

УДК 581.143.6:633.15

## ВПЛИВ ХЛОРИДУ НАТРІЮ НА КАЛЮСОГЕННИЙ І РЕГЕНЕРАЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛИ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

К.В. ДЕРКАЧ<sup>1</sup>, О.Є. АБРАІМОВА<sup>1</sup>, Я.В. СТЕПНЕВСЬКА<sup>2</sup>, Т.М. САТАРОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України

49600 Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14

e-mail: katerina-d-d@yandex.ua

<sup>2</sup>Державний вищий навчальний заклад «Український державний хіміко-технологічний університет»

49005 Дніпропетровськ, просп. Гагаріна, 8

Для ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер показано можливість застосування хлориду натрію для моделювання хлоридного засолення *in vitro*, оцінено вміст хлорид-іонів у калюсній тканині. Інтенсивність надходження хлорид-іонів із поживного середовища в калюси та їх виходу після зняття хлоридного навантаження залежить від генотипних особливостей калюсів, вмісту сахарози в середовищі індукції калюсогенезу, концентрації хлориду натрію. Визначено характер дії різних концентрацій NaCl під час субкультивування, показано можливість отримання рослин-регенерантів з калюсної тканини кукурудзи, субкультивованої на середовищі з 6 г/л хлориду натрію.

*Ключові слова:* *Zea mays* L., культура *in vitro*, калюсогенез, хлорид натрію.

У зв'язку з прогресуючим потеплінням клімату, засоленням ґрунтових вод і ґрунту отримання стійких до абіотичних чинників, зокрема до засолення й посухи, генотипів кукурудзи є актуальним і перспективним напрямом селекційних досліджень в Україні.

Процес накопичення у ґрунті солей (найчастіше хлоридів і сульфатів натрію, кальцію, магнію, карбонатів і нітратів калію) призводить до утворення солонкуватих і солончакових ґрунтів. Він може відбуватись у природних умовах посушливих районів у результаті капілярного підняття солонкуватих і солоних вод, а також під впливом техногенних чинників — надмірного надходження поливної води, незадовільного функціонування водозбірної та дренажної мереж у зрошувальних системах. В останньому випадку зрошувальні й ґрунтові води змішуються, що викликає підймання солей по капілярах до поверхні і засолення зрошуваних земель [1]. Тривала дія підвищеної концентрації хлориду натрію спричинює осмотичний стрес і негативно відбивається на багатьох фізіологічних процесах рослин, зумовлює анатомічні зміни в тканинах і органах, пригнічує мітотичну активність кореневої меристеми [8]. Виявлено спільність механізмів реагування клітин злаків на засолення й посуху *in vivo* та *in vitro*, що виявляється в порушенні осмотичних характеристик. Ростові процеси гальмуються, а в нестійких генотипів — припиняються. У разі засолення збільшується вміст іонів натрію і

кальцію у тканинах, зменшується вміст іонів калію та співвідношення  $K^+/Na^+$ . Як на рівні проростків, так і на рівні калюсної тканини у солестійких форм виявлено вищу активність супероксиддисмутази в нормі й менше зниження активності цього ферменту за осмотичного стресу [10]. При цьому динаміка вмісту хлорид-іонів при засоленні майже не досліджена.

Використання хлориду натрію в культурі *in vitro* дає змогу створювати осмотичне навантаження і тим самим моделювати дію засолення й частково посухи. Відомі роботи, пов'язані з оцінкою та добором генотипів кукурудзи на стійкість до засолення й посухи у польових умовах [9, 14, 15], а також із використанням культури *in vitro* [1, 13], де показано можливість добору стійких до певного рівня засолення генотипів кукурудзи. На середовищах із хлоридом натрію з метою клітинної селекції проведено культивування калюсів пшениці [6], цукрових і кормових буряків [11], ефіроолійної герані [7], кукурудзи [5]. Однак методика клітинної і тканинної селекції *in vitro* для кукурудзи розроблена недостатньо, наявні відомості охоплюють обмежене коло генотипів.

Лінії кукурудзи зародкової плазми Ланкастер перспективні для створення високопродуктивних скоростиглих гібридів, їх використовують у селекції на посухо- і жаростійкість та як донори високої комбінаційної здатності [4].

Метою нашої роботи було дослідження впливу різних концентрацій хлориду натрію на здатність до культивування та регенераційний потенціал калюсної тканини ліній кукурудзи плазми Ланкастер, а також оцінювання вмісту хлорид-іонів у калюсній тканині під час сольового навантаження та після його зняття.

## Методика

Матеріалом для досліджень була калюсна тканина комерційних ліній кукурудзи *Zea mays* L. ДК267, ДК212, ДК298, ДК675, які належать до зародкової плазми Ланкастер, та модельних ліній Chi31, PLS61 (екзотична зародкова плазма). Калюси індукували з незрілих зародків завдовжки 1—1,5 мм на модифікованому середовищі  $N_6$  за [3] з 30 г/л сахарози («Merck», Німеччина) (середовище К1) або 60 г/л сахарози (середовище К2) у темряві. Отримані з обох середовищ 30-добові калюси трансплантували на середовище К1 з різним вмістом хлориду натрію (Хімреактив, Україна) (6 г/л (0,1 н розчин), 30 г/л (0,5 н) та 60 г/л (1 н розчин)) із подальшим пасажуванням на середовища такого самого складу через кожні 30 діб. Через 90 діб за дії NaCl визначали діаметр субкультивованих калюсів. Вплив засолення на калюсну тканину оцінювали за показником «питомий діаметр калюсів», який розраховували як середньоарифметичне значення діаметра одного калюсу на певному середовищі культивування.

У калюсній тканині, субкультивованій протягом 210 діб за дії хлориду натрію, визначали вміст іонів  $Cl^-$  фототурбідиметричним методом за [12] із використанням фотоелектроколориметра КФК-3. Для визначення хлоридів формували середню пробу з 5—10 калюсів, наважка становила 0,5—1,5 г, аналітична повторність дворазова.

Загалом калюси субкультивували на середовищах із певним вмістом хлориду натрію протягом 210 діб, після чого сольове навантаження знімали перенесенням на регенераційне середовище без хлориду

натрію. Через 60 діб субкультивування без дії NaCl в калюсах також визначали вміст хлорид-іонів.

Як регенераційне використовували середовище з мінеральною основою МС з додаванням 690 мг/л *L*-проліну («Merck», Німеччина), 100 мг/л музоїнозиту («Serva», США), 100 мг/л гідролізату казеїну («Sigma», США), 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) («Sigma», США) та 20 г/л сахарози.

Результати оброблено статистично згідно з [2]. Дані в таблицях наведено у вигляді  $x \pm mt_{0,05}$ , де  $x$  — середньоарифметичне значення показника,  $m$  — похибка середньоарифметичного,  $t_{0,05}$  — критерій Стюдента за рівня значущості 0,05.

### Результати та обговорення

Калюси ліній кукурудзи плазми Ланкастер (ДК267, ДК212, ДК298, ДК675) та ліній PLS61, Chi31, індуковані на щитках незрілих зародків на середовищах K1 і K2, трансплантували на середовище K1, доповнене 0; 6; 30 і 60 г/л хлориду натрію, й субкультивували протягом 90 діб. Через 90 діб визначали питомий діаметр калюсів (рисунок). У табл. 1 наведено дані щодо питомого приросту діаметра калюсів за дії різних концентрацій NaCl для всіх досліджених ліній.

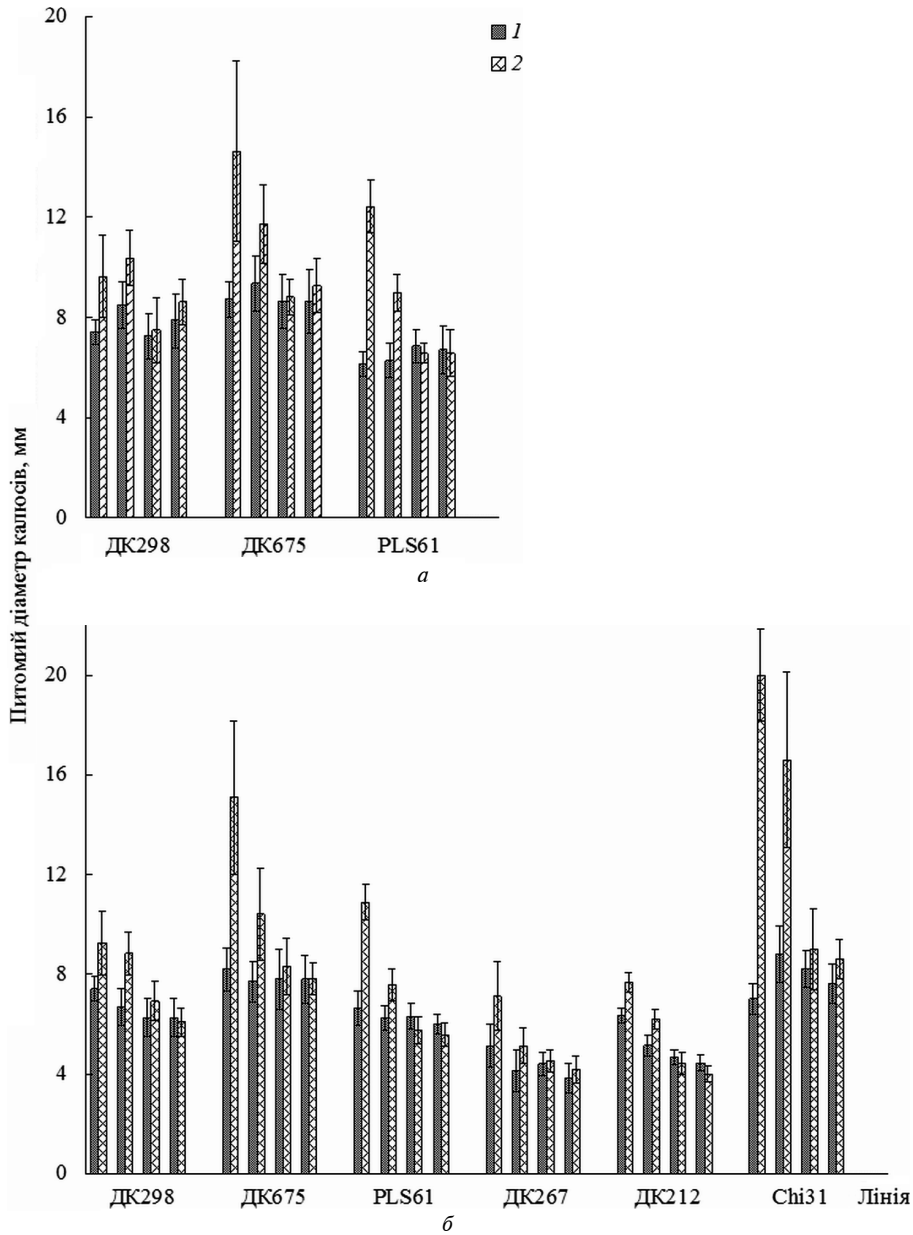
У контрольному варіанті, без дії хлориду натрію, приріст діаметра калюсів за період субкультивування був найбільшим і особливо проявився в ліній ДК675, PLS61, Chi31. За впливу 6 г/л хлориду натрію в середовищі субкультивування діаметр калюсів після 90 діб перевищував вихідний усіх досліджених ліній за обох рівнів сахарози, хоча його приріст був дещо повільнішим, ніж у контролі. За дії 30 і 60 г/л хлориду натрію й обох рівнів сахарози середні значення приросту діаметра калюсів вірогідно не відрізнялись від нуля, про що свідчить перевищення середніх значень довірчими інтервалами (див. табл. 1). За високих концентрацій солі забарвлення калюсів змінювалось із жовтого та блідожовтого на біле.

Отже, для досліджених ліній кукурудзи виявлено, що за концентрації хлориду натрію 6 г/л при субкультивуванні ріст калюсної тканини уповільнюється, але не припиняється, а за 30 і 60 г/л збільшення діаметра калюсів повністю інгібується. Калюси, індуковані на середовищі з підвищеним вмістом сахарози (60 г/л), як у контролі, так і за дії 6 г/л NaCl росли активніше, ніж індуковані за 30 г/л сахарози.

В усіх ліній незалежно від вмісту сахарози в середовищі індукції через 210 діб субкультивування з NaCl вміст хлорид-іонів у калюсах збільшувався (табл. 2). Коефіцієнт кореляції між вмістом хлорид-іонів на

ТАБЛИЦЯ 1. Питомий приріст діаметра калюсів для всіх досліджених ліній кукурудзи після 90 діб субкультивування на середовищах з NaCl, %

Вміст NaCl у середовищі субкультивування, г/л	Вміст сахарози в середовищі індукції, г/л	
	30	60
0	64,7±19,1	72,1±9,9
6	28,8±18,1	41,4±11,1
30	0,6±3,1	3,4±4,0
60	5,3±9,0	2,3±3,3



Питомий діаметр калюсів кукурудзи, індукованих на середовищі з вмістом 30 (а) і 60 г/л сахарози (б), після 90 діб субкультивування на середовищах з NaCl:

1 — вихідний питомий діаметр калюсів, мм; 2 — питомий діаметр калюсів після 90 діб субкультивування на середовищах з NaCl, мм.

П р и м і т к а. У межах кожної лінії зліва направо: питомий діаметр калюсів при субкультивуванні з вмістом NaCl 0 (контроль); 6; 30; 60 г/л

1 г маси сирих калюсів і концентрацією хлориду натрію в середовищі субкультивування становив 0,73 ( $r_{\text{крит } 0,05} = 0,35$ ), що вказує на наявність істотної позитивної й тісної кореляції. Характер виявленої залежності був неоднозначним для різних ліній за двох рівнів сахарози. Так, у контролі досліджені лінії накопичували хлориди на рівні 1,82—2,97 мг Cl<sup>-</sup>/г маси сирих калюсів, окрім PLS61, в якій вихідний рівень цього показника був підвищений. За дії 6 г/л солі рівень хлоридів у різних ліній для

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ

ТАБЛИЦЯ 2. Вміст хлоридів у калюсній тканині кукурудзи, мг Cl<sup>-</sup>/г маси сирих калюсів

Лінія	Вміст NaCl у середовищі субкультивування протягом 210 діб, г/л	Після 210 діб на середовищі з NaCl		Через 60 діб після зняття хлоридного навантаження	
		Вміст сахарози у середовищі індукції, г/л			
		30	60	30	60
ДК267	0	—	2,86±0,06	—	2,68±0,06
	6	—	20,29±0,12	—	6,29±0,61
	30	—	58,15±1,01	—	—
	60	—	175,30±2,70	—	—
ДК212	0	—	2,30±0,05	—	2,29±0,04
	6	—	11,70±0,59	—	2,71±0,06
	30	—	123,08±0,10	—	—
	60	—	150,10±0,31	—	—
ДК298	0	1,88±0,31	2,88±0,05	2,63±0,06	1,17±0,05
	6	24,06±0,54	7,14±0,10	2,24±0,02	3,03±0,05
	30	27,05±0,09	92,21±1,12	7,58±0,47	2,75±0,05
	60	43,73±0,52	107,68±0,91	—	5,72±0,10
ДК675	0	1,82±0,07	2,97±0,04	1,05±0,02	4,55±0,01
	6	19,54±0,21	32,05±0,59	2,10±0,02	4,68±0,03
	30	36,71±1,63	40,44±0,69	3,74±0,04	3,48±0,03
	60	189,27±0,59	50,02±0,14	5,32±0,09	4,75±0,07
PLS61	0	4,30±0,05	8,77±0,06	—	—
	6	14,01±0,15	26,00±0,20	—	—
	30	214,95±1,35	118,75±2,39	—	—
	60	363,66±1,30	338,89±4,34	—	—
Всього	0	2,67±0,32	3,96±0,12	1,84±0,06	2,67±0,09
	6	19,20±0,60	19,44±0,87	2,17±0,03	4,18±0,62
	30	92,90±2,12	86,53±2,91	5,66±0,47	3,12±0,06
	60	198,89±1,52	164,40±5,20	5,32±0,09	5,24±0,12

30 г/л сахарози коливався в межах 14,01—24,06, для 60 г/л сахарози — в межах 7,14—32,05 мг Cl<sup>-</sup>/г маси сирих калюсів. За концентрацій 30 і 60 г/л NaCl, які повністю пригнічували ріст, накопичення хлоридів калюсами різко зростало. За дії 30 г/л солі для 30 г/л сахарози вміст Cl<sup>-</sup>/г маси сирих калюсів становив 27,05—214,95 мг, для 60 г/л сахарози — 40,44—123,08 мг. За субкультивування на 60 г/л солі ці межі підвищувались відповідно до 43,73—363,66 і 50,02—338,89 мг. Великий розмах варіювання між лініями вказував на генотипний контроль інтенсивності поглинання хлоридів. Найбільші абсолютні значення вмісту хлоридів у калюсах виявлено в лінії PLS61, яка з усіх досліджених ліній мала також найвищий вихідний рівень хлоридів.

Отже, ступінь надходження хлоридів із поживного середовища в калюсну тканину залежить від генотипних особливостей калюсів, вмісту хлориду натрію в середовищі субкультивування та вмісту сахарози в середовищі індукції калюсогенезу.

ТАБЛИЦЯ 3. Регенераційний потенціал калюсів кукурудзи, субкультивованих на середовищах з NaCl

Лінія	Вміст NaCl у середовищі субкультивування, г/л	Кількість культивованих калюсів, шт.		Кількість регенерантів, отриманих на 1 калюс, шт.	
		Вміст сахарози в середовищі індукції, г/л			
		30	60	30	60
ДК298	0	—	6	—	0
	6	—	6	—	0,83
PLS61	0	4	4	6,00	5,00
	6	4	5	4,75	2,20
Chi31	0	—	5	—	3,60
	6	—	5	—	1,60
Всього	0	4	15	6,00	2,53
	6	4	16	4,75	1,69

Після зняття хлоридного навантаження шляхом субкультивування протягом 60 діб на безсольовому середовищі хлориди виходили з калюсної тканини (див. табл. 2). Їх вміст залежно від генотипу знижувався до 1,05–7,58 мг Cl<sup>-</sup>/г маси сирих калюсів. При цьому швидкість виходу хлоридів із калюсної тканини залежала від концентрації NaCl у середовищі попереднього субкультивування. Зокрема для 30 і 60 г/л хлориду натрію залишковий вміст хлорид-іонів дещо перевищував контрольні значення.

Рослини-регенеранти були отримані у ліній ДК298, Chi31, PLS61 після субкультивування тільки на контрольному середовищі й на середовищі з 6 г/л хлориду натрію (табл. 3). При субкультивуванні за дії 30 і 60 г/л солі регенерація не відбувалась. За 6 г/л NaCl регенераційний потенціал калюсів знижувався відносно контролю, але був достатнім для отримання регенерантів.

Отже, в результаті проведених досліджень доведено можливість застосування хлориду натрію *in vitro* для моделювання хлоридного засолення, оцінено вміст хлоридів у калюсній тканині. Для досліджених ліній кукурудзи 6 г/л хлориду натрію за субкультивування уповільнює, але не припиняє ріст калюсної тканини, а дія 30 і 60 г/л цієї речовини повністю інгібує збільшення діаметра калюсів. Калюси, індуковані на середовищі з підвищеним вмістом сахарози (60 г/л), як у контролі, так і за дії 6 г/л NaCl росли активніше, ніж індуковані на 30 г/л сахарози. Встановлено, що збільшення концентрації хлориду натрію в середовищі субкультивування спричинює критичне накопичення хлорид-іонів у калюсній тканині. Ступінь надходження хлоридів із поживного середовища в калюсну тканину та вихід хлорид-іонів після зняття хлоридного навантаження залежать від генотипних особливостей калюсів, вмісту сахарози в середовищі індукції калюсогенезу, концентрації хлориду натрію в середовищі субкультивування. Доведено можливість отримання рослин-регенерантів за субкультивування калюсної тканини на середовищі з 6 г/л хлориду натрію.

1. Аль-Холани Х.А.М. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2010. — 24 с.

2. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології. — Харків: Вид-во Харків. ун-ту ім. В.Н. Каразіна, 2007. — 288 с.
3. *Деркач К.В., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М.* Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro* // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. — 2011. — **19(1)**. — С. 16—21.
4. *Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Воскобойник О.В., Нетреба О.О.* Варіювання тривалості періоду «сходи—цвітіння жіночих суцвіть» залежно від умов року, строку сівби та генотипів батьківських форм гібрида // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва УААН. — 2009. — № 37. — С. 22—26.
5. *Долгих Ю.И.* Сомаклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2005. — 384 с.
6. *Дубровна О.В., Моргун Б.В.* Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 6. — С. 463—475.
7. *Егорова Н.А.* Исследование устойчивости к солевому стрессу каллюсных культур эфиромасличной герани // Там же. — С. 523—530.
8. *Жижина М.Н., Кабузенко С.Н.* Влияние биологически активных веществ на митотическую активность клеток корневой меристемы растений кукурузы и ячменя в условиях солевого стресса // Уч. зап. Таврич. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. — 2006. — **19 (58)**, № 4. — С. 80—85.
9. *Омельченко А.В., Кабузенко С.Н., Белоусов А.А., Сериков В.А.* Локализация натрия в компартментах тканей корней и надземной части гибридов кукурузы нового поколения в связи с их солеустойчивостью // Там же. — 2009. — **22 (61)**, № 4. — С. 112—121.
10. *Терлецкая Н.В.* Использование культуры клеток при изучении устойчивости зерновых злаков к абиотическим стрессам // Тез. IX Междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 8—12 сент. 2008). — М., 2008. — С. 390.
11. *Чугункова Т.В.* Використання клітинної селекції для створення стійких форм буряків // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 6. — С. 509—515.
12. *ГОСТ 10671.7—74.* Реактивы. Методы определения примеси хлоридов. — Взамен ГОСТ 10671—63; Введ. 01.07.75. — М.: Изд-во стандартов, 1974. — 5 с.
13. *Al-Naggar A.M.M., Ragab A.I., Al-Bakry M.R.I.* Plant regeneration of some Egyptian maize genotypes from type II callus maintained under water stress condition // Arab J. Biotechnol. — 2011. — **14**, N 1. — P. 49—60.
14. *Farhad W., Cheema M.A., Saleem M.F., Saqib M.* Evaluation of drought tolerant and sensitive maize hybrids // Int. J. Agr. Biol. — 2011. — **13**. — P. 523—528.
15. *Obeng-Bio E., Bonsu M., Obeng-Antwi K., Akromah R.* Establishing the basis for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) using some secondary traits in the field // Afr. J. Plant Sci. — 2011. — **5(12)**. — 702—709.

Отримано 20.08.2012

#### ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА КАЛЛЮСОГЕННЫЙ И РЕГЕНЕРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛЫ ЛИНИЙ КУКУРУДЫ ПЛАЗМЫ ЛАНКАСТЕР

*Е.В. Деркач<sup>1</sup>, О.Е. Абраїмова<sup>1</sup>, Я.В. Степневская<sup>2</sup>, Т.Н. Сатарова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Государственное учреждение Институт сельского хозяйства степной зоны Национальной академии аграрных наук Украины, Днепропетровск

<sup>2</sup> Государственное высшее учебное заведение «Украинский государственный химико-технологический университет», Днепропетровск

Для линий кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер показана возможность применения хлорида натрия для моделирования хлоридного засоления *in vitro*, оценено содержание хлорид-ионов в каллюсной ткани. Интенсивность поступления хлорид-ионов из питательной среды в каллюсы и их выход после снятия хлоридной нагрузки зависит от генотипических особенностей каллюсов, содержания сахарозы в среде индукции каллюсогенеза, концентрации хлорида натрия. Определен характер действия разных концентраций NaCl при субкультивировании, показана возможность получения растений-регенерантов из каллюсной ткани кукурузы, субкультивированной на среде с 6 г/л хлорида натрия.

INFLUENCE OF SODIUM CHLORIDE ON CALLUSOGENESIS AND REGENERATIVE POTENTIAL OF MAIZE INBREDS OF LANCASTER GERmplasm

*K.V. Derkach<sup>1</sup>, O.E. Abraimova<sup>1</sup>, Ya.V. Stepnevska<sup>2</sup>, T.M. Satarova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Agricultural Steppe Zone Institute, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
14 Dzerzhynskiy St., Dnipropetrovsk, 49600, Ukraine

<sup>2</sup>Ukrainian State University of Chemical Technology  
8 Gagarin Pr., Dnipropetrovsk, 49005, Ukraine

For maize inbreds of Lancaster germplasm the possibility of the application of sodium chloride to simulate chloride salinification in vitro is shown and the contents of chloride ions were estimated. Intensity of chloride uptake from nutrient medium to callus tissue and exit of chloride-ions after removal of the chloride load depended on genotypic peculiarities of calli, sucrose contents in the medium of callus induction and the concentration of sodium chloride. The pattern of the action of different concentrations of NaCl under subcultivation is determined and the possibility to receive regenerants from maize callus tissue, subcultivated on the medium with 6 g/l sodium chloride is shown.

*Key words:* *Zea mays* L., culture in vitro, callusogenesis, sodium chloride.