



Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія.
 Visnik Dnipropetrovsk'kogo universitetu. Seriâ Biologiâ, ekologiâ

Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology.
 2013. 21(2)

ISSN 2310-0842

www.ecology.dp.ua

УДК 633.15:581.143.6

Оцінка здатності до прямої регенерації у ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер

К.В. Деркач¹, О.Є. Абраїмова¹, Т.М. Сатарова¹, О.А. Молитва²,
 В.С. Калугина², М.Г. Панасенко², С.С. Печорна²

¹ДУ Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України,
 Дніпропетровськ, Україна

²ДВНЗ Український державний хіміко-технологічний університет, Дніпропетровськ, Україна

Оцінено здатність до прямого органогенезу сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер. Відзначено особливості прямої регенерації даних експлантатів. Регенерація на 14-у добу культивування сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків відбувається лише шляхом прямого гомогенезу, а на 45-у добу – шляхом прямого гомогенезу та прямого геморизогенезу. Відзначено вплив мінеральної основи живильного середовища на регенераційну здатність у культурі *in vitro* на 45-у добу культивування. Охарактеризовано сегменти вузлової області пагонів 5-добових проростків як експлантати для отримання ембріогенної калусної тканини та рослин-регенерантів. Відзначено зростання частоти утворення калусної тканини на поверхні вузлової області пагонів проростків при збільшенні тривалості культивування *in vitro*. Надано рекомендації щодо використання прямого гомогенезу та прямого геморизогенезу у біологічних системах агробактеріальної трансформації.

Ключові слова: *Zea mays* L.; прямий гомогенез; прямий геморизогенез; мінеральна основа; сегменти вузлової області проростків

Evaluation of the capacity for direct regeneration of maize inbreds of the Lancaster selection group

K. V. Derkach¹, O. E. Abraimova¹, T. M. Satarova¹, O. A. Molitva²,
 V. S. Kalugina², M. G. Panasenکو², S. S. Pechorna²

¹Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Ukrainian State University of Chemistry and Technology, Dnipropetrovsk, Ukraine

In connection with the necessity of bringing elite maize inbreds of the Lancaster germplasm group, which have potential for cultivation in Ukraine, into the system of genetic transformation, the aim of this investigation is to identify the ability of maize inbreds of this group to regenerate by direct organogenesis and to determine the optimal mineral basis for their nutritional environment using segments of the node area of shoots. As explantats we used sterile 4-day old seedlings of 4 maize inbreds of Lancaster germplasm and model inbred Chi31 exotic germplasm. The seedlings were obtained by germination of sterile seeds in Petri dishes between two layers of moist sterile filter paper at a temperature of 27 °C in dark conditions. A single 1 cm long segment was cut from each from each seedling, running from 0.5 cm before the node to 0.5 cm after the node. A cut was made in each segment of the node in order to create a wounded surface. Explantats were planted in a nutrient environment with mineral bases of MS or N₆, modified by the addition of 10 mg/l silver nitrate, 100 mg/l casein hydrolyzate, 690 mg/l L-proline, 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 2,4-dichlorophenoxiacetic acid and 0,1 mg/l abscisic acid. Cultivation was carried out at 25–27 °C in the light. Direct hemogenesis in this environment on the 14th day of cultivation *in vitro* reached 100% for each line. This meant that all researched lines of Lancaster germplasm and the model line showed a high capacity for direct regeneration through direct hemogenesis, which does not depend on the composition of the mineral content of their nutritional environment. Callus formation was observed in all genotypes on the 14th day of cultivation *in vitro* and the extent of its formation increased during the following month of cultivation. The callus formation was observed only at the site of the wounded surface. The calluses were transparent. Although green areas appeared in

Інститут сільського господарства степової зони Національної академії аграрних наук України,
 вул. Держинського, 14, 49600, Дніпропетровськ, Україна

Agricultural Steppe Zone Institute of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
 Dzerzhinsky str., 14, 49600, Dnipropetrovsk, Ukraine. Tel.: +38056-745-02-36. E-mail: satarova2008@yandex.ru

these calluses, they were nonembryogenic and did not lead to regeneration. All explants were transplanted into fresh nutrient media with simultaneous removal of germinated shoots on the 14th day of cultivation. Regeneration on the 45th day of cultivation took place by direct hemogenesis (formation of shoot or leafy structures) or direct hemorizhogenesis (formation seedlings which had both shoot and root). Formation of ryzhogenic calli was observed in most inbreds. The frequency of regeneration of shoots and leaf structures was characterized by a tendency to increase indicators in the culture environment with mineral basis N₆, and the frequency of regeneration of shoots was significantly marked using a medium with mineral basis MS. However, regeneration on the 45th day took place at a much lower rate than on the 14th day of cultivation, which must be taken into account when a system of genetic transformation systems using nodal segments of seedling shoots is being developed. Thus, using nodal sections of 4-day old seedling shoots of maize inbreds of Lancaster germplasm and model inbred Chi31, we can obtain viable seedlings for use in biological systems of agrobacterial transformation. We can recommend two variants of provoking regeneration by direct organogenesis *in vitro* for application in genetic transformation. The first variant suggests for all studied genotypes 100% induction on the 14th day of *in vitro* cultivation of direct organogenesis by hemogenesis and this requires further rooting of obtained shoots before planting into soil. Both variants of the nutrient environments of cultivation proposed us can be used. The second variant involves low frequency of regeneration by direct hemorizhogenesis in a limited number of genotypes, but excludes the rooting stage. The cultivation environment with the mineral basis MS is recommended for this variant. The choice of either variant for obtaining direct regeneration depends on the particularity and aim of the research.

Keywords: *Zea mays*; direct hemogenesis; direct hemorizhogenesis; mineral basis; segments of nodal sections of seedlings

Вступ

Розширення різноманіття генофонду сільськогосподарських рослин, у тому числі і кукурудзи, є актуальним напрямом біотехнологічних досліджень. Шляхом застосування генетичної трансформації та клітинної селекції можливо створювати нові генотипи, стійкі до біотичних і абіотичних факторів. При проведенні генетичної трансформації методами біолістики або агробактеріальної трансформації обов'язковим є отримання рослин-регенерантів, які б несли вбудовані в них конструкції, що кодують нові ознаки. Генетичну трансформацію кукурудзи шляхом біолістики ведуть на базі тільки калусної тканини з наступною регенерацією рослин (Wang and Frame, 2009; O'Kennedy et al., 2011). Агробактеріальна трансформація передбачає застосування або калусогенезу з наступною регенерацією, тобто непрямую регенерацію (Frame et al., 2011; Ombori et al., 2013), або регенерацію без стадії калусогенезу – прямий органогенез (Mukhalskaya et al., 2012). Генетична трансформація на базі калусної тканини кукурудзи поширеніша, ніж із використанням інших експлантатів. За тривалого культивування *in vitro* калусна тканина може зазнавати соматональних змін (Andreev et al., 2009), що небажано у біотехнологічних системах генетичної трансформації.

Кукурудза характеризується обмеженим колом чутливих до культивування *in vitro* генотипів (Satarova et al., 2013), зокрема комерційно цінних. Складність культивування *in vitro* виникає як на стадії калусогенезу, так і на стадії регенерації рослин із калусної тканини. Калусогенний і регенераційний потенціал визначається як генотиповими особливостями експлантатів, так і складом живильного середовища та умовами культивування (Kunta et al., 2012; Jakubeková et al., 2011; Frame et al., 2011). Проте підбір складу живильних середовищ і умов культивування є складним і тривалим процесом, який іноді лишається безуспішним. Останніми роками активно розвивається перспективний напрям агробактеріальної трансформації із застосуванням сегментів вузлової області пагонів 7–10-добових проростків (Mukhalskaya et al., 2012), що зменшує вірогідність соматональної мінливості *in vitro*.

У зв'язку з необхідністю залучення до систем генетичної трансформації елітних ліній кукурудзи селекційно перспективною для України групи Ланкастер (Satarova et al., 2011) метою роботи є характеристика

здатності ліній кукурудзи цієї групи до регенерації шляхом прямого органогенезу та визначення оптимального за мінеральною основою складу живильного середовища з використанням сегментів вузлової області пагонів проростків.

Матеріал і методи досліджень

Як експлантати використовували 4-добові стерильні проростки кукурудзи чотирьох ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (ДК267, ДК298, ДК633/266 та ДК633/325) та модельну лінію Chi31 екзотичної зародкової плазми. Проростки отримували пророщуванням стерильних зернівок у чашках Петрі між двома шарами вологого стерильного фільтрувального паперу при +27 °С у темряві. Із кожного окремого проростка відрізали по одному сегменту довжиною 1 см, який включав 0,5 см до вузла і 0,5 см після вузла. У місці вузла у кожного сегмента робили надріз із метою створення раневої поверхні.

Експлантати висаджували на модифіковані за допомогою додавання 10 мг/л нітрату срібла, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л *L*-проліну, 30 г/л сахарози, 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти живильні середовища з мінеральними основами MS (Murashige and Skoog, 1962) чи N₆ (Chu et al., 1975). Культивування проводили при +25...+27 °С на світлі.

Для оцінки результатів культивування показники реєстрували на 14 та 45-ту добу від експлантації сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків на живильне середовище. На 14-ту добу культивування всі експлантати пересаджували на свіже живильне середовище з одночасним видаленням пророслих пагонів. Загальну частоту калусогенезу розраховували як процентне відношення кількості сегментів проростків, які характеризувалися утворенням калусу, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту утворення калусів із зеленими ділянками розраховували як процентне відношення кількості сегментів проростків, які характеризувалися утворенням калусу із зеленими ділянками, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту утворення ризогенних калусів розраховували як процентне відношення кількості калусів, які утворили корінці, до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Частоту

регенерації пагонів, рослинки (пагонів із коренями, які виходили з однієї точки), листових структур розраховували як процентне відношення експлантатів із певним типом регенерації до загальної кількості культивованих сегментів проростків. Статистичну обробку даних проводили за Chandler and Scott (2011). Дані в таблицях наведені у вигляді $M \pm m$ за рівня значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

Уже упродовж першої доби культивування в усіх генотипів на обох середовищах спостерігалася проростання пагона, з боку кореня спостерігалася потовщення експлантатів, відбувалася регенерація шляхом прямого органогенезу, важлива при генетичній трансформації рослин. Проростання всіх сегментів вузлової області пагонів проростків відбувалося у вигляді формування пагонів (шляхом прямого гомогенезу) та відрізнялося залежно від генотипу кольором, довжиною та товщиною новоутворених пагонів. Прямий гомогенез уже на 14-ту добу культивування *in vitro* сягав 100% для кожної з ліній на кожному із живильних середовищ. Таким чи-

ном, у всіх досліджуваних ліній кукурудзи плазми Ланкастер та модельної лінії спостерігалася генотипічна висока здатність до прямої регенерації шляхом прямого гомогенезу, яка не залежала від складу живильного середовища за вмістом мінеральних солей. Відомо, що калусогенна та регенераційна здатність генотипів кукурудзи залежать від складу мінеральних солей середовища культивування (Rafiq et al., 2005).

На 14-ту добу культивування *in vitro* в усіх генотипів спостерігалася формування калусу, частота утворення якого зростала протягом наступного місяця культивування (табл. 1). Формування калусу спостерігалася лише у місці раневої поверхні. Калус був прозорим, на ньому зустрічалися зелені ділянки. Такий калус виявився не-ембріогенним і у подальшому регенерації не дав. На 14-ту добу культивування лише лінія Chi31 на середовищі з мінеральною основою N_6 характеризувалася утворенням калусу на кожному з експлантатів. На 45-ту добу культивування *in vitro* у лінії Chi31 загальна частота калусогенезу досягла рівня 100% і на середовищі з мінеральною основою MS. Лінія ДК633/325 характеризувалася 100% калусогенезом на середовищі з мінеральною основою N_6 .

Таблиця 1

Калусогенез у культурі сегментів вузлової області пагонів 4-добових проростків кукурудзи

Лінія	Мінеральна основа середовища культивування	Кількість культивованих експлантатів, шт.	Загальна частота калусогенезу на 14-ту добу культивування, %	Загальна частота калусогенезу на 45-ту добу культивування, %
ДК267	N_6	30	63,33 ± 17,90	83,83 ± 13,84
	MS	30	73,33 ± 16,42	83,83 ± 13,84
ДК633/266	N_6	17	82,35 ± 19,06	82,35 ± 19,06
	MS	17	70,59 ± 22,78	82,35 ± 19,06
ДК298	N_6	17	58,82 ± 24,61	58,82 ± 24,61
	MS	17	52,94 ± 24,96	76,47 ± 21,21
ДК633/325	N_6	25	92,00 ± 11,08	100,00 ± 0,00
	MS	25	88,00 ± 13,27	96,00 ± 8,00
Chi31	N_6	28	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	MS	27	96,30 ± 7,41	100,00 ± 0,00
Середнє	N_6	117	80,34 ± 7,38	87,18 ± 6,21
	MS	116	78,45 ± 7,67	88,79 ± 5,88

Використовуючи сегменти вузлової області пагонів 4-добових проростків ліній кукурудзи плазми Ланкастер і модельної лінії Chi31, можна отримувати повноцінні проростки для застосування у біологічних системах агробактеріальної трансформації. Отримана таким способом калусна тканина не має перспектив до подальшого використання, оскільки є нерегенерувальною. Разом із тим, відомі праці, де з успіхом використані сегменти проростків та листків для отримання калусної тканини з наступною регенерацією рослин із неї (Ahmadabadi et al., 2007; Muoma et al., 2008). Після пересаджування на 14-ту добу культивування всіх експлантатів на свіже живильне середовище з одночасним видаленням пророслих пагонів, на 45-ту добу культивування знову фіксували пряму регенерацію (табл. 2). Регенерація відбувалася шляхом прямого гомогенезу (утворення пагонів або листових структур) або прямого геморизогенезу (утворення рослинки, що мали одночасно пагін і корінь, які виходили з однієї точки). Частка калусів із зеленими ділянками коливалася у межах 17,6–74,1% залежно від генотипу та середовища культивування. Утворення ризогенних калусів спостерігалася в усіх варіантах дослідження, крім лінії ДК633/266 на середовищі MS.

Частота регенерації пагонів та листових структур характеризувалася тенденцією до зростання показників на середовищі культивування з мінеральною основою N_6 , а частота регенерації пагонів значно переважала при використанні середовища з мінеральною основою MS. Разом із цим, регенерація на 45-ту добу відбувалася зі значно нижчою частотою, ніж на 14-ту добу культивування, що необхідно враховувати при розробці системи генетичної трансформації із застосуванням сегментів вузлової області пагонів проростків.

Регеновані пагони та листові структури потребують подальшого укорінення перед висадкою у ґрунт. Укорінення та приживаність у ґрунті пагонів ефективніші, ніж листових структур. Регеновані рослини вже мають корінь, що виходить з однієї точки з пагоном. Вони характеризуються єдиною провідною системою пагона та кореня, яка забезпечує високу приживаність рослинки у ґрунті. Тому для подальшого використання регенерації на 45-ту добу культивування *in vitro* рекомендовано застосовувати живильне середовище з мінеральною основою MS.

Аналіз на 45-ту добу культивування сегментів вузлової області пагонів проростків кукурудзи

Лінія	Мінеральна основа середовища культивування	Кількість культивованих експлантів, шт.	Частота регенерації пагонів, %	Частота регенерації рослин, %	Частота регенерації листових структур, %	Частота утворення ризогенних калусів, %	Частота утворення калусів із зеленими ділянками, %
ДК267	N_6	30	0	0	3,33 ± 6,67	63,33 ± 17,90	70,00 ± 17,02
	MS	30	3,33 ± 6,67	3,33 ± 6,67	3,33 ± 6,67	23,33 ± 15,71	46,67 ± 18,53
ДК633/266	N_6	17	0	0	0	52,94 ± 24,96	17,65 ± 19,06
	MS	17	5,88 ± 11,76	5,88 ± 11,76	0	0	23,53 ± 21,21
ДК298	N_6	17	0	0	41,18 ± 24,61	29,41 ± 22,78	29,41 ± 22,78
	MS	17	0	0	17,65 ± 19,06	47,06 ± 24,96	47,06 ± 24,96
ДК633/325	N_6	25	12,00 ± 13,27	4,00 ± 8,00	4,00 ± 8,00	12,00 ± 13,27	20,00 ± 16,33
	MS	25	0	12,00 ± 13,27	0	20,00 ± 16,33	20,00 ± 16,33
Chi31	N_6	28	10,71 ± 11,90	0	25,00 ± 16,67	50,00 ± 19,25	46,43 ± 19,20
	MS	27	7,41 ± 10,27	14,81 ± 13,93	11,11 ± 12,33	25,93 ± 17,19	74,07 ± 17,19
Усього	N_6	117	5,13 ± 4,10	0,85 ± 1,71	13,68 ± 6,38	42,74 ± 9,19	40,17 ± 9,10
	MS	116	3,45 ± 3,40	7,76 ± 4,99	6,03 ± 4,44	23,28 ± 7,88	43,97 ± 9,26

Із метою застосування у генетичній трансформації нами рекомендовано два варіанти провокування регенерації шляхом прямого органогенезу. Перший варіант передбачає в усіх досліджених генотипів 100% індукцію на 14-ту добу культивування *in vitro* прямого органогенезу шляхом гемогенезу та потребує подальшого укорінення отриманих пагонів перед висадкою у ґрунт. Для цього варіанта можна використовувати обидва варіанти запропонованих нами середовищ культивування. Другий варіант передбачає низьку частоту регенерації шляхом прямого геморизогенезу на живильному середовищі з мінеральною основою MS в обмеженого кола генотипів, проте виключає стадію укорінення. Вибір того чи іншого варіанта отримання прямої регенерації залежить від особливостей та мети дослідження.

Висновки

Сегменти вузлової області пагонів 4-добових пагонів проростків – перспективні експлантати для отримання рослин-регенерантів із метою використання їх у біологічних системах агробактеріальної трансформації. Всі лінії кукурудзи селекційної групи Ланкастер володіють високою здатністю до регенерації шляхом прямого гемогенезу на 14-ту добу культивування *in vitro* та низькою здатністю – шляхом геморизогенезу на 45-ту добу культивування. Існує генотипова схильність ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер до високих показників прямого органогенезу на 14-ту добу культивування. Геморизогенез не можна отримати на 14-ту добу культивування. Регенерація шляхом прямого гемогенезу на 14-ту добу культивування не залежить від складу мінеральної основи живильного середовища. Шлях регенерації на 45-у добу культивування залежить від обраного середовища культивування. Для регенерації шляхом прямого геморизогенезу рекомендовано використовувати живильне середовище з мінеральною основою MS. Сегменти проростків ліній селекційної групи Ланкастер не рекомендовано застосовувати для отримання ембріогенної калусної тканини.

Бібліографічні посилання

- Ahmadabadi, M., Ruf, S., Bock, R., 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res.* 16(4), 437–448.
- Andreev, I.O., Spiridonova, K.V., Maidanyuk, D.M., Kunakh, V.A., 2009. Geneticheskie jeffekty kultivirovaniya *in vitro* tkanej kukuruzy [Genetic effects of tissue culture on maize]. *Fiziologija i Biohimija Kul'turnyh Rastenij* 41(6), 487–495.
- Chandler, R.E., Scott, E.M., 2011. *Statistical methods for trend detection and analysis in the environmental sciences (Statistics in practice)*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18, 659–668.
- Frame, B., Main, M., Schick, R., Wang, K., 2011. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. *Plant Embryo Culture* 710, 327–341.
- Jakubeková, M., Preťová, A., Obert, B., 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo induced callus of maize (*Zea mays* L.). *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 1(4), 478–487.
- Kunta, R.K., Jyothi, K.B.L., Begum, S.S., 2012. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of Indian maize inbreds by embryo culture. *Current Pharma Research* 2(2), 508–510.
- Muoma, J., Muluvi, G., Machuka, J., 2008. *In vitro* regeneration by indirect organogenesis of selected Kenyan maize genotypes using shoot apices. *Biotechnology* 7(4), 732–738.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15, 473–497.
- Mykhalskaya, S.I., Adamenko, N.I., Morgun, B.V., Kochetov, A.V., Tischenko, O.M., 2012. Kompetentnost' k *Agrobacterium* oposredovannoj transformacii segmentov pobega jelitnyh inbrednyh linij kukuruzy [Competence to *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot nodal section segments of corn elite inbred lines]. *Biotechnologija* 5(3), 98–104 (in Russian).
- O'Kennedy, M.M., Stark, H.C., Dube, N., 2011. Biolistic-mediated transformation protocols for maize and pearl millet using pre-cultured immature zygotic embryos and embryogenic tissue. *Plant Embryo Culture* 710, 343–354.
- Ombori, O., Muoma, J.V.O., Machuka, J., 2013. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical

- inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 113, 11–23.
- Rafiq, M., Fatima, T., Husnain, T., Bashir, K., Riazuddin, S., 2005. Effect of different media on callus formation and regeneration of different genotypes of maize (*Zea mays* L.). *Plant Tissue Culture* 15(1), 57–65.
- Satarova, T.M., Derkach, K.V., Abraimova, O.E., 2011. Ocinka reciproknogo efektu v kul'turi *in vitro* u genotipiv kukurudzi zarodkovoї plazmi Lankaster [The estimation of reciprocal effect in *in vitro* culture for maize genotypes of Lancaster germplasm]. *Bjuleten' Institutu Zernovogo Gospodarstva* 40, 20–24 (in Ukrainian).
- Satarova, T.N., Cherchel, V.Y., Cherenkov, A.V., 2013. Kuku-ruza: Biotehnologicheskie i selekcionnye aspekty gaploidii [Maize: Biotechnological and breeding aspects of haploidy]. *New Ideology, Dnipropetrovsk* (in Russian).
- Wang, K., Frame, B., 2009. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. *Transgenic Maize* 526, 29–45.

Надійшла до редколегії 18.11.2013