

# **ОСОБЛИВОСТІ МЕХАНІЧНОЇ ТА ЕНЗИМАТИЧНОЇ ІЗОЛЯЦІЇ ЗАРОДКОВИХ МІШКІВ ТА ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ (*Zea mays* L.)**

**Ляпустина О.В.**

**Сатарова Т.М.**

**Заколесник Н.В.**

**Українець О.**

**Україна, Дніпропетровськ, Державний вищий навчальний заклад «Український  
державний хіміко-технологічний університет»**

В статті описані особливості механічної і ферментативної ізоляції зародкових мішків і зародків на ранній ембріональній стадії з метою їх подальшого використання в роботах по штучному оплодотворенню і ембріогенезу *in vitro* у кукурудзи.

У вивченні процесу репродукції у рослин іп УШГО в даний час досягнутий значний прогрес, який дозволяє в генеративних структурах, ізолюваних від рослинного організму, успішно здійснювати процеси гаметогенезу, запилення, запліднення, ембріогенезу і ендосперміогенезу [1, 4, 5, 7]. Удосконалення техніки ізоляції чоловічих і жіночих гамет, їх злиття і ембріогенез іп УШГО з одержаних в результаті штучного запліднення зигот відкривають широкі перспективи для вивчення механізму подвійного запліднення та оцінки експресії трансгенів в залежності від типу гамет [7]. Ізоляція репродуктивних структур необхідна для запліднення іп УШГО, ембріокультури, подолання природних бар'єрів несумісності та подолання стерильності за віддаленої гібридизації та інших біотехнологічних та селекційних програмах [2].

Власне процес запліднення і особливо ранні етапи розвитку зародка і ендосперму іп УШГО проходять при глибокому зануренні в тканині материнського організму - нуцеллуса і інтегументов, які після запліднення формують відповідно перисперм (у певних видів) і насінневу оболонку. Штучне ж запліднення іп УШГО передбачає ізоляцію гамет і їх примусове злиття іп УШГО [3]. Дана техніка складається з декількох етапів, які разом дозволяють ефективно здійснювати цей складний природний процес. Цими етапами є ізолювання зародкових мішків і яйцеклітин, ізолювання сперміїв, злиття гамет іп УШГО, культивування зигот і зиготовміщуючих зародкових мішків, культура молодих зиготичних зародків і ендосперму.

У теперішній час технології ізоляції репродуктивних структур кукурудзи розроблено не достатньо, відсутні дані щодо кореляції динаміки розвитку зернівок, зародкових мішків, зародків та ендосперму у різних генотипів. Відсутність чітких, надійних методик ізоляції репродуктивних структур кукурудзи обумовлює недосконалість процесу злиття в штучних умовах яйцеклітин зі сперміями та розвитку проембріо *in vitro*.

У зв'язку з актуальністю техніки ізоляції репродуктивних структур, нерозробленістю питань в області технології штучного запліднення та ембріогенезу метою нашої роботи

було вдосконалення методики ізоляції зародкових мішків та молодих зародків кукурудзи. Оптимізація техніки ізолювання саме цих структур не тільки готує базу для розробки техніки штучного запліднення, але й забезпечує можливість культивування ізольованих незрілих зародків, починаючи з перших етапів розвитку.

Для досягнення мети були поставлені завдання провести морфометричні дослідження зародкових мішків, зернівок та качанів, в період з 1 - 10 добу після запилення, встановити коефіцієнти парної кореляції між морфометричними показниками, що характеризують зародковий мішок, зернівку та качан після запилення, розрахувати рівняння регресії між морфометричними показниками, дослідити вплив целюлази в концентраціях 1%, 2%, 3%, 4%, температурної обробки у діапазоні 20°C та 35°C та експозиції ферментативної та температурної обробки на ступінь мацерації тканин молодого зернівки кукурудзи.

Під час роботи в якості об'єкту дослідження було використано гібрид кукурудзи Дніпровський 310, насіння якого було люб'язно надано відділом селекції Інституту зернового господарства УААН. Кукурудза - одна з найважливіших сільськогосподарських культур. Кукурудза - культура високої продуктивності і різностороннього використання. Кукурудза використовується як кормова, харчова та технічна культура. Зацікавлення цією культурою пояснюється високими кормовими якостями зерна та значною перевагою її врожайності в порівнянні з іншими зерновими культурами [6].

Для ізоляції репродуктивних структур кукурудзи використовували механічне виділення під мікроскопом та виділення за допомогою ферментативної обробки. Зародки видаляли надавлюванням покривного скла на предметне, де знаходився зародковий мішок у краплі води. Для мацерації тканин використовували фермент целюлазу у концентраціях залежно від варіанту досліду 1; 2; 3; 4% з експозицією 10; 15; 20хв. та температурою - 20°C та 35°C. Для цього зародковий мішок поміщали в 0,2 мл ферменту певної концентрації на відповідний час при певній температурі.

В результаті дослідження встановлено, що між діаметром качана та довжиною зародкового мішка існує лінійна залежність, що характеризується коефіцієнтом кореляції  $r = 0,96$  (достовірний на рівні значущості 0,05) та рівнянням регресії  $y = - 1,03 + 0,07x$ , де  $y$  - довжина зародкового мішку,  $x$  - одна з морфометричних характеристик зернівки. Між довжиною зернівки та довжиною зародкового мішка також встановлено лінійну залежність, що характеризується коефіцієнтом кореляції

$r = 0,72$  (достовірний на рівні значущості 0,05) та рівнянням регресії  $y = -0,46 + 0,24x$ . Між шириною зернівки та довжиною зародкового мішка залежність також лінійна і характеризується коефіцієнтом кореляції  $r = 0,76$  (достовірний на рівні значущості 0,05) та рівнянням регресії  $y = -0,44 + 0,25x$ .

Виявлено, що для мацерації тканин молодої насінини є оптимальним використання целюлази в концентрації 4% при температурі 35°C та експозиції 15 хвилин.

Розроблені методи виділення репродуктивних структур кукурудзи дозволяють виділяти зародкові мішки та зародки на ранній ембріональній стадії.

Описані особливості ізоляції зародкових мішків та встановлені залежності між морфометричними характеристиками зернівок і зародкових мішків економічно доцільними, бо дають змогу значно зменшити час при виборі необхідних розмірів качанів та зернівок в польових умовах, з метою подальшого видалення з них зародкових мішків.

#### Перелік посилань

1. Батыгина Т.Б. *Хлебное зерно: Атлас*. - Л.: Наука. Ленинград. отд., 1987. - 103 с.
2. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. *Біотехнологія рослин: Підручник* - К: ПоліграфКонсалтинг, 2003. - 520 с.
3. Мусієнко М.М. *Фізіологія рослин: Підручник*. -К: Либідь, 2005. -808 с.
4. Сатарова Т.Н. *Искусственное оплодотворение у кукурузы и перспективы его использования // Вісник Дніпропетровського університету. Сер. Біологія. Екологія.* - 2006. - №4 - С.172-176.
5. Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Вороний Е.С. и др. *Сельскохозяйственная биотехнология*. - М.: Высшая школа, 2003. - 469 с.
6. Циков В.С. *Технология, гибриды, семена*. - Днепропетровск: Институт кукурузы, 1995. - 68 с.
7. Okamoto T., Scholten S., Loerz K, Kranz E. *Identification of genes that are up- or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation and PCR-based approach // Plant and Cell Physiology*. - 2005. - Vol.46. - P.332 - 338.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень, грант №Ф25/581-2007.