

УДК 576.64

Н. І. Теслюк, К. О. Шульга, Т. В. Іваниця,
К. Я. Жиловська

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Всеволода Змієнка, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ СХЕМИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЕКСПЛАНТІВ ТА ФІТОГОРМОНАЛЬНОГО СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВВЕДЕННЯ КУКУРУДЗИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Мета роботи: оптимізувати схему стерилізації експлантів з використанням протигрибкових агентів та виявити вплив фітогормонального складу живильного середовища на регенераційні процеси у кукурудзи в культурі *in vitro*. **Матеріали і методи.** На етапі введення насіння кукурудзи в культуру *in vitro* було протестовано чотири схеми стерилізації з використанням фунгіцидів та без них. Визначали вплив фітогормонів цитокінінового та ауксинового ряду: 6-бензиламінопурину (6-БАП) індолілоцтової кислоти (ІОК) на процеси регенерації кукурудзи в культурі *in vitro*. **Результати.** Виявлено, що найбільший вихід стерильних експлантів у культурі *in vitro* забезпечила обробка препаратами «Хорус» (85,8%) та «Хінозол» (95,2%). За показником життєздатності проростків та довжиною коренів кращі показники були у варіанті з препаратом «Хорус» (на 15% і 45% більше за контроль відповідно). Встановлено, що середовище MS з ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л найкраще впливало на приживлюваність експлантів (84%), на процеси утворення калусу (47%) та на ризогенез (30 %), а на стимуляцію пагоноутворення – MS з 6-БАП 2 мг/л та ІОК 0,5 мг/л. **Висновок.** Оптимальною схемою для стерилізації насіння кукурудзи як експлантів для культури *in vitro* є: промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка відбілювачем «Білизна» (NaOCl 10,5 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистиллятом двічі, обробка препаратом «Хорус» (1,4 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистиллятом тричі. Встановлено, що кращим для процесів введення в стерильну культуру було живильне середовище MS: зі збільшеним вмістом ауксинів (ІОК 2 мг/л) – для індукування калусів і ризогенезу; цитокінінів (6-БАП 2 мг/л) – для стимуляції органогенезу.

Ключові слова: стерилізація експлантів, *Zea mays L.*, фітогормони, живильне середовище, культура *in vitro*.

Україна – потенційний лідер аграрного виробництва. Однією з найперспективніших сільськогосподарських культур є кукурудза (*Zea mays L.*). З кожним роком питання збільшення її виробництва постає все гостріше [14]. Головне джерело підвищення врожайності – ефективне використання нових



гібридів, для створення яких необхідний широкий спектр знань у галузі селекції, та біотехнології.

Останнім часом все більше значення мають рослини, створені та вирощені за допомогою біотехнологічних методів, що базуються на використанні культур *in vitro*. Це дозволяє отримати велику кількість рослин з однорідним генотипом та значно прискорити селекційний процес. Проте приживлюваність у стерильних умовах варіює не лише серед різних рослин, а й у межах одного виду. Головною проблемою є відсутність універсальних протоколів культивування, оскільки необхідна їх оптимізація або розробка нових методик залежно від типу і джерела експлантів, вимог рослинних об'єктів до живильного середовища, потреба у певних концентраціях регуляторів росту [5].

Одним з найважливіших етапів у біотехнології рослин є введення експланта в культуру *in vitro*. На цьому етапі критичним є дотримання стерильності та склад живильного середовища. Перше усуває негативний вплив мікроорганізмів, спотворення ними результатів експерименту та забезпечує оздоровлення рослини. Друге дозволяє контролювати ріст та розвиток рослини, а додавання фітогормонів – дає можливість направити рослинні тканини за певним шляхом регенерації, отримуючи калуси для суспензійних культур або розгалужені пагони для клонального мікророзмноження.

Відомо, що запобігти контамінації в культурі *in vitro* можна завдяки ретельній стерилізації експлантів, обладнання, живильного середовища тощо. Для обробки експлантів підбирають такі концентрації стерилізаційних агентів та час експозиції, щоб забезпечити найменший рівень забруднення при найбільшій приживлюваності у культурі *in vitro* [8].

Для стерилізації насіння кукурудзи найчастіше в наукових публікаціях пропонують використовувати гіпохлорид натрію та етанол у різних співвідношеннях [6; 15]. Однак деякі автори зазначали, що показники схожості насіння та рівні грибового забруднення широко варіювали залежно від генотипу та географічного походження насіння. Тому для деяких експлантів кукурудзи була потреба у довшій схемі стерилізації з додаванням фунгіцидних препаратів [12].

Не менш важливим у процесі введення кукурудзи в культуру *in vitro* є підбір оптимальної концентрації основних фітогормонів у живильному середовищі як для отримання калусної тканини, так і для процесів органогенезу. Відомо, що висока концентрація ауксинів загалом сприяє коренеутворенню, а цитокінінів – сприяє регенерації пагонів. У цей же час баланс обох типів гормонів призводить до розвитку калусів [7]. Було заявлено, що для індукції розвитку калусів у зернових доцільно використовувати комбінації ауксинів із цитокінінами, переважно з вищими концентраціями ауксинів, тоді як для регенерації пагонів ефективними є їх поєднання з переважанням цитокінінів [10; 13].

Так, для культивування кукурудзи *in vitro* найчастіше застосовують ауксин: 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4-Д) у концентрації 2–10 мг/л, індолилоцтову кислоту (ІОК) – у вищій дозі через меншу активність; а також цитокінін 6-бензиламінопурин (6-БАП) у межах 0,5–3 мг/л [1; 9]. Рекомендації щодо використання тих чи інших регуляторів росту та їх кількості дуже



різняться, єдиної думки поки що немає, тому дослідження в цьому напрямку потребують відпрацювання та узагальнень.

Метою роботи було оптимізувати схему стерилізації експлантів з використанням фунгіцидних агентів та виявити вплив фітогормонального складу живильного середовища на регенераційні процеси кукурудзи в культурі *in vitro*.

В план досліджень входило:

- оптимізувати схему стерилізації експлантів кукурудзи за допомогою фунгіцидів;
- оцінити вплив фітогормонального складу живильного середовища на стимуляцію калусогенезу та проліферацію пагонів і утворення коренів у культурі *in vitro*;
- встановити ефективні комбінації ауксинів та цитокінінів для стимуляції конкретних шляхів морфогенезу.

Матеріали і методи

Матеріалом для експерименту з пошуку кращої схеми стерилізації експлантів кукурудзи слугувало насіння гібриду «Хайглоу» (TM Syngenta Seeds, Нідерланди). Дослідження проводили на базі Наукового центру морської біології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

Для досягнення поставлених завдань було проведено два блоки експериментів:

1. тестування різних схем стерилізації з додаванням фунгіцидних агентів;
2. дослідження впливу різних комбінацій фітогормонів на ріст і розвиток зародків кукурудзи в умовах *in vitro*.

Для виявлення впливу фунгіцидів на вихід стерильних експлантів, життєздатність та розвиток кукурудзи в культурі *in vitro* використовували розчини препаратів «Хорус» (1,4 г/л), «Хінозол» (2 г/л) та «Фундазол» (1 г/л). Концентрації та час експозиції стерилізаційних агентів обирали на основі рекомендацій виробників, а також за Н. В. Титаренко та ін. [4]. Використовували таку схему досліджень:

1. Промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка розведеним розчином відбілювача «Білизна» з концентрацією гіпохлориду натрію NaOCl 10,5 г/л (15 хв), промивка стерильною дистильованою водою двічі, обробка препаратом «Хорус» (1,4 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистиллятом тричі.
2. Промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка засобом «Білизна» (15 хв), промивка стерильним дистиллятом двічі, обробка «Хінозол» (2 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистиллятом тричі.
3. Промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка відбілювачем (15 хв), промивка стерильним дистиллятом двічі, обробка препаратом «Фундазол» (1 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистиллятом тричі.



4. Промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка засобом «Білизна» (15 хв), промивка стерильним дистиллятом двічі – контроль.

Стерильне насіння кукурудзи у ламінарному боксі переносили на живильне середовище Мурасіге і Скуга (MS). Культивували експланти в умовах культуральної кімнати ($t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, відносна вологість повітря = 60–70%, фото-період 16/8, інтенсивність освітлення = 2500 лк). Приживлюваність та ріст кукурудзи фіксували на 4-ий, 7-ий, 14-ий та 21-ий дні експерименту. У процесі досліджень проводили обліки виходу стерильних експлантів приживлюваності експлантів, довжини пагонів та коренів.

Для виявлення впливу фітогормонального складу живильного середовища на стимуляцію калусогенезу та пагоноутворення у кукурудзи в культурі *in vitro* як експланти використовували ізольовані зародки гібриду DCS 1541, що був наданий агрономом господарства ТОВ Діброва, А.С. Данилюком. Донорні рослини вирощувалися в кліматичних умовах Лісостепової зони на сірих лісових ґрунтах за сумарної кількості позитивних температур $2800\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ізоляцію зародків проводили в ламінар-боксі за допомогою скальпелю та препарувальної голки [2].

У експерименті використовували тверде живильне середовище MS, до якого, згідно з даними наукових джерел, додавали фітогормони цитокінінового та ауксинового ряду. Схема досліджень включала варіанти:

I 6-БАП 2 мг/л та ІОК 0,5 мг/л.

II ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л.

MS k Контроль – без додавання фітогормонів.

Ізольовані зародки поміщали в контрольовані умови культуральної кімнати та вели спостереження на 3-тій, 5-тій, 7-мий та 10-тий день.

Робили облік відсотку приживлюваності, початку проліферації експлантів, утворення калусу, кількості проростків, кількість експлантів, що утворили корені.

Статистичні розрахунки проводили за допомогою програми Microsoft Excel (середнє значення, стандартне відхилення).

Результати досліджень та їх обговорення

Оптимізація схеми стерилізації експлантів з використанням проти-грибкових агентів

Було виявлено, що з четвертого дня дослідів спостерігалось зменшення кількості стерильних експлантів у всіх зразках, крім тих, що були оброблені препаратом «Хінозол». Однак починаючи з сьомого дня зниження за цим показником відбувалось у всіх дослідних варіантах та найбільше забруднення мікроорганізмами під кінець досліджень було встановлено після обробки ініціальних експлантів препаратом «Фундазол» – 40% від початкової кількості введених в культуру експлантів (табл. 1). На 21-й день кількість стерильних експлантів, що перевищували контроль, відмічено у дослідях з використанням препаратів «Хорус» та «Хінозол» — на 16,6% та 26,6% краще відповідно.

За середнім значенням стерильності за весь час дослідів найкращий ефект забезпечила обробка препаратами «Хінозол» та «Хорус» – на 20,8% та



Таблиця 1

Вплив фунгіцидних стерилізаційних агентів на ініціальні експланти кукурудзи
в культурі *in vitro*

Table 1

Effect of antifungal sterilizing agents on the initial maize explants *in vitro* culture

Стерилізаційний агент	Стерильність, %				Середнє значення стерильності за 21 день Σ , %	Життєздатність, %				Середнє значення життєздатності за 21 день Σ , %
	День від початку культивування					День від початку культивування				
	4	7	14	21		4	7	14	21	
Хорус	93.3	86.7	90.0	73.3	85.8	100.0	96.7	90.0	76.7	90.8
Хінозол	100.0	96.7	90.0	83.3	92.5	66.7	56.7	36.7	36.7	49.2
Фундазол	96.7	80.0	66.7	40.0	70.8	96.7	80.0	66.7	46.7	72.5
Контроль	83.3	76.7	70.0	56.7	71.7	96.7	76.7	70.0	60.0	75.8

n = 40

Σ – середнє значення стерильності або життєздатності за 21 день у %.

Σ is the average value of sterility or viability for 21 days in %.

14,1% перевищували контроль відповідно. Оброблені препаратом «Фундазол» та контрольний варіант за даним показником мають різницю менше 1%.

За параметром життєздатності результати не повністю повторюють тенденцію значень стерильності: використання препарату «Хінозол» спричиняло значне зменшення життєздатних експлантів кукурудзи вже на 4-ий день спостережень (66,7%), а на 21-ий день таких експлантів залишилося близько третини від початкової кількості (36,7%). При цьому на останній день спостережень найкращі показники були за обробки препаратом «Хорус» – 76,7% проти 60% у контрольному варіанті.

Стерилізація препаратом «Хінозол» викликала потемніння насінин кукурудзи (рис. 1а), що ймовірно й зумовлювало стрімке зниження життєздатності. Натомість зразки, оброблені препаратом «Хорус», демонстрували розвинену кореневу систему та яскраво зелені листки (рис. 1б).

Спостереження показали, що потемніння ініціальних експлантів виникало тільки при обробці препаратом «Хінозол» та спостерігалось вже з четвертого дня спостережень. Надалі в цьому варіанті візуально спостерігали зміну кольору живильного середовища.

В результаті оцінки динаміки проростання ініціальних експлантів кукурудзи встановлено, що найвищий рівень сумарного проростання за період дослідження (21 день) спостерігався у варіантах контроль (41,67%) та обробки препаратом «Хорус» (42,5%) (табл. 2). Вже на 4-му дні спостереження показник проростання у варіанті з препаратом «Хорус» становив 33,33%, що поступово підвищувався до 53,33% на 7-й день, після чого дещо знижувався. Це свідчить про потенційно нетоксичну дію даного препарату на експланти кукурудзи та можливу стимулювальну активність у ранні терміни культивування. На відміну від цього, при застосуванні препарату «Хінозол» проростання кукурудзи було найнижчим серед усіх варіантів і не перевищувало 20% на фінальному етапі. Середній показник проростання у цьому варіанті склав



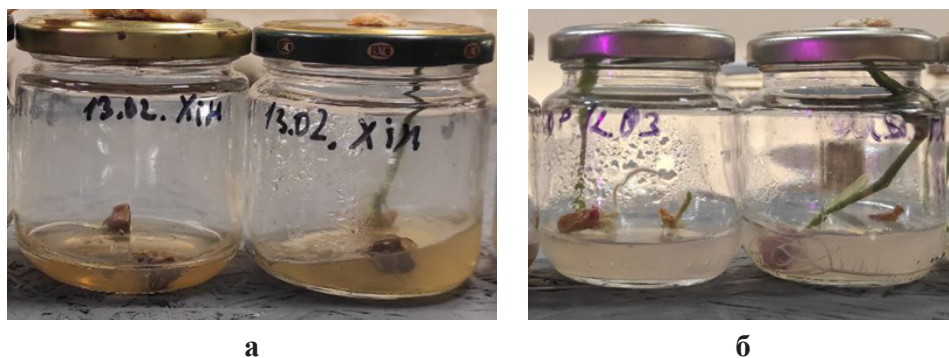


Рис. 1. Проростки кукурудзи в культурі *in vitro*, стерилізовані препаратами «Хінозол» (а) та «Хорус» (б) на 14-ий день

Fig. 1. Maize seedlings *in vitro* sterilized by «Chinozol» (a) and «Horus» (b) on the 14th day

Таблиця 2

Вплив фунгіцидних стерилізаційних агентів на проростання ініціальних експлантів кукурудзи в культурі *in vitro*

Table 2

The effect of antifungal sterilizing agents on the germination of initial maize explants *in vitro* culture

Стерилізаційний агент	Проростання, %				Середнє значення проростання за 21 день, Σ, %
	День від початку культивування				
	4	7	14	21	
Хорус	33.33	53.33	40.00	43.33	42.50
Хінозол	23.33	13.33	20.00	20.00	19.17
Фундазол	26.67	33.33	26.67	23.33	27.50
Контроль	40.00	43.33	40.00	43.33	41.67

n = 40

Σ – середнє значення проростання за 21 день у %.

Σ is the average value of germination for 21 days in %.

лише 19,17%, що вказує на можливу фітотоксичність або пригнічувальну дію активних компонентів препарату «Хінозол» на клітини первинної тканини.

Обробка препаратом «Фундазол» також виявила помірно негативний вплив: середній рівень проростання становив 27,5%, із незначними коливаннями між 4-м і 21-м днем спостереження. Це дозволяє припустити, що препарат частково пригнічує проростання, однак не настільки критично, як препарат «Хінозол».

Наступним етапом дослідження була аналіз динаміки росту кореневої системи проростків, отриманих після обробки різними фунгіцидами, а також показники стерильності експлантів, що є критичними при роботі в умовах *in vitro* (рис.2).



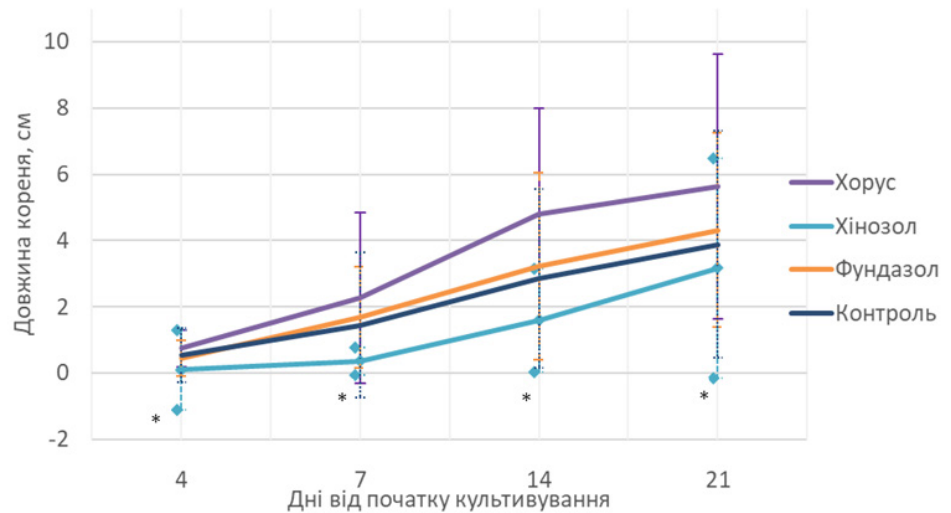


Рис. 2. Динаміка збільшення середньої довжини коренів кукурудзи після стерилізації фунгіцидами в культурі *in vitro*

Примітка – *позначення стандартного відхилення довжини кореня проростків на кожен день спостереження

Fig. 2. Dynamics of increase in average root length of maize after sterilization with fungicides at *in vitro* culture

Note – *marking the standard deviation of the root length of the seedlings for each day of observations

Хоча у досліді з препаратом «Хорус» та контролем рівень проростання був практично однаковим, саме цей препарат продемонстрував статистично значущий позитивний вплив на розвиток кореневої системи. Середня довжина коренів після обробки препаратом «Хорус» перевищувала контрольні значення на 45%. У варіанті з препаратом «Фундазол» було зафіксовано збільшення довжини кореня на 11%, однак загальний рівень проростання залишався нижчим за контроль (23% проти 43%). Навпаки, обробка препаратом «Хінозол» призвела до зменшення довжини коренів на 18,5% у порівнянні з контролем, що узгоджується з раніше виявленим загальним пригніченням проростання. Дослідження показали, що найвищий відсоток стерильних (не контамінованих) експлантів було отримано у варіантах з препаратами «Хорус» (85,8%) та «Хінозол» (95,2%). Проте, незважаючи на високу стерильність, варіант з хінозолом виявився непридатним через виражену фітотоксичність.

Таким чином, оптимальним за комплексом показників (проростання, довжина коренів, життєздатність і стерильність) в умовах даного досліді виявився саме фунгіцид «Хорус».

Виявлення впливу фітогормонів на процеси регенерації кукурудзи

У результаті наших досліджень з використанням живильних середовищ, модифікованих за фітогормональним складом, була проаналізована приживлюваність ізолюваних зародків кукурудзи на 3-тій, 5-тій, 7-мий та 10-тий день від початку культивування (табл. 3).

На 5-й день культивування була виявлена різниця між приживлюваністю експлантів у контрольному варіанті та модифікованих середовищах з ре-



Таблиця 3

Введення експлантів кукурудзи на модифіковані живильні середовища

Table 3

Inoculation of maize explants on modified culture media

Варіант середовища	Приживлюваність, %				Середнє значення приживлюваності за 10 днів Σ, %
	День від початку культивування				
	3	5	7	10	
I	99	75	62	55	72,75 ≤ 73
II	100	84	78	70	82,68 ≤ 83
MS k	92	70	47	30	59,5 ≤ 60

n = 60

 Σ – середнє значення приживлюваності за 10 днів у %.

I – середовище з додаванням 2 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л ІОК; II – середовище з 2 мг/л ІОК та 0,5 мг/л 6-БАП; MS k – контрольне середовище.

 Σ – average survival rate for 10 days in %.

I – medium with the addition of 2 mg/l 6-BAP and 0.5 mg/l IAA; II – medium with 2 mg/l IAA and 0.5 mg/l 6-BAP; MS k – control medium.

гуляторами росту. На контрольному середовищі MS без додавання фітогормонів життєздатними були 70% експлантів, на середовищі з додаванням 6-БАП в концентрації 2 мг/л та ІОК 0,5 мг/л (середовище I) – 75%, на MS з ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л (середовище II) – 84%.

На 5–7 день спостерігали суттєве зниження життєздатності експлантів, що було спричинене контамінацією мікроорганізмами, які чинили негативний вплив на рослинний матеріал. Була вирахована середня приживлюваність експлантів за 10 днів культивування, відповідно до наведених даних (табл. 3) на середовищі II приживлюваність була на 12–13% вищою ніж на середовищі I, та на 22–23% вищою, ніж у контролі.

Було встановлено, що найкращий показник приживлюваності ізольованих зародків дослідного гібриду кукурудзи на 10 день культивування – 70% було зафіксовано середовищі II – MS з 2 мг/л ІОК та 0,5 мг/л 6-БАП.

Утворення калусу – один з параметрів, за яким оцінювали вплив фітогормонів на ініціальні експланти. Починаючи з 3–5 дня культивування відмічали початок процесів дедиференціації тканин та в подальшому утворення калусу (рис. 3).

Візуальні спостереження показали, що калус був білувато-жовтого кольору, іноді напівпрозорий, та з видимими щільними морфогенними зонами.

У процесі культивування спостерігали різницю в утворенні калусних зон між дослідними варіантами середовищ (рис. 4). Так, у середовищі II з високим вмістом ауксинів (ІОК 2 мг/л) відбувалася індукція калусогенезу – 47% від загальної кількості експлантів у даному варіанті. При цьому на контрольному середовищі MS без додавання регуляторів росту калусні тканини не утворювалися, ізольовані зрілі зародки залишалися без змін, або проявляли ознаки пагоноутворення.

Дані результати співпадають та підтверджують стимулювальну роль ауксинів в утворенні калусної тканини [3].



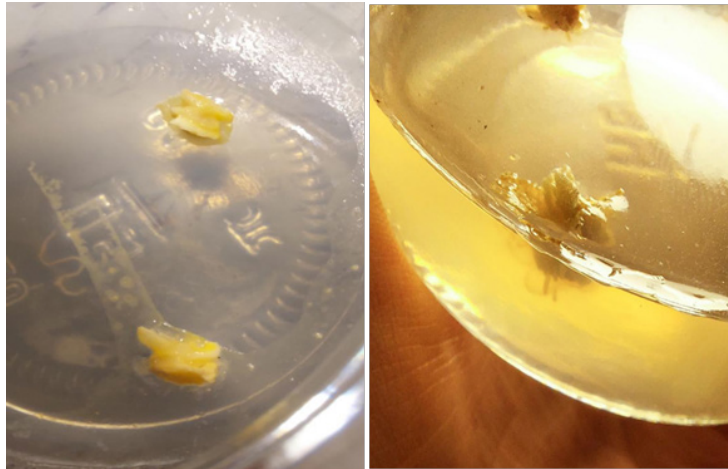


Рис. 3. Утворення калусної тканини з ізольованих зародків кукурудзи на 7-ий день спостережень

Fig. 3. Callus tissue formation from isolated maize germs on the 7th day of observation



Рис. 4. Утворення калусу та пагонів із ізольованих зародків кукурудзи на 7-мий день експерименту

I – середовище з додаванням 2 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л ІОК; II – середовище з 2 мг/л ІОК та 0,5 мг/л 6-БАП; MS k – контрольне середовище.

Fig. 4. Callus and shoot formation from isolated maize germs on the 7th day of the experiment
I – medium with the addition of 2 mg/l 6-BAP and 0.5 mg/l IAA; II – medium with 2 mg/l IAA and 0.5 mg/l 6-BAP; MS k – control medium.

Було зроблено висновок, що середовище MS з додаванням ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л найкраще впливало на приживлюваність експлантів (84%) та на утворення калусу (47%).

Активацію ростових процесів введених експлантів визначав початок набухання та проліферації зародку на 3–4 день експерименту. Розвиток пагонів візуально помітним був на 7-мий день (рис. 5) з найкращими показниками 66% на середовищі I (6-БАП 2 мг/л, ІОК 0,5 мг/л).

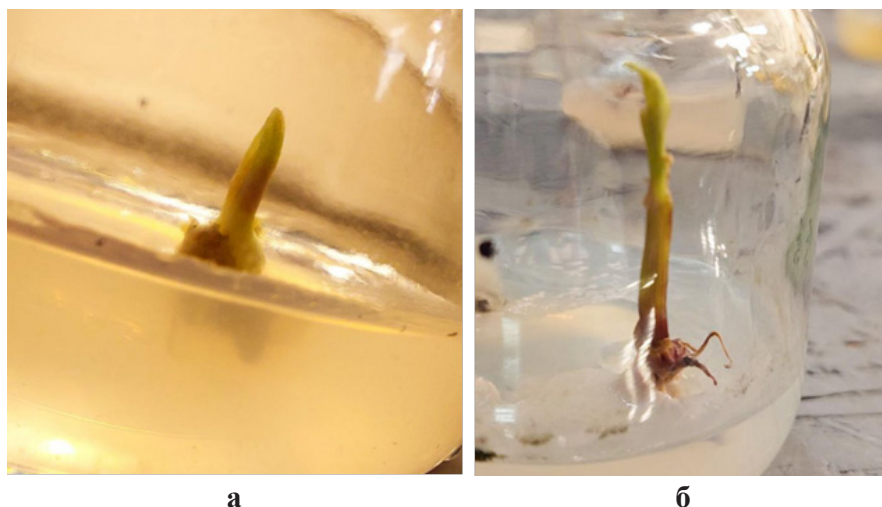


Рис. 5. Розвиток пагонів із зародків на 7-мий (а) та 14-тий (б) день культивування на середовищі І (6-БАП 2 мг/л, ІОК 0,5 мг/л)

Fig. 5. Development of shoots from maize germs on the 7th (a) and 14th (b) day of cultivation on medium I (6-BAP 2 mg/l, IAA 0.5 mg/l)

Пагони, що розвивалися, з перших проявів проліферації мали ознаки органогенезу та з кожним днем культивування набували зеленого насиченого кольору. На контрольному середовищі, згідно середніх даних на 10-ий день культивування, було зафіксовано утворення пагонів лише у 12% ініціальних експлантів (рис. 4). На середовищі ІІ (ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л) було відмічено 23% формування пагонів.

Результати дослідження підтверджують позитивний вплив цитокінінів, зокрема 6-БАП, на стимуляцію утворення пагонів із зародків кукурудзи в умовах *in vitro* [11].

Отже, для отримання калусної тканини найкращим було середовище з високим вмістом ауксинів – ІОК 2 мг/л та зменшеним вмістом цитокінінів 6-БАП 0,5 мг/л. При цьому проростки краще розвивалися на середовищі з підвищеною концентрацією цитокінінів (6-БАП 2 мг/л) та зменшеним вмістом ауксинів (ІОК – 0,5 мг/л).

Було пораховано відсоток експлантів, що утворили корені, від загальної кількості введених екземплярів (рис. 6). Виходячи з наведених даних на 10-ту добу стимуляція коренеутворення відбувалася у варіанті з додаванням до середовища ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л на 11% інтенсивніше ніж при додаванні 0,5 мг/л ІОК та 6-БАП 2 мг/л, та вдвічі інтенсивніше у порівнянні з контролем.

Наші результати узгоджуються з основними положеннями про ключову роль ауксинів в ініціації органогенезу та ризогенезу [1].

У результаті отриманих даних можна зробити висновок про вплив концентрації фітогормонів на процеси росту і розвитку ізолюваних зародків кукурудзи гібриду DCS 1541 у культурі *in vitro*. Вдало підібрана концентрація та співвідношення ауксинів та цитокінінів, в нашому випадку ІОК, та 6-БАП

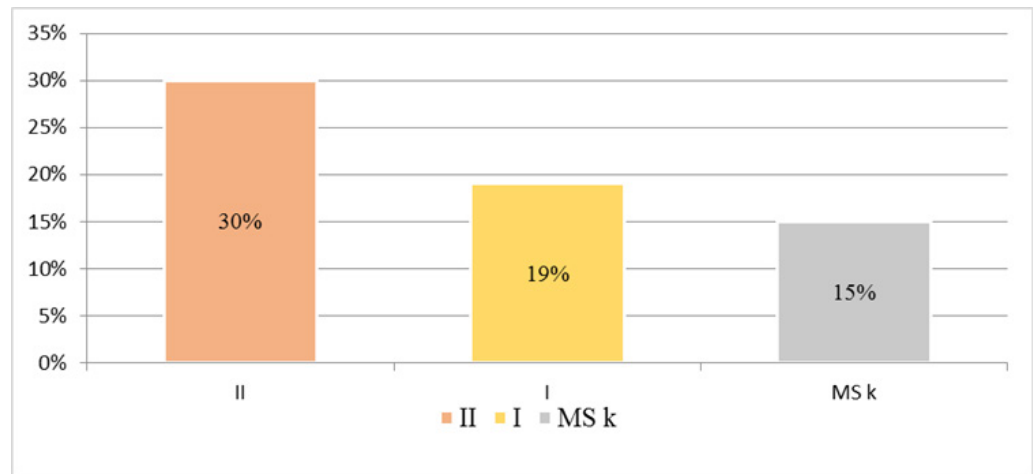


Рис. 6. Кількість експлантів (%), що утворили корені на 10-тий день культивування
 I – середовище з додаванням 2 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л ІОК; II – середовище з 2 мг/л ІОК та 0,5 мг/л 6-БАП; MS k – контрольне середовище.

Fig. 6. Number of explants (%) that formed roots on the 10th day of cultivation
 I – medium with the addition of 2 mg/l 6-BAP and 0.5 mg/l IAA; II – medium with 2 mg/l IAA and 0.5 mg/l 6-BAP; MS k – control medium.

дозволяє отримати рослини-регенеранти з бажаними характеристиками, що будуть вільні від сапрофітної мікробіоти.

У підсумку, результати експериментів дозволили встановити, що найбільший вихід стерильних експлантів кукурудзи культури *in vitro* забезпечило використання фунгіцидів «Хорус» (85,8%) та «Хінозол» (95,2%). За показником життєздатності експлантів та довжиною коренів кращою була обробка фунгіцидом «Хорус» (на 15% і 45% більше за контроль відповідно). Отже, отримані результати дозволяють рекомендувати препарат «Хорус» як перспективний фунгіцид для застосування в *in vitro* стерилізації ініціальних експлантів кукурудзи з урахуванням ефективного контролю контамінації та збереження життєздатності тканин.

Встановлено, що середовище MS з додаванням ІОК 2 мг/л та 6-БАП 0,5 мг/л найкраще впливало на приживлюваність експлантів (84%), на процеси утворення калусу (47%), а також розвиток коренів (30%). Для стимуляції процесів проліферації, утворення пагонів та в подальшому отримання повноцінних мікроклонів кукурудзи *in vitro* кращим було середовище MS з додаванням 6-БАП 2 мг/л та ІОК 0,5 мг/л.

Рекомендовано використання такої схеми для стерилізації насіння кукурудзи як експлантів для культури *in vitro*: промивка мильним розчином (5 хв), промивка проточною водою (5 хв), обробка засобом «Білізна» (NaOCl 10,5 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистилятом двічі, обробка препаратом «Хорус» (1,4 г/л, 15 хв), промивка стерильним дистилятом тричі. А також використання живильних середовищ з збільшеним вмістом ауксинів (ІОК 2 мг/л) для індукування калусів і ризогенезу та цитокінінів (6-БАП 2 мг/л) для стимуляції органогенезу.



N. I. Tesliuk, K. O. Shulha, T. V. Ivanytsia,
K. Y. Zhylovska

Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Vsevoloda Zmiienka St, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: natalana@onu.edu.ua

OPTIMIZATION OF EXPLANT STERILIZATION PROTOCOL AND PHYTOHORMONAL COMPOSITION OF THE CULTURE MEDIUM FOR ESTABLISHMENT OF MAIZE IN VITRO CULTURE

Summary

The **aim** of the study was to optimize the sterilization scheme of explants using antifungal agents and to determine the effect of the phytohormonal composition of the nutrient medium on the stimulation of callus formation and shoot and root proliferation in maize in vitro. **Materials and methods.** At the stage of introducing maize seeds into in vitro culture, four sterilization schemes with and without fungicides were tested. The effect of cytokinin and auxin phytohormones: 6-benzylaminopurine (6-BAP) and indoleacetic acid (IAA) on the regeneration processes of maize in in vitro culture was determined. **Results.** It was found that the highest yield of sterile explants in in vitro culture was provided by treatment with "Horus" (85.8%) and "Hinozol" (95.2%). In terms of seedling viability and root length, the best results were obtained with Horus (15% and 45% higher than the control, respectively). It was established that the MS medium with 2 mg/l IAA and 0.5 mg/l 6-BAP had the best effect on explant survival (84%), callus formation processes (47%) and rhizogenesis (30%), while MS with 6-BAP 2 mg/l and IAA 0.5 mg/l was best for stimulating shoot formation. **Conclusion.** The optimal scheme for sterilizing maize seeds as explants for in vitro culture is: washing with soap solution (5 min), washing with running water (5 min), treatment with "Bleach" (NaOCl 10.5 g/l, 15 min), washing with sterile distillate twice, treatment with "Horus" (1.4 g/l, 15 min), washing with sterile distillate three times. It was found that the best medium for introduction into a sterile culture was MS medium: with an increased content of auxins (IAA 2 mg/l) – for inducing callus and rhizogenesis; cytokinins (6-BAP 2 mg/l) – for stimulating organogenesis.

Key words: explant sterilization, *Zea mays* L., phytohormones, culture medium, in vitro culture.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О., Тараненко А.М., Моргул Б.В. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка // Фізіологія рослин і генетика. – 2015. – С. 1–7.
2. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Бацманова Л.М. Підручник «Фізіологія рослин» // Укр. ботан. журн. – 2008. – Т. 65, № 5. – С. 775–780.
3. Сатарова Т.М., Піралов Г.Р., Боденко Н.А., Абраїмова О.Є. Калусогенез у ліній кукурудзи на фоні ауксинового навантаження // Бюлетень Інституту зернового господарства. – 2010. – № 12. – С. 5–15.



4. Титаренко Н., Теслюк Н. Використання препаратів фунгіцидної дії для запобігання контамінації під час введення рослин в культуру *in vitro* // Грааль науки. – 2021. – № 7. – С. 131–133.
5. Федоренко Е.М., Алдошин А.В., Черенкова П.Т. Методика виробництва насіння кукурудзи: монографія // Дніпропетровськ: Акцент ПП. – 2013. – 52 с.
6. Hong J.K., Baek J., Park S.R., Lee G.S., Suh E.J. A New Protocol to Mitigate Damage to Germination Caused by Black Layers in Maize (*Zea mays* L.) Seeds // Agriculture, 13, 2147. – 2023.
DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13112147>
7. Huang X.Q., Wei Z.M. High frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays*) // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22. – P. 793–800. DOI: 10.1007/s00299-003-0748-9
8. Kranz E. *In vitro* fertilization: Analysis of early post-fertilization development using cytological and molecular techniques // Sex Plant Reprod. – 2008. – Vol. 21. – P. 67–77. DOI: 10.1007/s00497-007-0060-x
9. Krishan K., Alok A., Abhishek K., Bhupender K., Sujay R. *In vitro* regeneration in maize (*Zea mays* L.) // Maize journal. – 2021. – T. 10, № 1. – С. 6–12.
10. Odunayo J., Olawuyi O., Olugbenga D., Olumayowa M. *In vitro* regeneration and proliferation of maize (*Zea mays* L.) genotypes through direct organogenesis // Journal of natural sciences research. – 2019.
DOI: 10.7176/JNSR
11. Ombori O. Gitonga N.M., Mschuka J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines // Biotechnology. – 2008. – № 7 (2). – P. 224–232.
DOI: 10.3923/biotech.2008.224.232
12. Parnell J. Jacob, Pal Gaurav, Awan Ayesha, Vintila Simina, Houdinet Gabriella, Hawkes Christine V., Balint-Kurti Peter J., Wagner Maggie R., Kleiner Manuel. Effective seed sterilization methods require optimization across maize geno-types // Phytobiomes journal. – 2024.
DOI: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-23-0137-R>
13. Pathi K. Tula S., Huda K., Srivastava V., Tuteja N. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of indian maize (*Zea mays* L.) // Plant signaling & behavior. – Vol. 8, no. 10. – 2013. – P. 40–45.
DOI: 10.4161/psb.25891
14. Wahyudi A.T., Priyanto J.A., Fjirina H., Mariastuti H.D., Nawangsih A.A. *Streptomyces* spp. from rhizosphere soil of maize with potential as plant growth promoter // Biodiversitas. – 2019. – V. 20 (9). – P. 247–255.
DOI: 10.13057/biodiv/d200916
15. Zameer Z., Mohsin S., Hasnain A., Maqbool A., Malik K. A. Influence of explant sources on *in vitro* callogenesis and regeneration in maize (*Zea mays* L.) // Pakistan journal of agricultural research. – 2020. – T. 33, № 4.
DOI: 10.17582/journal.pjar/2020/33.4.917.925



REFERENCES

1. Gorbatyuk IR, Hnatyuk IS, Bannikova MO, Taranenko AM, Morgun BV. Influence of growth regulators on the regeneration capacity of callus of soft wheat cv. Zymoyarka. *Fiziol Roslyn Genet.* 2015;2015(1):1–7 (in Ukrainian).
2. Musiyenko MM, Parshykova TV, Batsmanova LM. Plant physiology. *Ukr Bot Zh.* 2008;65(5):775–780 (in Ukrainian).
3. Satarova TM, Piralov GR, Bodenko NA, Abraimova OYe. Callus formation in maize lines under auxin load. *Bull Inst Grain Farming.* 2010;12:5–15 (in Ukrainian).
4. Tytarenko N, Teslyuk N. Use of fungicidal agents to prevent contamination during the introduction of plants into *in vitro* culture. *Graal Nauky.* 2021;7:131–133 (in Ukrainian).
5. Fedorenko EM, Aldoshyn AV, Cherenkova T. Methodology of maize seed production: monograph. Dnipro: Aktsent PP; 2013. 52 p.
6. Hong JK, Baek J, Park SR, Lee GS, Suh EJ. A new protocol to mitigate damage to germination caused by black layers in maize (*Zea mays* L.) seeds. *Agriculture.* 2023;13:2147.
DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13112147>
7. Huang XQ, Wei ZM. High frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Rep.* 2004;22:793–800. DOI: 10.1007/s00299-003-0748-9
8. Kranz E, Scholten S. *In vitro* fertilization: analysis of early post-fertilization development using cytological and molecular techniques. *Sex Plant Reprod.* 2008;21:67–77. DOI: 10.1007/s00497-007-0060-x
9. Krishan K, Alok A, Abhishek K, Bhupender K, Sujay R. *In vitro* regeneration in maize (*Zea mays* L.). *Maize J.* 2021;10(1):6–12.
10. Odunayo J, Olawuyi O, Olugbenga D, Olumayowa M. *In vitro* regeneration and proliferation of maize (*Zea mays* L.) genotypes through direct organogenesis. *J Nat Sci Res.* 2019. DOI: 10.7176/JNSR
11. Ombori O, Gitonga NM, Mschuka J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Biotechnol.* 2008;7(2):224–232.
DOI: 10.3923/biotech.2008.224.232
12. Parnell J, Pal G, Awan A, Vintila S, Houdinet G, Hawkes CV, Balint-Kurti PJ, Wagner MR, Kleiner M. Effective seed sterilization methods require optimization across maize genotypes. *Phytobiomes J.* 2024.
DOI: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-23-0137-R>
13. Pathi K, Tula S, Huda K, Srivastava V, Tuteja N. 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.* 2013;8(10):40–45. DOI: 10.4161/psb.25891
14. Wahyudi AT, Priyanto JA, Fijrina H, Mariastuti HD, Nawangsih AA. *Streptomyces* spp. from rhizosphere soil of maize with potential as plant growth promoter. *Biodiversitas.* 2019;20(9):247–255.
DOI: 10.13057/biodiv/d200916



15. Zameer Z, Mohsin S, Hasnain A, Maqbool A, Malik KA. Influence of explant sources on *in vitro* callogenesis and regeneration in maize (*Zea mays* L.). Pak J Agric Res. 2020;33(4). DOI: 10.17582/journal.pjar/2020/33.4.917.925

Стаття надійшла до редакції 26.05.2025 р.

