УДК 581.143.6: 58.085

# ВЛИЯНИЕ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОЗЫ НА ЭМБРИОИДОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ НЕОПЫЛЕННЫХ ЗАВЯЗЕЙ КУКУРУЗЫ

**АЛАТОРЦЕВА Татьяна Алексеевна**, *Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского*

***Для оптимизации условий получения гаплоидных растений в культуре неопыленных завязей кукурузы исследовали эффективность снижения концентрации сахарозы в питательной среде в процессе культивирования. Донорами эксплантов являлись одна апомиктичная и шесть амфимиктичных линий кукурузы. Завязи переносили с исходной среды (9,0 % сахарозы) на новую среду (2,0 % сахарозы) через 7, 14, 21, 28, 35, 45, 55 суток от момента инокуляции. У амфимиктичных линий завязи дегенерировали во всех вариантах эксперимента, не дав новообразований. У апомиктичной линии гибель эксплантов наблюдалась только при непродолжительном (7 суток) выдерживании их на исходной питательной среде. В остальных случаях завязи оставались жизнеспособными и продуцировали эмбриональные новообразования с частотой от 2,3 до 6,5 %. При этом отсутствовала корреляционная связь между частотой морфогенеза и длительностью первичного культивирования. Полученные результаты позволяют рекомендовать для индукции эмбриоидогенеза в неопыленных завязях кукурузы линии АТ-1 беспересадочное культивирование на среде с 9,0 % сахарозы.***

Разностороннее использование гаплоидных растений в селекции ведет к возрастающему спросу на них. Однако многие методы, применяемые для индукции гаплоидии, трудоемки и малопродуктивны. Более перспективным в этом отношении может быть метод культуры изолированных пыльников, неопыленных завязей и семяпочек, позволяющий значительно ускорить процесс массового получения гаплоидных растений. Особенно эффективно использование женских генеративных органов в качестве первичных эксплантов для форм с цитоплазматической мужской стерильностью [11, 19], а также для генотипов, у которых андрогенез ведет к высокому выходу альбиносов среди регенерантов.

Что касается кукурузы, то метод получения гаплоидных растений путем гиногенеза разработан для нее недостаточно. В некоторых случаях при культивировании неопыленных завязей кукурузы удавалось индуцировать только развитие гаплоидного каллуса [18]. Успешные эксперименты по получению гаплоидных регенерантов в настоящее время немногочисленны [5, 6, 15, 17].

Получение гаплоидов *in vitro* в культуре неопыленных завязей и семяпочек – многоступенчатый процесс, требующий на каждом этапе культивирования определенных условий и сбалансированной питательной среды. Особенно важно адекватное соотношение регуляторов роста и углеводов на стадии инициации. Начальные деления клеток зародышевого мешка в изолированных завязях и семязачатках крайне редко обнаруживаются на безгормональных питательных средах [1, 7, 13, 14, 16]. Также не часто развитие эмбриональных новообразований из яйцеклетки или других элементов зародышевого мешка до целого растения проходит на исходной среде без пересадки. Оно описано лишь для пшеницы, риса и сахарной свеклы [8, 9, 20]. Количество тех или иных компонентов среды во многом определяется генотипическими особенностями донорных растений. Не является исключением и количество углевода. Для культуры неопыленных завязей кукурузы в одних исследованиях было отмечено эффективное использование сахарозы в концентрации 12,0 %, а на этапе регенерации уменьшалось только количество 2,4-Д – с 3,0 до 0,02 мг/л [17]. В других работах в процессе культивирования количество сахарозы снижалось с 4,0 до 3,0 % [10].

Цель нашего исследования заключалась в оценке эффективности длительного культивирования неопыленных завязей кукурузы апо- и амфимиктичных линий на исходной питательной среде.

***Методика исследований.*** Объектами исследования являлись одна апомиктичная линия кукурузы АТ-1 и шесть амфимиктичных линий (ГПЛ-1, ГПЛ-14, ГПЛ-63, ГПЛ-76, ТМ, ЗMig). Для линии АТ-1 характерен неиндуцированный тип гаплоидии. Линия сходна с псевдогамными апомиктами, у которых зародыш развивается партеногенетически, а для нормального развития эндосперма необходимо оплодотворение центральной клетки [4].

Растения выращивали в полевых условиях. Чтобы исключить случайное опыление, початки до начала цветения накрывали пергаментными изоляторами. Завязи всех исследуемых линий отбирали для эксплантации спустя 5 суток после появления рылец из початка. Культивирование эксплантов проводили в темноте, в пробирках, на питательной среде, содержащей макро- и микроэлементы MS [12], витамины, сахарозу (9,0 и 2,0 %), 2,4-Д (2,0 мг/л), агар-агар. В качестве дезинфицирующих средств для эксплантов использовали этанол (70 %) и раствор натриевой соли этилмеркуртиосалициловой кислоты (30 мг/л) с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой. Экспланты помещали на исходную среду, содержащую 9,0 % сахарозы и 2,0 мг/л 2,4-Д. Затем спустя 7, 14, 21, 28, 35, 45, 55 суток завязи переносили на питательную среду того же состава, но с уменьшенным до 2,0 % количеством сахарозы. Часть эксплантов оставляли в первоначальных условиях без пересадки.

Гистологическое исследование проводили спустя 65 суток от начала культивирования. Препараты срезов завязей окрашивали с использованием тройной окраски [2, 3] и анализировали с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия).

***Результаты исследований.*** Культивирование эксплантов амфимиктичных линий кукурузы (ГПЛ-1, ГПЛ-14, ГПЛ-63, ГПЛ-76, ТМ, ЗMig) не привело к появлению эмбриональных новообразований и, следовательно, гаплоидных растений. Некротические явления были зафиксированы в семязачатках всех сроков субкультивирования.

У апомиктичной линии кукурузы АТ-1 снижение концентрации сахарозы в искусственной питательной среде через семь суток вызывало дегенерацию эксплантов. Если пересадка завязей на среду с пониженной концентрацией сахарозы проводилась в более поздние сроки или они оставались на исходной среде до окончания культивирования без пересадки, то они сохраняли свою жизнеспособность. Через 30–35 суток на некоторых эксплантах как на исходной среде, так и на среде с более низкой концентрацией сахарозы из-под покровов завязей появлялись «грозди» многочисленных эмбриоидоподобных структур (рис. 1).

Некоторые из них здесь же, в системе завязи, могли прорастать и давать начало регенерантам.

Через 65 суток от начала культивирования был проведен гистологический анализ эксплантов, не имевших внешних признаков эмбриоидогенеза. Во всех вариантах субкультивирования, за исключением семи суток, были обнаружены завязи с новообразованиями с частотой от 2,3 до 6,5 %. Новообразования представляли собой проэмбрио или проэмбрио с развившимися на их поверхности эмбриоидоподобными структурами (рис. 2).

Полученные данные позволяют констатировать, что эмбриоиды образуются в результате «почкования» партеногенетического зародыша. Партеногенетическое развитие последнего, судя по всему, у данной линии кукурузы может инициироваться как в условиях *in vivo,* так и *in vitro*. Разное время индукции яйцеклетки к партеногенезу объясняет неодновременное появление эмбриоидов в разных эксплантах.

Снижение концентрации сахарозы в питательной среде через 14–55 суток эксплантации достоверно не изменяет частоту эмбрио- и эмбриоидогенеза (рис. 3). Не обнаружено достоверных различий и между вариантом, когда субкультивирования не проводили, и вариантами, когда концентрацию сахарозы снижали через 14–55 суток. Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование неопыленных завязей кукурузы линии АТ-1 можно проводить на исходной среде без пересадок на среды с пониженным содержанием углевода.

***Выводы.*** Успех культивирования неопыленных завязей исследуемых линий кукурузы на данных питательных средах определяется способом размножения донорных растений. Завязи шести амфимиктичных линий кукурузы независимо от сроков пересадки на новую среду дегенерировали, не дав новообразований. Только в семязачатках апомиктичной линии АТ-1 можно обнаружить апомиктично возникшие проэмбрио и проэмбрио с появившимися на их поверхности эмбриоидоподобными структурами.

Предрасположенность донорной линии к партеногенезу *in vivo* и способность сохранять подобное свойство в неопыленных завязях при культивировании *in vitro* являются главными причинами того, что становится неэффективной смена среды в ходе эксплантации. Об этом свидетельствует отсутствие корреляционной связи между частотой эмбриональных новообразований в конце культивирования и продолжительностью выдерживания завязей на исходной среде.

В связи с вышесказанным полагаем, что для неопыленных завязей кукурузы линии АТ-1 может быть рекомендовано беспересадочное культивирование на исходной питательной среде названного состава.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алаторцева Т.А., Тырнов В.С.* Гормононезависимое проявление эмбриогенеза *in vitro* у партеногенетической линии кукурузы // Бюл. бот. сада СГУ. – 2003. – Вып. 2. – С. 158–160.

2. *Камелина О.Н., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А.* Способ окраски препаратов эмбриологических структур растений / АС № 1631424 СССР, кл. G 01 33/18. 25.10.1988.

3. *Камелина О.Н., Проскурина О.Б., Жинкина Н.А.* К методике окраски эмбриологических препаратов // Бот. журн. 1992. – Т. 77. – № 4. – С. 93–96.

4. *Тырнов В.С., Еналеева Н.Х.* Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Докл. АН СССР. – 1983. № 3. – С.722–725.

5. *Alatortseva T.A., Tyrnov V.S.* Reproducing of haploid and

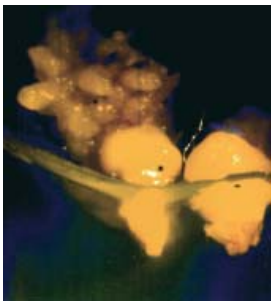


***Рис. 1. Эмбриоидогенез в культуре неопыленных завязей кукурузы линии АТ-1 (э – эмбриоиды)***

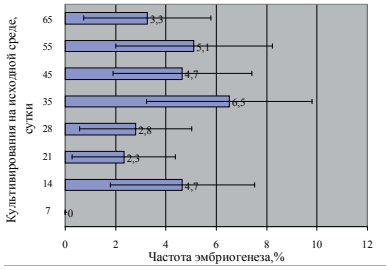
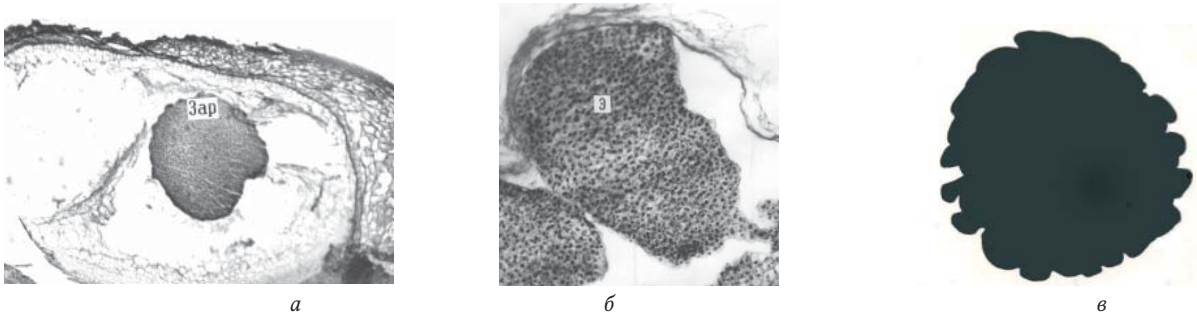



***Рис. 3. Зависимость частоты эмбриогенеза от длительности культивирования неопыленных завязей кукурузы линии АТ-1 на исходной питательной среде***




*а* *б* *в*

***Рис. 2. Эмбриональные структуры, развившиеся в культивируемых неопыленных завязях кукурузы линии АТ-1: а – зародыш (зар) в полости завязи; б – эмбриоид (э), возникший на поверхности проэмбрио; в – проэмбрио с развившимися на его поверхности эмбриоидами (э)***

diploid maize forms *in vitro* // Maize Genet. Coop News. Lett., 2001, 75: 56.

6. *Ao G.M., Zhao S.X., Li G.H.* Induction of haploid plantlets from unpollinated maized ovaries in ovaries *in vitro* // Acta Genetica Sinica, 1982, Vol. 9, No. 4, P. 281–283.

7. *Dore C.* Obtention de plantes haploides de chou cabus (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata*) apres culture *in vitro* d'ovules pollinises par du pollen irradie // C.R. Acad. Sci. Paris, Ser 3, 1989, Vol. 309, No. 19, P. 729–734.

8. *Gibson M.S.* Dihaploid plant production from ovules cultures of sugar beet// Proc. N. D. Acad. Sei., 1987, P. 41–44.

9. *He C.P., Yang H.Y.* Picloram as an exogenous hormone promotes embryoid differentiation in rice ovary culture // Acta Biol Exp Sin, 1987, Vol. 20, No. 3, P. 283–291.

10. *Huang G., Gu M., He S.* Observation of induced maize (*Zea mays*) parthenocarpy by culture of ears *in vitro* // Apomixis Newsletter, 1991, No. 30, P.9.

11. *Hosemans D., Bossoutrot D.* Induction of Haploid Plants from *in vitro* Culture of Unpollinated Beet Ovules (*Beta vulgaris* L.) // Z. Pflanzenzucht, 1983, 91, No. 1, S. 74–77.

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // Physiol. Plant., 1962, 15 (3): 473–497.

13. *Raquin C.* Induction of haploid plants by *in vitro* culture of Petunia ovaries pollinated with irradiated pollen // Z. Pflanzenzucht. 1985, Vol. 94, No. 2, P. 166–169.

14. *Sauton A.* Doubled haploid production in melon (*Cucumis melo* L.) // Cucurbitaceae'88: proc. EUCARPIA Meet. Cucurbit Genet. and Breed., Avignon-Montfavet, May 31 – June 1–2. Paris, 1988, P. 119–128.

15. *Tang F., Tao Y., Zhao T. Y., Wang G. In vitro* production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*) // Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 2006,Vol. 84, Issue 2, P. 233–237.

16. *Truong-Andre I, Demarly Y.* Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries ( *Zea mays* L.) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant // Z Pflanzenzucht, 1984, 92, P. 309–320.

17. *Truong-Andre I. In vitro* haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber // Cucurbitaceae'SB: proc. EUCARPIA Meet. Cucurbit Genet, and Breed., Avignon-Montfavet, May 31 – June 1–2. Paris, 1988, P. 143–144.

18. *Uchimiya H., Kameya T., Takanashi N. In vitro* culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and *Zea mays* // Jpn. J. Breeding, 1971, Vol. 21, P. 247–250.

19. *Zhang S., Zhang Z., Liu Z., Shen Y., Si Z.* Индукция гаплоидов из неопылённых семяпочек мужскистерильной линии пшеницы. Yichuan = Hereditas (China), 1993, Vol. 15, No. 1, P. 20–21.

20. *Zhu Z.C., Wu H.S. In vitro* production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum* // Acta Genet. Sin., 1979, Vol. 6, No. 2, P. 181–183.

**Алаторцева Татьяна Алексеевна,** *канд. биол. наук, доцент кафедры генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. Россия.*

*410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.*

*Тел.: (8452) 52-27-03; e-mail: alatortsevata@mail.ru.*

***Ключевые слова**: гаплоиды; кукуруза; неопыленные завязи; in vitro; сахароза; эмбриоиды.*

**THE EFFECT OF A SUCROSE CONCENTRATION DECLINE ON THE EMBRYOIDOGENESIS IN MAIZE UNPOLLINATED OVARY CULTURE**

**Alatortseva Tatyana Alekseevna**, *Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the chair "Genetics", Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky. Russia.*

***Keywords:** haploids; maize; unpollinated ovaries; in vitro; sucrose; embryoids.*

***The effect of sucrose concentration decline in the nutrient medium was investigated for optimizing of the maize haploid production in a culture of unpollinated ovaries. The explants donors were one apomictic and six amphimictic lines. Ovaries were transferred from the initial medium (9.0% sucrose) to a new medium (2,0% sucrose) at 7, 14, 21, 28, 35, 45, 55 days after inoculation. The ovaries of amphimictic lines were degenerated in all variants. The new regenereited structures was not detected. The explants of apomictic lines were died only when they were cultivated on the initial nutrient medium for 7 days. In other cases, the ovaries produced a new regenereited structures with a frequency of 2,3 to 6,5%. The correlation between the frequency of morphogenesis and the duration of primary cultivation was not detected. The obtained results make it possible to recommend the medium complemented cultivation with 9,0 % sucrose for the direct cultivation of unpollinated ovaries for apomictic maize line AT-1.***

**УДК 631.445.51:631:82:633:171**

# КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРОСА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА СВЕТЛО-КАШТАНОВОЙ ПОЧВЕ САРАТОВСКОГО ЗАВОЛЖЬЯ

**БЕЛОГОЛОВЦЕВ Владимир Петрович,** *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

**ПОПОВ Геннадий Николаевич,** *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

**ДАНИЛОВ Александр Никифорович,** *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

**ЛЕТУЧИЙ Александр Владимирович**, *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

***В трехлетнем полевом опыте на светло-каштановой почве выявлены закономерности и тесные зависимости между содержанием доступных растениям форм питательных веществ в почве, содержанием общего азота и фосфора в растениях и урожайностью проса Саратовское 10. Установлены уровни оптимального содержания нитратного азота и подвижного фосфора в диагностируемом слое почвы и нормативы затрат действующего вещества удобрений для их достижения. Также определены уровни содержания общего азота и фосфора в растениях в основные фазы роста и развития и нормативы затрат действующего вещества удобрений для их достижения. Это дает возможность разработать оптимальные системы азотно-фосфорного удобрения для достижения планируемой урожайности.***

В условиях Саратовского Заволжья просо является одной из распространенных культур, от урожайности которой зависит стабильность производства зерна. Установлено, что просо отличается высокой отзывчивостью на улучшение минерального питания [1, 3, 5]. Повышение урожайности проса и по-