

Проучване възможностите за спасяване на отдалечени хибриди царевица посредством ембриокултивиране *In vitro*

Мария Лакова-Горнишка, Люба Глогова, Соня Горановска

Abstract: *The possibilities for application of embryo culture as an effective method for obtaining the various crosses of cultivated maize (Zea mays L.) with the multiannual tetraploid form Tripsacum dactyloides (2n=72). Used in the conventional techniques for obtaining such hybrids rarely complete successfully for differences in them flower authorities and also as a result of disturbances in embryogenesis. The present study aims at to follow the most common moments in the reaction of the tested genotypes to in vitro conditions and to examine the effect and to optimize the hormonal composition of Chu's basal culture medium (N6). As the most suitable for the development of the embryos is determined their cultivation on the culture medium, containing a greater quantity phytohormones(0.00044 μmol 2.4D in combination with 0.00011 μmol kinetin).*

Key words: *Zea mays, Tripsacum dactyloides, embryoculture, regeneration, interspecific hybridisation*

УВОД

Приложен при отдалечената хибридизация на царевицата, методът на ембриокултурата предоставя потенциална възможност за преодоляване бариерата на кръстосваемост и спомага интрогресията на полезни признаци от отдалечените видове в царевичния геном [6, 7]. Настоящото изследване има за цел да илюстрира кръстосваемостта на мутантни линии царевица с дивия вид *Tr. Dactyloides* и да изпита възможностите на ембриоспасяването *in vitro* [1, 2, 4, 5] за получаването на такива кръстоски.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа е изведена в лабораторията по тъканни култури към Институт по царевицата - Кнежа, през 2008 година, като за обект на изследването послужиха кръстоски на различни мутантни линии царевица (*Zea mays* L.) с многогодишната тетраплоидна форма *Tr. Dactyloides* (2n=72). Хибридизацията беше осъществявана при полски условия по изготвена от Мангелсдорф и Рийвс (1939 г.) методика, състояща се в подрязване близълцата на царевичния родител. След достигане на 20 дневна възраст, маркираните в деня на опрашване кочани бяха прибирани за изолиране на незрелите зародиши. За протекла отдалечена хибридизация сигнализираха семената с дефектен, непълноценно развит или липсващ ендосперм, което води до възпрепятстване на по-нататъшното нормално развитие на ембрионите и не би позволило получаването на желаните генетични комбинации. Всички изглеждащи по този начин семена бяха повърхностно стерилизирани с хипохлорид (5 % разтвор на „Доместос“) за 30 минути, след което бяха трикратно промивани със стерилна вода. Незрелите ембриони бяха изолирани при асептични условия и въвеждани в култура върху основна хранителна среда N6 (Chu, С.С.,(3), 1978) в две разновидности: 1 - с добавка на 0.00022 μmol 2,4-Д и 0.00011 μmol kinetin; 2 - с добавка на 0.00044 μmol 2,4-Д и 0.00011 μmol kinetin. Стерилизацията извършвахме чрез автоклавиране при температура 121 °С и налягане 1.5 psi за 25 минути след предварително коригиране на рН до 5.6. През първите две седмици от началото на експеримента култивирахме зародишите на тъмно при температура 260 ±1 °С, а впоследствие прехвърляхме новоформираните растения във фитостатно помещение за доотглеждане. Всички нормалноразвити растения с добре формирана коренова система поставяхме за вкореняване в саксийки с торфено- зеолитна смес, като адаптирането им към *ex vitro* условията осъществявахме чрез първоначално култивиране под покритие с постепенно удължаване експозицията им при условия на нормална въздушна влажност /сн.1/.



а) първоначално адаптиране на регенерантите под покритие



б) култивиране на регенерантите при експозиция на нормална въздушна влажност

Сн.1. Адаптация на регенерантите от междувидовите кръстоски.



а) ембриокултивиране върху хранителна среда тип 1, с по-ниско съдържание на 2.4 D



б) ембриокултивиране върху хранителна среда тип 2, с по-високо съдържание на 2.4 D

Сн.2 Ефект на хранителната среда върху развитието на ембриони от кръстоската XM0297 x *Tripsacum dactyloides* L.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Кръстоска ХМ 94/500 x *Tripsacum dactyloides* L.
2. Кръстоска ХМ 94/521 x *Tripsacum dactyloides* L.
3. Кръстоска ХМ 94/612 x *Tripsacum dactyloides* L.
4. Кръстоска ХМ 94/516 x *Tripsacum dactyloides* L.

Получените резултати от изпитване влиянието на двете разновидности хранителна среда на *Chu* върху растежа и развитието на въведените в култура ембриони от тези кръстоски показаха че по-високото съдържание на 2,4-D в тези случаи предлага по-добра възможност за формообразуване и успешна регенерация. И при четирите генотипа хранителна среда тип 2 оказва висок стимулиращ ефект върху формообразователните процеси на ембрионите, изразяващ се в наличието на свежа, зелена листна маса, интензивно стъблонарастване и коренообразуване /фиг.1а/, докато по-ниското съдържание на фитохормони се отрази негативно на заложените експлантите, чийто растеж и развитие бяха депресирани и впоследствие блокирани. Следователно добавката на по-голямо количество фитохормони за тези генотипове е по-скоро ефективна мярка с положителен ефект върху развитието на хибридните ембриони и по този начин повишава възможностите за успешна регенерация на растения.

5. Кръстоска ХМ 0297 x *Tripsacum dactyloides* L.
6. Кръстоска ХМ 521 x *Tripsacum dactyloides* L.

За развитието на ембрионите от тези кръстоски като приоритетно определихме култивирането им върху хранителна среда 1, чието по-ниско съдържание на 2.4-D оказва видимо по-добър резултат върху образуването на органи (корени и листа). Въвеждането в култура на ембриони от същите генотипове върху хранителна среда 2 не даде очакваният положителен ефект, като констатираните резултати илюстрираха сравнително ниска жизненост на експлантите от тези кръстоски, липса на активно нарастващ връх и зелени части /сн.2/.

7. Кръстоска ХМ 98/24 x *Tripsacum dactyloides* L.
8. Кръстоска ХМ 0338 x *Tripsacum dactyloides* L.

При анализиране на данните, получени от изпитване влиянието на хранителни среди 1 и 2 върху ембрионите от тези кръстоски не се установиха съществени различия в растежа и развитието на отделните генотипове. И при двата тествани варианта на N6 беше отчетен позитивен ефект върху развитието на надземната част и интензивността на ризогенез на въведените в култура експлантите. Можем да обобщим че в случая добавката на по-голямо количество фитохормони не доведе до разлика във възможностите за инициране на регенерационен процес и че въвеждането в култура се оказа еднакво успешно за спасяване на ембрионите, независимо от различното количество на 2.4 D.

9. Кръстоска ХМ 568/1 x *Tripsacum dactyloides* L.

Получените резултати показват че за ембрионите от тази кръстоска методът на въвеждане в култура върху основната хранителна среда на *Chu* не е достатъчно ефективен, въпреки различното по количество съдържание на фитохормони, и не предоставя всички необходими за нормалното развитие на зародишите вещества, които да компенсират липсата на ендосперм и да поемат успешно неговата функция по изхранване на плода. От направените наблюдения може да се констатира че при по-голямата част от заложените експлантите изобщо не беше регистрирано покълване, а в единичните случаи на отчетено такова, новоформираните растения изоставаха в растежа и развитието си, пожълтяваха и постепенно отмираха.

ИЗВОДИ

- Оптималният хормонален състав на тестваната за въвеждане в ембриокултура хранителна среда на *Chu* е в пряка зависимост от генотипа и варира за всяка от изследваните кръстоски.

- За по-голяма част от анализиранияте генотипове използването на хранителна среда 2 с по-високо съдържание на 2,4-D създава по-добра възможност за развитие на ембрионите и оказва по-благоприятно влияние върху процеса на регенерация на растенията.
- Методът на ембриокултурата позволява ефективно преодоляване бариерата на некръстосваемост и несъвместимост при отдалечената хибридизация и оптимизира получаването на ценни генетични комбинации на линии царевица с *Tripsacum dactyloides* L.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Божинов, Б., 2000. Възможности за използване на ин витро техники в селекцията на памука. Дисертация, ВАК.
- [2] Bronsema F. B. F., van Oostveen W. J. F., van Lammeren A. A. M., 2001. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. – *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 45–56.
- [3] Chu C.C., 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.*, Peking, 43.
- [4] Garcia M.D., M. Del, and C. Molina, 2001. Embryo rescue and induction of somatic embryogenesis as a method to overcome seed inviability in *Zea mays* ssp. *Mays* x *Zea mays* ssp. *parviglumis* crosses. *Biologia plantarum* 44 (4), 497- 501.
- [5] Conger B. V., F. J. Novak, R. Afza and K. Erdelsky, 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports* 6, 345- 347.
- [6] Matthys-Rochon E., Piola F., Le Deunff E., Mol R., Dumas C., 1998. In vitro development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. – *Journal of Experimental Botany*. 49, 322: 839–845.
- [7] Vasil V., Lu C., Vasil I.K., 1985. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). – *Protoplasma*. 127: 1-8.

За контакти:

Ас. Мария Лакова-Горнишка, Секция “Генетика, селекция и семепроизводство”, Институт по царевицата - Кнежа, тел.: 0886438680, e-mail: maria_lakova@mail.bg

Докладът е рецензиран.