкових етапах культивування.

Для подолання грибово-бактеріальної інфекції

нами, крім протокольного промивання насіння мильною і дистильованою водою протягом 15–20 хв., було застосовано додаткову попередню обробку матеріалу гіпохлоритом натрію впродовж 20 хв. та промивання стерильною водою, що забезпечило первинне незараження від поверхневої інфекції. Після цього промиті проростки стерилізували різними стерилізаторами з різними експозиціями.

У варіантах з перкарбонатом натрію 3-х процентний розчин виявився кращою концентрацією препарату за виходом життєздатних експлантів за 15- та 30-хвилинної експозиції при 100-відсотковому пошкодженні і загибелі експлантів від некрозів за 45-хвилинної експозиції (табл. 2.).

2. Ефективність стерилізації рослинного матеріалу гетерозисних гібридів кукурудзи залежно від типу стерилізатора та експозиції (на 15 добу після введення *in vitro*)

Стерилізатор	Концентрація, %	Експозиція стерилізації, хв.	Вихід життєздатних експлантів, %	Частка інфікованого матеріалу, %	Кількість експлантів з некрозом, %
Гіпохлорит натрію	10	15	86,3	0	13,7
		45	36,6	0	63,4
Перкарбонат натрію	1,5	15	0*	100	0
		30	14,3	85,7	0
		45	0*	29,4	70,6
	3	15	85,7	0	14,3
		30	57,1	0	42,9

1	2	3	4	5	6
		45	0*	0	100
	6	15	55,7	0	44,3
		30	43,7	0	56,3
		45	0*	0	100
НІР _{0,5}			7,3		

Примітка: * — при розрахунку НІР_{0,5} варіанти з нульовим виходом життєздатних експлантів не брались до уваги.

Використання 1,5-процентного розчину за 15-хвилинної експозиції було неефективним. Усі експланти у цьому варіанті були інфіковані і невдовзі загинули. Збільшення експозиції до 30 хв. дало змогу отримати 14,3% життєздатних експлантів, однак частка інфікованого матеріалу перевищила 85%, а подальше збільшення тривалості обробки до 45 хв. хоча й сприяло зменшенню частки інфікованих експлантів до близько 30%, призвело до некрозів з понад 70-відсотковою кількістю.

За 6-відсоткової концентрації перкарбонату натрію було отримано 55,7 та 43,7% життєздатних експлантів у варіантах з 15- та 30-хвилинною експозицією відповідно; не було інфікованих експлантів у жодному з варіантів цієї концентрації, однак кількість експлантів з некрозом досягала 44,3 і 56,3% у згаданих експозиціях і зростає до 100% при збільшенні тривалості обробки до 45 хв.

Виконаними дослідженнями з'ясовано, що ефективна стерилізація перед введенням в ізолювану культуру пророслого насіння гібридної кукурудзи була досягнена у варіанті з 3% перкарбонатом натрію та 15-хвилинною експозицією обробки (рис. 4.), що не поступалась протокольному варіанту з 10% гіпохлоритом натрію і з тією ж експозицією (рис. 5.).

Вихід життєздатних експлантів у цих варіантах дослідів відповідно досягав 86,3 і 85,7%, різниця між якими не перевищує НІР_{0,5}. Результати цілком достатні для таких дослідів, а значить стерилізація 3% перкарбонатом натрію з 15-хвилинною експозицією обробки може бути рекомендована для технологій стерилізації проростків кукурудзи перед введенням *in vitro* пророслого насіння гібридної кукурудзи.

При стерилізації гіпохлоритом натрію в експозиції 45 хвилин на 15 добу вирощування частка стерильних життєздатних експлантів становила 36,6%, однак вони здебільшого зупинились в своєму розвитку (рис. 6.), а в варіантах зі стерилізацією 3 і 6% перкарбонатом натрію з тією ж експозицією рослини не витримували навантаження і гинули (рис. 7.), що може свідчити про більшу токсичність обох препаратів при перевищенні тривалості обробки.

Отже близького до оптимального збалансування достатньої для знезараження жорсткості обробки з м'якістю концентрації й експозиції для збереження життєздатності і проліфераційних потенцій експлантів з пророслого насіння гібридної кукурудзи за використання вивчених препаратів було досягнуто у варіантах з 15-хвилинною обробкою і 3-відсотковою концентрацією гіпохлориту натрію та 10-відсотковою концентрацією перкарбонату натрію.

Висновки

Результати виконаних досліджень дають підстави рекомендувати пророщування насіння гібридної кукурудзи в чашках Петрі на зволоженому дистильованою водою фільтрувальному папері, за температури 20–22 °С і вологості повітря 85–87% для отримання матеріалу для заготовки експлантів спроможних до ефективної проліферації *in vitro*.

Встановлено, що використання для стерилізації заготовлених експлантів 10% гіпохлориту натрію та 3% перкарбонату натрію в 15-хвилинній експозиції дає можливість отримувати достатні для введення *in vitro* рівні стерильності.

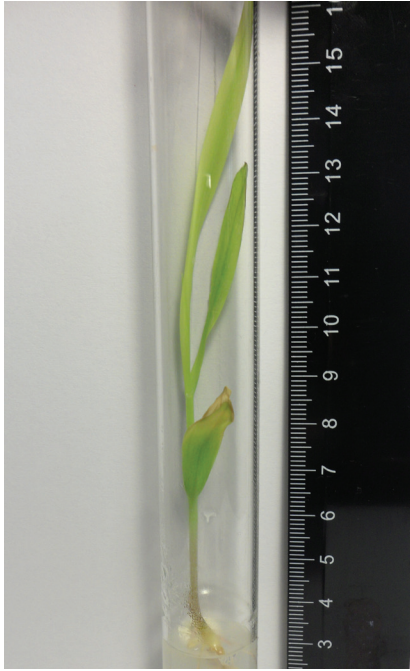


Рис. 4. 15-денний експлант у варіанті стерилізації перкарбонатом натрію (3%) з експозицією 15 хв.



Рис. 6. 15-денний експлант у варіанті стерилізації гіпохлоритом натрію (10%) з експозицією 45 хв.



Рис. 5. 15-денний експлант у варіанті стерилізації гіпохлоритом натрію (10%) з експозицією 15 хв.

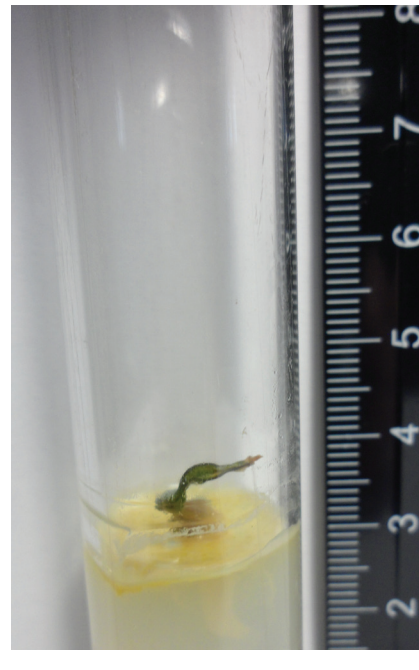


Рис. 7. 15-денний експлант у варіанті стерилізації перкарбонатом натрію (3%) з експозицією 45 хв.

Перелік посилань

1. Бутенко Р. Г. Культура клеток растений и биотехнология / Р. Т. Бутенко. — М.: Наука, 1986. — 280 с.
2. Калинин Ф. А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. А. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. — К.: Наук. думка, 1980. — 488 с.
3. Носов А. М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент / А. М. Носов // Физиология растений. — 1999. — Т. 46. — № 6. — С. 837–844.,
4. Kyte L. Plants from test tubes: an introduction to micropropagation / Lydiane Kyte, John G. Kleyn. — Portland: Timber Press, 1996. — 240 p.
5. Барабин А. И. Генетика: учеб. пособие / А. И. Барабин. — Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет, 2010. — 116 с.
6. Косенко І. С. Регенерація рослин у процесі мікроклонального розмноження / І. С. Косенко, А. І. Опалко, М. В. Небиков // Автохтонні та інтродуковані рослини: Зб. наук. праць НДП «Софіївка» НАН України. — 2008. — Вип. 3–4. — С. 57–67.
7. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. — М.: Высш. школа, 2003. — 340 с.
8. Широков А. И. Основы биотехнологии растений: электрон. учеб. — метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. — Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. — 49 с.
9. Ochatt S. J. In vitro flowering and seed set: acceleration of generation cycles / Sergio J. Ochatt, Rajbir S. Sangwan // Plant cell culture: essential methods [Ed. Michael R. Davey and Paul Anthony]. — Chichester; Oxford: John Wiley and Sons, 2010. — Ch. 6. — P. 97–109.
10. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений / В. А. Кунах // Биополимеры и клетка. — 1998. — Т. 14. — № 4. — С. 298–317.
11. Кунах В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В. А. Кунах // Физиология растений. — 1999. — Т. 15. — № 5. — С. 235–252.
12. 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 // Бюлетень Інституту зернового господарства. — 2011. — № 40. — С. 20–24.
13. Чеченева Т. Н. Повышение регенерационной способности инбредных линий кукурузы *in vitro* / Т. Н. Чеченева, В. А. Труханов // Цитология и генетика. — 1997. — Том. 31, № 2. — С. 36–39.
14. Bonavia D. Maize: origin, domestication, and its role in the development of culture / Duccio Bonavia. — Cambridge et al.: Cambridge University Press, 2013. — 606 p.
15. Hallauer A. R. Quantitative genetics in maize breeding / Arnel R. Hallauer, Marcelo J. Carena, J. B. Miranda Filho // Handbook of plant breeding / [Eds.: Jaime Prohens, Fernando Nuez, Marcelo J. Carena]. — New York; Dordrecht; Heidelberg; London: Springer, 2010. — Vol. 6. — 679 p.
16. Поліщук В. В. Використання культури *in vitro* для розноження материнських компонентів гетерозисних гібридів кукурудзи / В. В. Поліщук // Вісник Львівського ДАУ: Агрономія. — Том 1. — № 5. — 2001. — С. 402–405.
17. Поліщук В. В. Вплив регуляторів росту на ризогенез кукурудзи в культурі *in vitro* / В. В. Поліщук // Зб. наук. пр. Інституту землеробства південного регіону УААН. — 2002. — № 3. — С. 181–183.
18. Поліщук В. В. Калюсотвірна і регенераційна здатність сортів, гібридів і інбредних ліній кукурудзи / В. В. Поліщук, Л. О. Рябовол, І. П. Чучмій // Зб. наук. пр. Уманської ДДА. — 2001. — Вип. 52. — С. 36–38.
19. Вдовитченко М. Ю. Способ получения «искусственных семян» из культуры корня клемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) / М. Ю. Вдовитченко, И. Н. Кузовкина // Патент РФ № 2415928. (Введен в 2011 г.).

20. Парій Ф. М. Використання генетичних маркерів у виробництві гетерозисного гібридного насіння кукурудзи / Ф. М. Парій, О. П. Опалко, М. О. Макаrchук та ін. // Зб. наук. праць Уманського ДАУ. 2008. — Вип. 67. — С. 63–68.
21. Атраментова Л. О. Статистика для біологів / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська. — Харків.: НТМТ, 2014. — 330 с. 22. Основи наукових досліджень в агрономії / В. О. Єценко, П. Г. Копитко, В. П. Опришко, П. В. Костогриз; за ред В. О. Єценка. — К.: Дія, 2005. — 288 с. 23. Fisher R. A. Statistical methods for research workers / Ronald A. Fisher. — New Delhi: Cosmo Publications, 2006. — 354 p.

Рекомендував до друку Опалко А. І.

М. А. Макаrchук
Уманський національний університет садівництва

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СТЕРИЛИЗАЦИИ ДЛЯ МИКРОКЛО- НАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ГИБРИДНОЙ КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS L.*)

Приведены результаты исследований возможности совершенствования элементов технологии микрокломального размножения гибридной кукурузы (*Zea mays L.*). Показаны преимущества проращивания семян кукурузы в чашках Петри на увлажненной дистиллированной водой фильтровальной бумаге, при температуре 20–22 °С и влажности воздуха 85–87%, что обеспечило получение материала для заготовки эксплантов способных к эффективной пролиферации. Сделан вывод, что технологии *in vitro* могут быть использованы в качестве биотехнологического звена в селекционном процессе и семеноводстве для ускоренного размножения гибридов кукурузы и их компонентов.

Ключевые слова: гетерозисный гибрид, эксплант, эмбрионид, питательная среда, пролиферация, проращивание семян, стерилизация, субстрат, мужская стерильность, *in vitro*.

М. А. Makarchuk
Uman National University of Horticulture

IMPROVEMENT OF STERILIZATION TECHNOLOGY FOR MICROPROPAGATION OF HYBRID MAIZE (*ZEА MAYS L.*)

The article presents the results of the research of the opportunities of improving the elements of technology of micropropagation of hybrid maize (*Zea mays L.*). The advantages of maize seed germination in the Petri dish on the filter paper moistened with d water under temperature of 20–22 °С and air humidity of 85–87%, which gave the opportunity to receive the material for explants, which are good for efficient proliferation, are shown. The conclusion is made that *in vitro* technologies can be used as a biotechnological element in the breeding process and seed production for quick propagation of maize hybrids and their components.

Key words: heterotic hybrid, explants, embryoid, nutrient medium, proliferation, seed germination, sterilization, substrate, mail sterility, *in vitro*.