

DOI: 10.31319/2519-2884.41.2022.16

УДК 57.085.2:633.15

К.В. Денисюк, к.б.н., kvderkach@gmail.com

Т.М. Сатарова, д.б.н., професор, satarova2008@ukr.net

Державна установа Інститут зернових культур НААН, м. Дніпро

ВПЛИВ ІНДОЛІЛМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ ГІБРИДІВ КУКУРУДЗИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Підвищення регенераційного потенціалу в культурі in vitro кукурудзи є актуальним завданням біотехнологічного забезпечення селекційного процесу. Метою дослідження була характеристика впливу фітогормону ауксинового ряду індолілмасляної кислоти (ІМК) на здатність до регенерації in vitro гібридів цієї культури. В результаті проведеного дослідження встановлено, що ІМК у концентрації 0,1 мг/л позитивно впливає на регенерацію рослин з калусної тканини II типу гібридів сучасних вітчизняних ліній і класичних ліній з високою регенераційною здатністю. Доведено суттєвий вплив генотипу калусної тканини досліджених гібридів на її регенераційну здатність на фоні різних концентрацій ІМК.

Ключові слова: *Zea mays L.*; калусна тканина; *in vitro*; фітогормони; біотехнологія рослин.

Increasing the regeneration potential of maize culture in vitro is an urgent task of biotechnological accompaniment of the breeding process. The purpose of the study was to characterize the influence of the auxin phytohormone indolylbutyric acid (IBA) on the ability of maize hybrids to regenerate in vitro. It was established that IBA at a concentration of 0.1 mg/L has a positive effect on plant regeneration from type II callus tissue of hybrids of modern native lines and classic lines with high regeneration capacity. The significant influence of callus tissue genotype of the investigated hybrids on its regenerative ability under the different concentrations of IBA was proven.

Keywords: *Zea mays L.*; callus tissue; *in vitro*; phytohormones; plant biotechnology.

Постановка проблеми

Сучасна селекція кукурудзи (*Zea mays L.*) базується на використанні явища гетерозису, який забезпечує суттєве зростання врожайності гібридів, особливо першого покоління, порівняно із батьківськими формами. Створення і підбір ліній, які стануть батьківськими компонентами високопродуктивних гібридів, — складне і тривале у часі завдання, яке вирішується в тому числі із застосуванням сучасних методів біотехнології, зокрема, клітинної і генетичної інженерії. Однак, реакція вихідних популяцій, ліній і гібридів кукурудзи на культивування *in vitro* на кожному окремому морфогенетичному етапі є вкрай залежною від генотипу донорного матеріалу. З цієї причини актуальним є вивчення та оптимізація біотехнологічного потенціалу не тільки ліній, а і комерційних гібридів кукурудзи.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Регенерація рослин *in vitro* є важливим морфогенетичним етапом в клітинній і генетичній інженерії. Від ефективності регенераційної здатності залежить успіх біотехнологічних досліджень з отримання соматоклональних варіантів, селекції *in vitro*, генетичної трансформації тощо [1—3]. Регенераційний потенціал калусної тканини є генетично контрольованим [4]. Він також залежить від онтогенетичних особливостей та морфогенетичного потенціалу калусної тканини, складу живильних середовищ для калусогенезу і регенерації, зокрема вмісту фітогормонів [5—7] та ін.

За існуючими уявленнями калусні тканини рослин переходить до регенерації за суттєвого зменшення вмісту ауксинів в живильному середовищі та доповнення його фітогормонами інших класів — цитокінінами або гіберелінами [8—10]. Загалом ауксини і, зокрема, індолілмасляна кислота (ІМК), позитивно впливають на ризогенез регенерантів кукурудзи [11, 12]. Разом з тим, відомо, що ІМК у поєднанні з цитокінінами виявляє позитивний вплив на регенераційну здатність *in vitro* у рослин. Існують свідчення про успішну регенерацію *in vitro* пагонів кукуру-

дзи з ембріодів на живильному середовищі з мінеральною основою MS з додаванням 1,8 мкМ ауксину ІМК та 2,25 мкМ цитокиніну 6-бензиламінопурина (6-БАП) [13], на живильному середовищі з мінеральною основою MS з додаванням у різних концентраціях ауксину нафтилоцтової кислоти та цитокинінів 6-БАП і кінетину [14]. Проте, ретельне дослідження особливостей дії ауксину ІМК на регенераційний потенціал *Z. mays* не здійснювалося.

В культурі *in vitro* кукурудзи здатні утворюватися компактні калуси білого або жовтого кольору, які швидко переходять до регенерації (калус I типу) і крихкі білі або прозорі калуси, які за регулярного субкультивування підтримуються *in vitro* значний проміжок часу (калус II типу) [15], а значить мають більший потенціал до соматонального варіювання. Вплив фітогормонів частіше вивчався для калусів I типу [10, 11], а реакція калусів II типу на дію фітогормонів майже не досліджена.

Регенерація рослин *in vitro* у кукурудзи може здійснюватися, по-перше, через соматичний ембріогенез — процес утворення двополусної структури, яка виникає без запліднення, але за морфологією аналогічна зиготичному зародку, зокрема має стебловий і кореневий апекси та сем'ядолю. По-друге — через органогенез, тобто несполучений розвиток стеблової та кореневої меристем [16]. За останніми дослідженнями під час переходу до регенерації через соматичний ембріогенез в калусній тканині кукурудзи змінюється рівень певних транскриптів, зокрема мікроРНК Zma-miR528, яку розглядають як регулятор трансляції продуктів транскрипції генів, активних під час калусогенезу. Вважається, що Zma-miR528 має неповну компліментарність до декількох цільових мРНК, що призводить до їхнього зв'язування і деградації [17]. У зв'язку із даними про залучення мікроРНК в регуляцію розвитку рослин через сигналінг ауксинів [18] дослідження впливу фітогормону ауксинового ряду на морфогенез і регенерацію рослин кукурудзи *in vitro* набувають не тільки практичного, але і теоретичного значення. Останні дослідження органогенезу у рослин також показали суттєву роль фітогормонів, зокрема цитокинінів в його регуляції через механізми сигнальної трансдукції, епігенетичного перепрограмування та інші [19]. Узагальнюючий аналіз морфогенезу у рослин *in vitro* на основі даних протеоміки і метаболіки [20] показав їхнє значне варіювання між видами, генотипами, стадіями розвитку, за різних умов культивування, що підтверджує необхідність розширення досліджень гормональної регуляції регенерації через соматичний ембріогенез та органогенез *in vitro*.

Формулювання мети дослідження

Метою дослідження була характеристика впливу фітогормону ауксинового ряду індолілмасляної кислоти у концентраціях 0,1 та 0,2 мг/л на регенераційну здатність *in vitro* у гібридів кукурудзи.

Виклад основного матеріалу

Дослідження проводили для калусної тканини II типу семи пар прямих і зворотних гібридів кукурудзи між лініями комерційної зародкової плазми Ланкастер (ДК633, ДК3070, ДК236 та ДК267) Дніпровської селекційної програми і лініями з високою регенераційною здатністю A188, Chi31 і PLS61 однойменних плазм. Лінії плазми Ланкастер ДК633, ДК3070, ДК236 та ДК267 входять як батьківські форми до сучасних комерційних гібридів кукурудзи. Лінії A188, Chi31 і PLS61 розглядаються як стандарти високої регенераційної здатності у біотехнології кукурудзи [21, 22].

Для ініціації калусної тканини використовували ізольовані незрілі зародки довжиною 1,0—1,5 мм у віці 10—12 діб, які експлантували *in vitro* щитком догори на середовище для індукції калусогенезу, яке містило макро-, мікросолі та вітаміни середовища N₆ [23], доповнені 100 мг/л інозитолу, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л L-проліну, 60 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла, 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти, 0,1 мг/л абсцизової кислоти, 7 г/л агару. Із започаткованої культури відбирали калуси II типу і субкультивували їх на тому самому середовищі впродовж 90 діб. На 91-у добу калуси переносили на модифіковане середовище MS для індукції регенерації, яке містило макро-, мікросолі та вітаміни MS [24], 100 мг/л інозитолу, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 6 г/л агару та залежно від варіанту експерименту — 0,1 або 0,2 мг/л ІМК. Як контрольне використовували середовище для індукції регенерації того самого складу, але без ІМК. Культивування проводили за температури 26 °C та 16-годинного фотоперіоду.

Частоту загальної регенерації розраховували як процентне відношення кількості калусів, які характеризувалися будь-яким типом регенерації (утворення пагону, листоподібних структур), до загальної кількості культивованих калусів на 30-у добу після трансплантації калусів на середовище для індукції регенерації. Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів визначали як кількість рослин-регенерантів, отриманих за весь період регенерації, у перерахунку на 100 культивованих калусів. Дані в таблицях представлено у вигляді $\bar{x} \pm \Delta$, де \bar{x} — середнє арифметичне значення показника, Δ — довірчий інтервал, розрахований як $\Delta = m \cdot t_{0,05}$, де m — похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ — критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05 [25].

В результаті досліджень встановлено, що процес регенерації рослин (рис.1) полягав у закладанні стеблових бруньок, коренів та ембріодів на калусах II типу та їхньому розвитку в умовах освітлення в рослинки і листоподібні структури зеленого кольору.

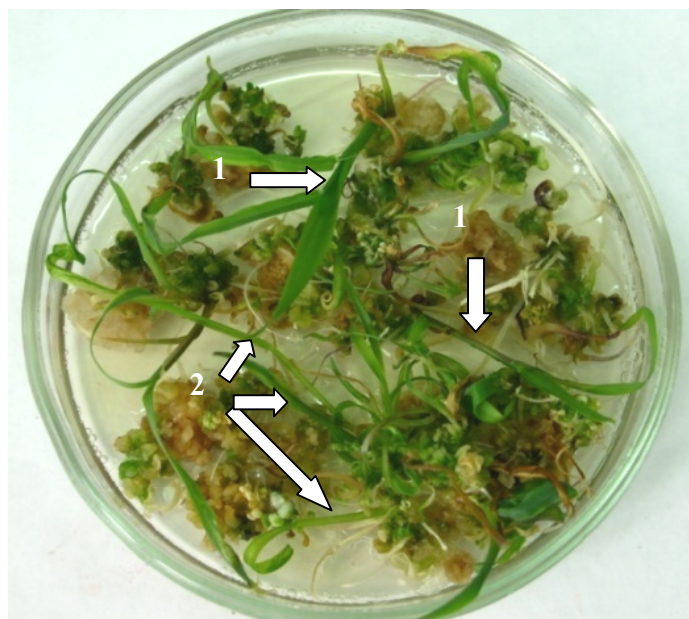


Рис. 1. Регенерація рослин кукурудзи з калусної тканини II типу на модифікованому середовищі для індукції регенерації MS із додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти: 1 — рослинки із стеблом і листками, 2 — листкоподібні структури

Частота загальної регенерації за додавання 0,1 мг/л ІМК достовірно зросла у 2,1 раза порівняно з контролем без ІМК та у 1,9 раза порівняно із варіантом з 0,2 мг/л ІМК. ІМК (0,1 мг/л) у середовищі індукції регенерації сприяла достовірному збільшенню кількості рослин-регенерантів до $19,5 \pm 4,3$ шт./100 калусів, що у 2 рази більше порівняно з їхньою кількістю на контрольному середовищі та у 3 рази більше, ніж на середовищі з 0,2 мг/л ІМК (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив ІМК на регенерацію з калусної тканини II типу у гібридів кукурудзи між лініями плазми Ланкастер та лініями-стандартами

Вміст ІМК у середовищі для індукції регенерації, мг/л	Кількість культивованих калусів, шт.	Частота загальної регенерації, %	Кількість рослин-регенерантів (шт.) на 100 калусів
0	186	$15,6 \pm 5,3$	$9,7 \pm 4,3$
0,1	334	$32,1 \pm 7,7$	$19,5 \pm 4,3$
0,2	186	$17,0 \pm 5,5$	$6,5 \pm 3,6$

Оцінюючи показники регенерації з калусної тканини II типу за впливу 0,1 мг/л ІМК для більшої чисельності гібридів між лініями плазми Ланкастер з лініями-стандартами можна помітити, що на регенераційну здатність впливав генотип калусної тканини (табл. 2). Відповідно до значень проаналізованих показників досліджені генотипи продемонстрували варіювання здатності до регенерації. Найбільше значення частоти загальної регенерації спостерігалося у ДК236хChi31, а найменше — у PLS61хДК236. Найбільша кількість рослин-регенерантів на 100 калусів за дії 0,1 мг/л ІМК приходилася також на гібрид ДК236хChi31, найменша — на PLS61хДК236. Для реципрокних гібридів спостерігали тенденцію до певного збільшення показників на фоні 0,1 мг/л ІМК за використання як материнської форми ліній-стандартів (A188хДК633, Chi31хДК3070, PLS61хДК267), а у інших — ліній Ланкастер (ДК633хChi31, ДК236хChi31, ДК633хPLS61, ДК236хPLS61). Засвідчена невідповідність між частотою загальної регенерації та кількістю рослин-регенерантів на 100 калусів для гібридів ДК633хChi31, ДК236хChi31, ДК267хPLS61, ДК633хPLS61 та їхніх реципроків. Невідповідність для деяких досліджених гібридів між показниками «частота загальної регенерації» та «кількість рослин-регенерантів на 100 калусів» пов'язана з тим, що перший показник враховує не тільки сформовані рослини зі стеблом і листками, але і листкоподібні структури, які розвиваються на калусах, але не мають стебла і не можуть далі розвиватися в повноцінні рослини. Другий показник враховує лише рослини, які потенційно здатні до перенесення у ґрунт. Як видно з представлених результатів, повноцінних рослин серед регенованих структур було близько 60 %, а 40 % припадало на листкоподібні структури.

Таблиця 2. Регенерація з калусів II типу у гібридів кукурудзи між лініями Ланкастер та лініями-стандартами на середовищі для індукції регенерації з 0,1 мг/л ІМК

Гібрид	Кількість досліджених калусів, шт.	Частота загальної регенерації, %	Кількість рослин-регенерантів (шт.) на 100 калусів
ДК633хA188	20	5,0	5,0
A188хДК633	20	15,0	15,0
ДК633хChi31	28	39,3	25,0
Chi31хДК633	8	25,0	12,5
ДК3070хChi31	12	25,0	8,3
Chi31хДК3070	16	37,5	37,5
ДК236хChi31	16	75,0	68,8
Chi31хДК236	8	37,5	25,0
ДК267хPLS61	35	22,9	14,3
PLS61хДК267	69	34,8	18,8
ДК633хPLS61	15	33,3	13,3
PLS61хДК633	26	15,4	11,5
ДК236хPLS61	38	13,2	13,2
PLS61хДК236	23	4,4	4,3
За усіма гібридами	334	32,1±7,7	19,5±4,3

Отже, у нашому дослідженні з 90-добовою калусною тканиною кукурудзи за використання фітогормону ауксинової природи ІМК (0,1 мг/л) у середовищі для індукції регенерації вдалося досягти частоти загальної регенерації на рівні 32,1±7,7 % і кількості рослин-регенерантів 19,5±4,3 шт./100 калусів. У роботі К. М. Pathi et al. [14] наявність ауксину нафтилоцтової кислоти (НОК) на фоні цитокинінів 6-БАП та кінетину взагалі мало визначальний ефект для 21-добової калусної тканини кукурудзи, оскільки без НОК регенерація не відбувалася. Автори встановили, що серед досліджених концентрацій фітогормонів найвищі показники регенерації (частота регенерації на рівні 90,23 % та 90,0 рослин/100 калусів) забезпечувало по-

єднання ауксину НОК (0,5 мг/л) та цитокинінів 6-БАП (2,0 мг/л) та кінетину (1,0 мг/л). Нижчий рівень відповідних показників у нашому дослідженні, порівняно з роботою [14], може бути як генотипово зумовленим, так і визначатися різним типом, віком калусної тканини та фітогормональним складом живильного середовища для індукції регенерації. У дослідженні А. Manivannan et al. [26] для індукції регенерації з 30-добової калусної тканини ліній кукурудзи було використано модифіковане середовище MS із додаванням індолілоцтової кислоти (0,5 мг/л) та 6-БАП (1,0 мг/л). Частота регенерації в даному дослідженні коливалася в діапазоні від 3,3 % до 12,2 % залежно від генотипу, що значно нижче отриманих нами результатів для гібридів.

У дослідженні М. Guruprasad et al. [11] у місцевого генотипу кукурудзи на фоні 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л кінетину на 100 умовних калусів утворилося 420 рослин, що є досить високим результатом. J. Muoma et al. [27] отримали 58—99 рослин/100 калусів у гібридних комбінацій тропічних ліній, що приблизно відповідає результату, отриманому для досліджених гібридів Дніпровської селекційної програми. Для танзанійських вільнозапильних сортів кукурудзи рівень регенерації на різних за складом середовищах досяг 5,4—30,8 рослин на 100 калусів [28]. Посухо- та хворобостійкі іранські лінії кукурудзи виявили суттєво вищий, до 440 рослин на 100 калусів, рівень частоти регенерації [29]. На нашу думку, такі розбіжності в рівні регенерації, отримані різними дослідниками, перш за все пояснюються генотиповим ефектом та засвідчують необхідність розробки біотехнологій калусогенезу і регенерації рослин в культурі *in vitro* для ліній і гібридів конкретної селекційної програми. Проведена нами оптимізація складу живильного середовища для регенерації *in vitro* гібридів кукурудзи дозволить доповнити біотехнологічну характеристику плазми Ланкастер, ширше застосовувати її генотипи у клітинній селекції, генетичній трансформації і класичній селекції.

Висновки

Проведене дослідження показало, що індолілмасляна кислота позитивно впливає на регенерацію рослин кукурудзи з калусної тканини II типу у концентрації 0,1 мг/л. Встановлено, що калуси II типу гібридів за участі вітчизняних ліній плазми Ланкастер ДК633, ДК3070, ДК236 та ДК267 мають здатність до регенерації рослин в культурі *in vitro*.

За додавання 0,1 мг/л ІМК до середовища індукції регенерації частота загальної регенерації збільшилася у 2,1 раза відносно контролю без ІМК та у 1,9 раза відносно 0,2 мг/л ІМК; кількість рослин-регенерантів на 100 калусів збільшилася у 2 рази порівняно із контролем і у 3 рази відносно варіанта з 0,2 мг/л ІМК.

Доведено суттєвий вплив генотипу калусної тканини досліджених гібридів на її регенераційну здатність. Найвище значення частоти загальної регенерації відзначено у ДК236хChi31 (75,0 %), а найнижче — у PLS61хДК236 (4,4 %). Найбільшу кількість рослин-регенерантів на 100 калусів на фоні 0,1 мг/л ІМК було отримано так само у гібрида ДК236хChi31 (68,8 шт./100 калусів), найменшу — у PLS61хДК236 (4,3 шт./100 калусів).

Отримані результати можуть бути використані для оптимізації біотехнології калусогенезу та регенерації рослин кукурудзи в культурі *in vitro* та для підвищення виходу соматональних варіантів з тривалокультивованої калусної тканини для використання в селекційному процесі.

Список використаної літератури

1. Ma L. Genetic dissection of maize embryonic callus regenerative capacity using multi-locus genome-wide association studies / L. Ma, M. Liu, Y. Yan [et al.] // *Front Plant Sci.* 2018. Vol. 9. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00561>.
2. Salvo S. Genetic fine-mapping of a quantitative trait locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize (*Zea mays* L.) / S. Salvo, J. Cook, A. R. Carlson [et al.] // *Plant Genome.* 2018. Vol. 11. P. 1–11. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.12.0111>.
3. Muppala S. Development of stable transgenic maize plants tolerant for drought by manipulating ABA signaling through Agrobacterium-mediated transformation / S. Muppala, P. K. Gudlavalleti,

- K. R. Malireddy [et al.] // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2021. Vol. 19. P. 96. doi: 10.1186/s43141-021-00195-2.
4. López-Ruiz B. A. MicroRNA expression and regulation during maize somatic embryogenesis / B. A. López-Ruiz, V. T. Juárez-González, E. C. Chávez-Hernández, T. D. Dinkova // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1815. P. 397–410. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_28.
 5. Oduor R.O. *In vitro* regeneration of dry land Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis / R. O. Oduor, E. N. M. Njagi, J. S. Machuka // *International journal of botany.* 2006. Vol. 2 (2). P. 146–151. <https://dx.doi.org/10.3923/ijb.2006.146.151>.
 6. Ombori O. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbreds line / O. Ombori, N. M. Gitonga, J. Machuka // *Biotechnology.* 2008. Vol. 7 (2). P. 224–232. <http://ir-library.ku.ac.ke/handle/123456789/18176>.
 7. Jia X. X. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro* / X. X. Jia, J. W. Zhang, H. N. Wang, W. P. Kong // *Maydica.* 2008. Vol. 53. P. 239–248.
 8. Danson J. W. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus / J. W. Danson, M. Lagat, M. Mbogori // *African journal of biotechnology.* 2006. Vol. 5. P. 2367–2370. <http://hdl.handle.net/10883/3033>.
 9. Rakshit S. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds / S. Rakshit, Z. Rashid, J. C. Sekhar [et al.] // *Plant cell organ culture.* 2010. Vol. 100. P. 31–37. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9613-z>.
 10. Malini N. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction / N. Malini, C. R. Ananadakumar, S. Hariramakrishnan // *Journal of Applied and Natural Science.* 2015. Vol. 7, N 1. P. 131–137. <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/576/534>.
 11. Guruprasad M., Sridevi T.V., Vijayakumari G., Kumar M.S. Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Indian journal Agricultural Research.* 2016. Vol. 50, No 2. P. 135–138. doi: 10.18805/ijare.v0iOF.8435.
 12. Mushke R. Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis from seedling derived split node explants of maize (*Zea mays* L.) / R. Mushke, R. Yarra, M. Bulle // *Journal Genetic Engineering & Biotechnology.* 2016. Vol. 14, N 1. P. 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.03.001>.
 13. Zhong H. *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.): I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips / H. Zhong, C. Srinivasan, M. B. Sticklen // *Planta.* 1992. Vol. 187, N 4. P. 483–489. doi: 10.1007/BF00199966.
 14. Pathi K. M. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.) / K. M. Pathi, S. Tula, K. M. Huda [et al.] // *Plant Signal Behav.* 2013. Vol. 8, N 10. P. 1–6. <https://doi.org/10.4161/psb.25891>.
 15. Green C. E., Phillips H. L. Plant regeneration from tissues cultures of maize. *Crop Science.* 1975. Vol. 15 (5). P. 417–421.
 16. Derkach K. V. Morphogenesis *in vitro* in maize inbred lines from the Lancaster heterotic group / K. V. Derkach, O. E. Abraimova, T. M. Satarova // *Cytol. Genet.* 2017. Vol. 51. P. 48–53. <https://doi.org/10.3103/S0095452717010030>.
 17. Luján-Soto E. MicroRNA Zma-miR528 versatile regulation on target mRNAs during maize somatic embryogenesis / E. Luján-Soto, V. T. Juárez-González, J. L. Reyes, T. D. Dinkova // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N 10. P. 5310. doi: 10.3390/ijms22105310.
 18. Luo P. MicroRNAs are involved in regulating plant development and stress response through fine-tuning of TIR1/AFB-dependent auxin signaling / P. Luo, D. Di, L. Wu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, N 1. P. 510. doi: 10.3390/ijms23010510.
 19. Hnatuszko-Konka K. Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis / K. Hnatuszko-Konka, A. Gerszberg, I. Weremczuk-Jeżyna, I. Grzegorzczuk-Karolak // *Genes.* 2021. Vol. 12, N 2. P. 265. <https://doi.org/10.3390/genes12020265>.
 20. Juarez-Escobar J. Current proteomic and metabolomic knowledge of zygotic and somatic embryogenesis in plants / J. Juarez-Escobar, E. Bojórquez-Velázquez, J. M. Elizalde-Contreras [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N 21. P. 11807. doi: 10.3390/ijms22111807.

21. Абраїмова О. Є. Біотехнологічна характеристика калусогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи під впливом абсцизової кислоти та 6-бензиламінопурину / О. Є. Абраїмова, Г. Р. Піралов, Т. М. Сатарова // *Вісник Дніпропетровського національного університету. Серія Біологія. Медицина*. 2010. № 18 (1). С. 3–8.
https://www.dnu.dp.ua/docs/visnik/fbem/program_5e5927c37541e.pdf.
22. Нітовська І. О. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи / І. О. Нітовська, О. Є. Абраїмова, Т. М. Сатарова та ін. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т. 15. С. 112–117.
https://www.researchgate.net/publication/331630268_Biolicistica_transformacia_nezrilih_zarodki_v_kukuruzi_Biolicistica_transformation_of_immature_maize_embryos.
23. Chu C. C. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources / C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun [et al.] // *Sci. Sinica*. 1975. Vol. 18. P. 659–668. <https://www.scienceopen.com/document?vid=7e4d50a5-ee4a-452e-9b74-e2bbe2d47fb4>.
24. Murashige T. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
25. Welham S. J. Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression / S. J. Welham, S. A. Gezan, S. J. Clark, A. Mead BocaRaton: CRCPress, 2015. 608 p. ISBN-13: 978-1439808788.
26. Manivannan A. Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds / A. Manivannan, J. Kaul, A. Singode, S. Dass // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9(44). P. 7446–7452. <https://doi.org/10.5897/AJB10.500>.
27. Muoma J. Improvement in inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in tropical maize lines from friable callus / J. Muoma, O. Ombori, J. Machuka // *Maize Genet. Coop. News Lett*. 2011. Vol. 85. P. 1–2. <https://mnl.maizegdb.org/85/PDF/32muoma.pdf>.
28. Seth M. S. *In vitro* regeneration of selected commercial Tanzanian open pollinated maize varieties / Seth M.S., Bedada L.T., Mneney E.E [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* 2012. Vol. 11, No 22. P. 6043–6049.
29. Shou H.X., Bordallo P., Wang K. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55, No 399. P. 1013–1019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh129>.

THE EFFECT OF INDOLYL BUTYRIC ACID ON THE REGENERATION OF MAIZE HYBRIDS IN VITRO

Denysiuk K., Satarova T.

Abstract

Epy Optimization of the regeneration potential *in vitro* for maize (*Zea mays* L.) hybrids with the participation of perspective inbreds is an actual task for biotechnological maintenance of this important crop breeding process.

The purpose of the research was the investigation of the effect of the auxin phytohormone — indolylbutyric acid (IBA) on the *in vitro* regeneration capacity of maize hybrids. The task of the work was to determine the effect of IBA in concentrations of 0.1 and 0.2 mg / L on the total regeneration frequency from type II callus tissue, as well as on the number of regenerated plants per 100 calli. The material of the study was 90-day type II callus tissue of maize hybrids between inbreds DK633, DK3070, DK236 and DK267 of Lancaster germplasm from the Dnipro breeding program and inbreds with high regeneration capacity A188, Chi31 and PLS61. The method of cell, tissue and organ culture *in vitro* was used. The initiation of plant regeneration from callus tissue was performed on the mineral MS medium, supplemented with 100 mg / L inositol, 100 mg / L casein hydrolysate, 690 mg / L L-proline, 20 g / L sucrose, 6 g / L agar, and 0.1 or 0.2 mg / L IBA.

It was found that IBA significantly affected the maize hybrids' regeneration capacity. With 0.1 mg / L IBA in the medium, the total regeneration frequency increased up to $32.1 \pm 7.7\%$, compared to the control without IBA ($15.6 \pm 5.3\%$) and to 0.2 mg / L IBA ($17.0 \pm 5.5\%$). IBA (0.1 mg / L) contributed also to the increase of the number of regenerated plants up to 19.5 ± 4.3 pcs/100 calli, compared with their number without IBA (9.7 ± 4.3 pcs/100 calli) and with 0.2 mg / L IBA (6.5 ± 3.6 pcs/100 calli). The genotype of callus tissue significantly affected the regeneration ability of the hybrids. The highest number of regenerated plants per 100 calli under 0.1 mg / L IBA was obtained in hybrid DK236xChi31 (68.8 pcs/100 calli), the smallest one — in PLS61xDK236 (4.3 pcs/100 calli). The highest total regeneration frequency was observed for DK236xChi31 (75.0%), and the lowest — for PLS61xDK236 (4.4%) as well.

In the perspective the obtained outcomes can be used to optimize the biotechnology of maize callusogenesis and plant regeneration *in vitro* and to increase somaclonal production from long-term cultivated calli for application in breeding process.

References

- [1] Ma, L., Liu, M., Yan, Y., Qing, C., Zhang, X., Zhang, Y., et. al. (2018). Genetic dissection of maize embryonic callus regenerative capacity using multi-locus genome-wide association studies. *Front Plant Sci.*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00561>.
- [2] Salvo, S., Cook, J., Carlson, A., Hirsch, C., Kaeppler, S., & Kaeppler, H. (2018). Genetic fine-mapping of a quantitative trait locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize (*Zea mays* L.). *Plant Genome*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.12.0111>.
- [3] Muppala, S., Gudlavalleti, P., Malireddy, K., Puligundla, S., & Dasari, P. (2021). Development of stable transgenic maize plants tolerant for drought by manipulating ABA signaling through Agrobacterium-mediated transformation. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 19, 96. doi: 10.1186/s43141-021-00195-2.
- [4] López-Ruiz, B., Juárez-González, V., Chávez-Hernández, E., & Dinkova, T. (2018). MicroRNA expression and regulation during maize somatic embryogenesis. *Methods Mol. Biol.*, 1815, 397–410. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_28.
- [5] Oduor, R.O., Njagi, E.N.M., & Machuka, J.S. (2006). *In vitro* regeneration of dry land Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. *International journal of botany*, 2 (2), 146–151. <https://dx.doi.org/10.3923/ijb.2006.146.151>.
- [6] Ombori, O., Gitonga, N.M., & Machuka J. (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbreds line. *Biotechnology*, 7 (2), 224–232. <http://ir-library.ku.ac.ke/handle/123456789/18176>.
- [7] Jia, X.X., Zhang, J.W., Wang, H.N., & Kong, W.P. (2008). Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. *Maydica*, 53, 239–248.
- [8] Danson, J.W., Lagat, M., & Mbogori, M. (2006). Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. *African journal of biotechnology*, 5, 2367–2370. <http://hdl.handle.net/10883/3033>.
- [9] Rakshit, S., Rashid, Z., Sekhar, J., Fatma, T., & Dass, S. (2010). Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant cell organ culture*, 100, 31–37. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9613-z>.
- [10] Malini, N., Ananadakumar, C.R., & Hariramakrishnan, S. (2015). Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction. *Journal of Applied and Natural Science*, 7 (1), 131–137. <https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/576/534>.
- [11] Guruprasad, M., Sridevi, T.V., Vijayakumari, G., & Kumar, M.S. (2016). Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Indian journal Agricultural Research*, 50 (2), 135–138. doi: 10.18805/ijare.v0iOF.8435.
- [12] Mushke, R., Yarra, R., & Bulle, M. (2016). Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis from seedling derived split node explants of maize (*Zea mays*L.). *Journal Genetic Engineering & Biotechnology*, 14 (1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.03.001>.

- [13] Zhong, H., Srinivasan, C., & Sticklen, M.B. (1992). *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.): I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips. *Planta*, 187 (4), 483–489. doi: 10.1007/BF00199966.
- [14] Pathi, K.M., Tula, S., Huda, K., Srivastava, V., & Tuteja, N. (2013). An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). *Plant Signal Behav.*, 8 (10), 1–6. <https://doi.org/10.4161/psb.25891>.
- [15] Green, C.E., & Phillips, H.L. (1975). Plant regeneration from tissues cultures of maize. *Crop Science*, 15 (5), P. 417–421.
- [16] Derkach, K.V., Abraimova, O.E., & Satarova, T.M. (2017). Morphogenesis *in vitro* in maize inbred lines from the Lancaster heterotic group. *Cytol. Genet.*, 51, 48–53. <https://doi.org/10.3103/S0095452717010030>.
- [17] Luján-Soto, E., Juárez-González, V.T., Reyes, J.L., & Dinkova, T.D. (2021). MicroRNA Zma-miR528 versatile regulation on target mRNAs during maize somatic embryogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (10), 5310. doi: 10.3390/ijms22105310.
- [18] Luo, P., Di, D., Wu, L., Yang, J., Lu, Y., & Shi, W. (2022). MicroRNAs are involved in regulating plant development and stress response through fine-tuning of TIR1/AFB-dependent auxin signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (1), 510. doi: 10.3390/ijms23010510.
- [19] Hnatuszko-Konka, K., Gerszberg, A., Weremczuk-Jeżyna, I., & Grzegorzczuk-Karolak, I. (2021). Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis. *Genes*, 12 (2), 265. <https://doi.org/10.3390/genes12020265>.
- [20] Juarez-Escobar, J., Bojórquez-Velázquez, E., Elizalde-Contreras, J., Guerrero-Analco, J., Loyola-Vargas, V., Mata-Rosas, M. et al. (2021). Current proteomic and metabolomic knowledge of zygotic and somatic embryogenesis in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (21), 11807. doi: 10.3390/ijms222111807.
- [21] Abraimova, O.E., Piralov, G.R., & Satarova, T.M. (2010). Biotehnologichna charakteristika kalusogenezu v kulturi nezrilih zarodkiv kukurudzi pid vplivom abscizovoï kisloti ta 6-benzilaminopurinu [Biotechnological characteristics of callusogenesis in maize immature embryo culture under the influence of abscisic acid and 6-benzylaminopurine]. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Medicine – Visnik Dnipropetrovs'kogo nacional'nogo universitetu. Serija Biologija. Medicina*, 18 (1), 3-8 [in Ukrainian]. https://www.dnu.dp.ua/docs/visnik/fbem/program_5e5927c37541e.pdf.
- [22] Nitovska, I.O., Abraimova, O.E., Satarova, T.M., Shahovskyi, A.M., & Morgun, B.V. (2014). Biolisticna transformacija nezrilih zarodkiv kukurudzi [Biolistic transformation of immature maize embryos]. *Faktori eksperimental'noi evoljucii organizmiv - Factors in experimental evolution of organisms*, 15, 112-117 [in Ukrainian]. https://www.researchgate.net/publication/331630268_Biolisticna_transformacija_nezrilih_zarodkiv_kukurudzi_Biolistic_transformation_of_immature_maize_embryos.
- [23] 23. Chu, C.C., Wang, C.C., Sun C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., et. al. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci. Sinica*, 18, 659–668. <https://www.scienceopen.com/document?vid=7e4d50a5-ee4a-452e-9b74-e2bbe2d47fb4>.
- [24] 24. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- [25] 25. Welham, S.J., Gezan, S.A., Clark, S.J., & Mead, A. (2015). *Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression*. BocaRaton: CRCPress, 2015. ISBN-13: 978-1439808788.
- [26] 26. Manivannan, A., Kaul, J., Singode, A., & Dass, S. (2010). Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds. *African Journal of Biotechnology*, 9 (44), 7446–7452. <https://doi.org/10.5897/AJB10.500>.

- [27] 27. Muoma, J., Ombori, O., & Machuka, J. (2011). Improvement in inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in tropical maize lines from friable callus. *Maize Genet. Coop. News Lett.*, 85, 1–2. <https://mnl.maizegdb.org/85/PDF/32muoma.pdf>.
- [28] 28. Seth, M.S., Bedada, L.T., Mneney, E.E., Oduor, R.O., & Machuka, J.S. (2012). *In vitro* regeneration of selected commercial Tanzanian open pollinated maize varieties. *Afr. J. Biotechnol.*, 11 (22), 6043–6049. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2420>.
- [29] Shou, H.X., Bordallo, P., & Wang, K. (2004). Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.*, 55 (399), 1013–1019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh129>.