



БИОЛОГИЯ

УДК 581.6:601

Индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы

Б. М. Х. Хумуд, О. И. Юдакова

Хумуд Бутхайна Мохаммед Хумуд, аспирант кафедры генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, bobogold18@gmail.com

Юдакова Ольга Ивановна, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой генетики, декан биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, yudakovaoi@info.sgu.ru

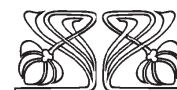
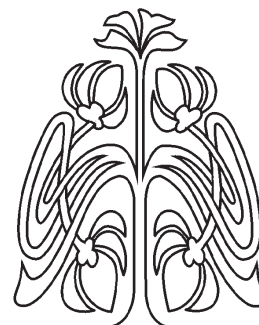
Регенерация растений в культуре *in vitro* через прямой органогенез позволяет избежать соматклональной изменчивости. Целью исследования была индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей линий кукурузы: АТТМ (bm, wx, y), АТТМ (bm, y), АТТМ (bm, g, В-тип ЦМС), АТ-3 (4п). Данные линии характеризуются наследственной предрасположенностью к партеногенезу. В качестве первичного экспланта использовали изолированные зрелые зародыши, выделенные из стерильных зерновок. Для инициации стерильной культуры оптимальной оказалась среда Мурасиге – Скуга (MS) с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара (PanGeas) без гормонов. Через 7 сут от начала культивирования проростки срезали и переносили на среду MS с добавлением 0,5 и 2,0 мг/л БАП (6-бензиламинопурин). Каллус не формировался. В зоне нижних узлов проростков развивались пазушные почки, которые затем прорастали в боковые побеги. Время заложения пазушных почек, их количество и длина пазушных побегов зависели от концентрации БАП в среде. Полученные результаты показали, что для индукции прямого органогенеза у изученных линий эффективнее использовать среду MS с добавлением 2,0 мг/л БАП. На данной среде пазушные почки в количестве от 3 до 10 закладывались на 1–2-й неделе культивирования. Через 5 недель культивирования регенерант представлял собой пучок из 5–10 побегов длиной 10–15 мм. Для удлинения микропобегов их, не разделяя, переносили на среду MS без гормонов или MS с 0,2 мг/л БАП. На среде с пониженным содержанием БАП происходило удлинение побегов, что позволяло разделять их и переводить на среды с ауксинами для дальнейшего укоренения.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, культивирование *in vitro*, культура зрелых зародышей, прямой органогенез, кукуруза, *Zea mays*.

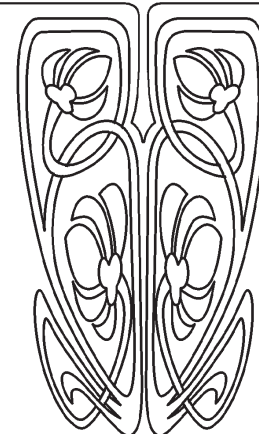
DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294>

Кукуруза (*Zea mays* L.) – важная продовольственная, кормовая и техническая культура. Для обеспечения разных направлений ее практического использования и расширяющегося производства требуется создание сортов с различным набором полезных признаков и адаптированных к разным эколого-климатическим условиям. Особенно актуальным является выведение новых высокопродуктивных и экологически пластичных сортов и линий для выращивания в умеренных широтах, так как их генетическое разнообразие ограничено.

В селекции кукурузы широко используются такие современные методы, как удвоение гаплоидов (HD-технологии), трансгенез, культура тканей и органов *in vitro*. Регенерация растений *in vitro* может происходить как посредством прямого органогенеза за счет акти-



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





вазии существующих меристем экспланта, так и через каллусные культуры с последующим развитием эмбриоидов и побегов *de novo*. В настоящее время накоплен значительный опыт регенерации растений кукурузы посредством соматического эмбриогенеза при использовании в качестве эксплантов незрелых и зрелых зародышей [1–3], неоплодотворенных завязей [4], оплодотворенных семязачатков [5], пыльников [6], сегментов проростков [7], листьев [8] и др. Регенерация через каллусные культуры часто сопровождается соматической изменчивостью. В зависимости от целей эксперимента она способна оказать на его результаты как положительное, так и отрицательное влияние. Ее можно использовать для увеличения генетического разнообразия исходного материала, но она будет крайне нежелательна при клонировании уникальных генотипов и проведении генноинженерных исследований. Для снижения риска соматической изменчивости необходима разработка технологий регенерации растений через прямой органогенез, которые исключают этап образования каллуса. В отличие от многочисленных исследований по соматическому эмбриогенезу у кукурузы работы по индукции прямого органогенеза выполнены лишь для единичных генотипов [9–13]. Способность к регенерации растений в условиях *in vitro*, как известно, во многом определяется его генотипом. Считают, что у кукурузы только небольшое количество генотипов обладает регенерационной способностью [14]. В связи с этим актуальными являются поиск новых «отзывчивых» к культуре *in vitro* генотипов кукурузы и индукция у них прямого органогенеза.

Целью нашего исследования была индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей партеногенетических линий кукурузы, созданных в Саратовском государственном университете.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y), АТТМ (bm, y), АТТМ (bm, g, В-тип ЦМС), АТ-3 (4n), которые характеризуются склонностью к наследуемому партеногенезу и регулярно дают в потомстве матроклинные гаплоиды [15, 16].

В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши. Зерновки замачивали в дистиллированной воде на 24 ч. Удаляли семенную оболочку в области зародыша и стерилизовали 70% этиловым спиртом и 0,1% ртутьсодержащим раствором в течение 5 мин. Отмывали тремя порциями стерильной дистиллированной воды. В условиях ламинар-бокса

из зерновок вычленили зародыши и пассировали их в чашки Петри на искусственную питательную среду. Для инициации стерильной культуры были протестированы следующие среды: 1) голодный агар; 2) Мурасиге – Скуга (MS) [17] с добавлением витаминов по прописи среды, 20 мг/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreac), без добавления гормонов; 3) MS с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Для собственно размножения использовали среды MS с добавлением БАП в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л. Среду автоклавировали 20 мин при 120° С. Этапы инициации стерильной культуры проводили в чашках Петри, этапы микро-размножения – в стеклянных колбах объемом 200 мл. В чашки Петри и колбы добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в климатокамере Sanyo MLR-352 при температуре 24° С при 16-часовом фотопериоде.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программ Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

На всех апробированных вариантах питательных сред изолированные зародыши прорастали с частотой около 90%. Однако на голодном агаре у проростков наблюдалась витрификация тканей, а на среде с добавлением БАП – такие морфозы, как недоразвитие колеоптиле, закручивание листьев и изменение их формы. Нормальные жизнеспособные проростки были получены только на среде MS без гормонов.

Через 7 сут от начала культивирования проростки переносили на среды MS с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л. Приживаемость эксплантов варьировала от 33% у линии АТ-3 (4n) до 92% у линии АТТМ (bm, wx, y) (рис. 1). Выявлено влияние генотипа на приживаемость эксплантов.

На среде для размножения, дополненной 0,5 мг/л БАП, у проростков всех изученных линий в зоне среза каллус не формировался (рис. 2). Проросток рос и через 3–4 недели культивирования состоял из нескольких укороченных междоузлий и 4–5 листьев. В зоне узла, ближайшего к поверхности питательной среды, в пазухе листа закладывались 1–3 пазушные почки, которые можно было обнаружить только после удаления листьев при анализе проростков с помощью бинокулярного микроскопа. Через 7–8 недель пазушные почки прорастали в короткие побеги длиной 2–3 мм (см. рис. 2, а). Как правило, они были закрыты влагалищем листа, поэтому эксплант визуально выглядел как один первичный побег.

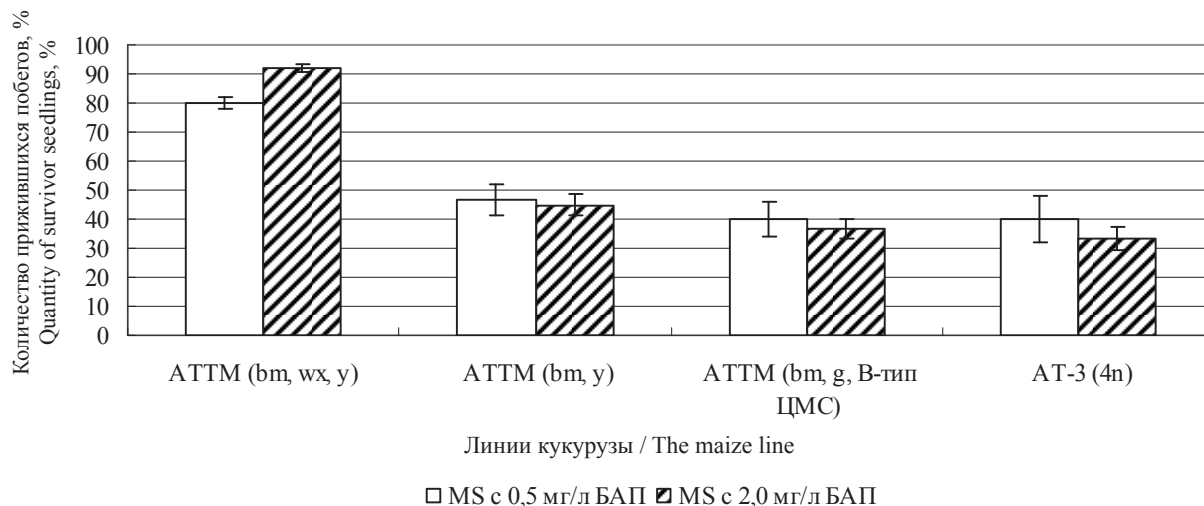


Рис. 1. Частота прижившихся проростков линий кукурузы на среде для размножения MS, дополненной 0,5 и 2,0 мг/л БАП
 Fig. 1. The frequency of the survivors seedlings of maize lines on the MS medium, supplemented with 0,5 and 2,0 mg/l BAP

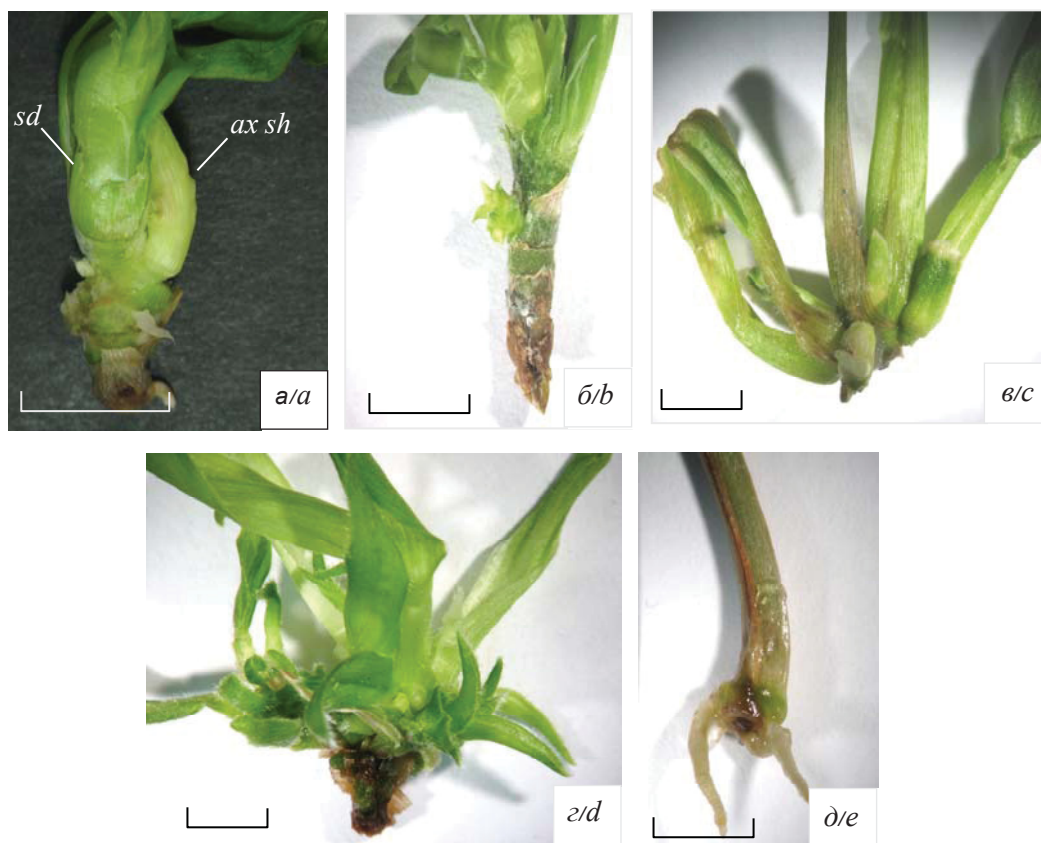


Рис. 2. Проростки кукурузы *in vitro*: а – проросток (*sd*) с развившимся пазушным побегом (*ax sh*) на среде MS с 0,5 мг/л БАП через 7 недель культивирования; б – проросток с пазушными побегами на среде MS с 2,0 мг/л БАП через 4 недели культивирования; в, г – регенерант с многочисленными пазушными побегами на среде MS с 2,0 мг/л БАП через 5 недель культивирования; д – побег со спонтанно развившимися корнями на среде MS, дополненной 0,2 мг/л БАП, через 15 сут культивирования. Масштабная линейка: 5 мм
 Fig. 2. Maize seedlings *in vitro*: a – seedling (*sd*) with developed axillary shoot (*ax sh*) on MS medium, supplemented with 0,5 mg/l BAP after 7 weeks of cultivation; b – seedling with axillary shoots on the MS medium, supplemented with 2,0 mg/l BAP after 4 weeks of cultivation; c, d – regenerant with numerous axillary shoots on the MS medium, supplemented with 2,0 mg/l BAP after 5 weeks of cultivation; e – seedling with spontaneously developed roots on MS medium, supplemented with 0,2 mg/l BAP after 15 days of cultivation. Scale bar: 5 mm



На среде с 2,0 мг/л БАП процесс образования пазушных побегов ускорялся. Почка формировалась уже на первой и второй неделе культивирования, а пазушные побеги – через 3–4 недели культивирования (см. рис. 2, б). Их количество увеличивалось до 7–10. При этом пазушные почки развивались не только в зоне ближайшего к поверхности среды узла, но и на

вышерасположенных узлах. Через 5 недель регенерант представлял собой пучок из укороченных побегов (см. рис. 2, в, г). Длина пазушных побегов достигала 10–15 мм. Результаты анализа показали отсутствие влияния генотипа линий на показатель «количество пазушных побегов» и зависимость этого показателя от концентрации БАП в среде для размножения (рис. 3).

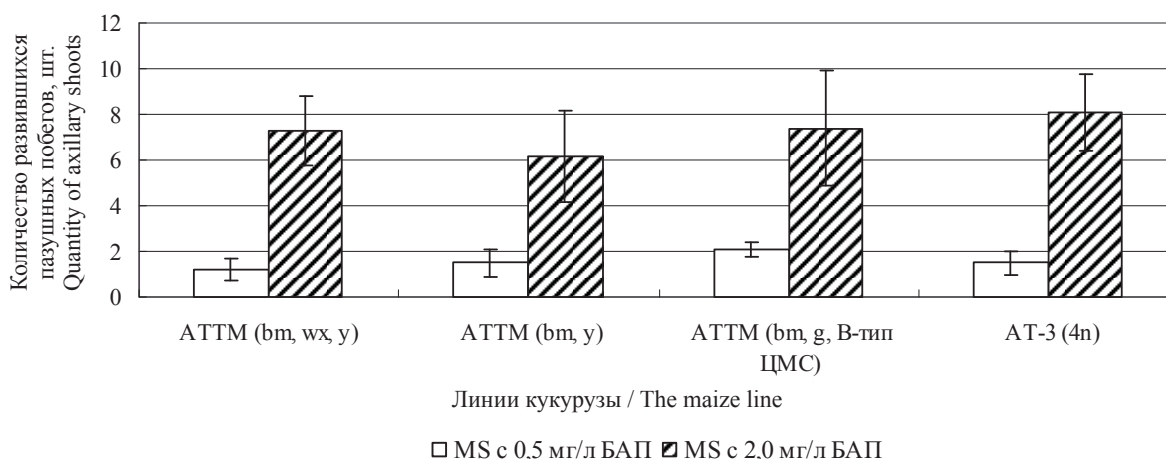


Рис. 3. Количество развившихся побегов на среде для размножения MS, дополненной 0,5 и 2,0 мг/л БАП
Fig. 3. The number of developed shoots on the MS medium, supplemented with 0,5 and 2,0 mg/l BAP

Для удлинения развившихся боковых микропобегов их, не разделяя, переносили на среду MS без гормонов или MS с 0,2 мг/л БАП. На безгормональной среде побеги не удлинялись и желтели, на среде с пониженным содержанием БАП происходило удлинение побегов, что позволяло разделять их и переводить на среды с ауксинами для дальнейшего укоренения. Следует отметить, что на среде с пониженным содержанием БАП у некоторых побегов спонтанно развивались корни (см. рис. 2, д).

Таким образом, нами была успешно проведена индукция прямого органогенеза для пяти генотипов кукурузы, подобраны оптимальные среды для инициации стерильной культуры и собственно микроразмножения; выявлено влияние генотипа на приживаемость побегов изученных линий в культуре *in vitro*, влияние концентрации БАП в среде для размножения на количество пазушных побегов.

Полученные результаты открывают перспективы для использования разработанной технологии в генно-инженерных исследованиях с изученными линиями.

Благодарности

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рам-

ках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 6.8789.2017/БЧ.

Список литературы

1. Huang X. Q., Wei Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Rep. 2004. № 22. P. 793–800.
2. Joshi J. B., Yathish K. R., Amalraj J. J., Kumar K. K., Kokiladevi E., Arul L., Gnanam R., Balasubramanian P., Sudhakar D. A high-throughput regeneration protocol for recalcitrant tropical Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds // Maydica Electronic Publication. 2014. Vol. 59. P. 211–216.
3. Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J. C., Fatma T., Dass S. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2010. Vol. 100, № 1. P. 31–37.
4. Алаторцева Т. А., Тьрнов В. С. Гормоннезависимое проявление эмбриогенеза *in vitro* у партеногенетической линии кукурузы // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2003. № 2. С. 207–211.
5. Tang F., Tao Y., Zhao T., Wang G. *In vitro* production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2006. Vol. 84. P. 233–237.
6. Obert B., Barnabas B. Colchicine induced embryogenesis in maize // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2004. Vol. 77. P. 283–285.



7. Santos M. A., Torne J. M., Blanco J. L. Methods of obtaining maize totipotent tissue. I. Seedling segments culture // *Plant Sci. Lett.* 1984. Vol. 33. P. 309–315.
8. Ahmadabadi M., Ruf S., Bock R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.) // *Transgenic Res.* 2007. Vol. 16. P. 437–448.
9. Mushke R., Yarra R., Bulle M. Efficient *in vitro* direct shoot organogenesis from seedling derived split node explants of maize (*Zea mays* L.) // *J. of Genetic Engineering and Biotechnology.* 2016. Vol. 14. P. 49–53.
10. Ahmad M. Z., Hussain I., Ahmed S., Roomi S. Direct *in vitro* multiple shoot regeneration in maize (*Zea mays*) inbred lines // *J. Innov. Bio-Res.* 2017. Vol. 1, № 1. P. 24–29.
11. Ovchinnikova V. N., Sotchenko V. S., Sotchenko Y. V., Varlamiva N. V., Radionova M. A., Kharchenko P. N. Susceptibility of maize mesocotyl culture to agrobacterium transformation and its *in vitro* regeneration // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. Vol. 54, № 8. P. 808–815.
12. Хумуд Б. М. Х., Анапасова Н. В., Юдакова О. И. Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы // *Изв. Сарат. ун-та. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2018. Т. 18, вып. 3. С. 320–324. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324
13. Olawuyi O. J., Dalamu O., Olowe O. M. *In vitro* regeneration and proliferation of maize (*Zea mays* L.) genotypes through direct organogenesis // *J. of Natural Sci. Res.* 2019. Vol. 9, № 6. P. 65–73.
14. Armstrong C., Green C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline // *Planta.* 1985. Vol. 164, № 2. P. 207–214.
15. Гуторова О. В., Анапасова Н. В., Юдакова О. И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самар. науч. центра РАН.* 2016. Т. 18, № 2-2. С. 341–344.
16. Анапасова Н. В., Гуторова О. В., Юдакова О. И., Смолькина Ю. В. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самар. науч. центра РАН.* 2017. Т. 19, № 2-2. С. 216–219.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

Образец для цитирования:

Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2019. Т. 19, вып. 3. С. 289–294. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294>

Induction of Direct Organogenesis in the Culture of Mature Embryo in Maize

B. M. H. Humood, O. I. Yudakova

Buthaina M. H. Humood, <https://orcid.org/0000-0001-9509-8562>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, bobogold18@gmail.com

Olga I. Yudakova, <https://orcid.org/0000-0003-1391-6803>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, yudakovaio@info.sgu.ru

Regeneration of plants *in vitro* through direct organogenesis allows the avoidance of somaclonal variation. The aim of our study was the induction of direct organogenesis in the culture of mature embryo in maize lines created at Saratov State University: ATTМ (bm, wx, y), ATTМ (bm, y), ATTМ (bm, g, V-type CMS), AT-3 (4n). These lines are characterized by genetic predisposition to parthenogenesis. The mature embryos isolated from sterile grains were used as a primary explant. Murashige-Skoogha (MS) supplemented with vitamins according to the recipe, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar (Panreac) without hormones was the most optimal for the initiation of a sterile culture. After 7 days of cultivation, the seedlings were cut and transferred to the MS medium, supplemented with 0,5 and 2,0 mg/l BAP (6-benzylaminopurine). Callus was not forming. Axillary buds and then axillary shoots were developed in the area of the seedlings' nodes. The timing of the axillary bud development, the number of buds and the length of the axillary shoots depended on the concentration of BAP in the

medium. The results showed that MS medium supplemented with 2,0 mg/l BAP is more effective for the induction of direct organogenesis in the studied lines. Axillary buds (3-10) were laid in the 1–2nd week of cultivation on this medium. After 5 weeks of cultivation, the regenerant was a bundle of 5–10 shoots 10–15 mm long. Developed shoots were transferred, without dividing, on the MS medium without hormones or with 0,2 mg/l BAP for elongation. The elongation of the shoots occurred on the medium with a low concentration of BAP. This made it possible to separate the shoots and translate them on the medium with auxins for rooting.

Keywords: clonal micropropagation, *in vitro* cultivation, mature embryo culture, direct organogenesis, maize, *Zea mays*.

Acknowledgments: The work was carried out with the partial financial support of the Ministry of Education and Science of Russia within the framework of the basic part of the state task in the sphere of scientific activity on the assignment No. 6.8798.2017/BCh.

References

1. Huang X. Q., Wei Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.*, 2004, no. 22, pp. 793–800.
2. Joshi J. B., Yathish K. R., Amalraj J. J., Kumar K. K., Kokiladevi E., Arul L., Gnanam R., Balasubramanian P.,



- Sudhakar D. A high-throughput regeneration protocol for recalcitrant tropical Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Maydica electronic publication*, 2014, vol. 59, pp. 211–216.
3. Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J. C., Fatma T., Dass S. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2010, vol. 100, no. 1, pp. 31–37.
 4. Alatorseva T. A., Tyrnov V. S. Hormone-independent manifestation of in vitro embryogenesis in parthenogenetic maize lines. *Bulletin of the Botanical Garden of Saratov State University*, 2003, no. 2, pp. 207–211 (in Russian).
 5. Tang F., Tao Y., Zhao T., Wang G. In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2006, vol. 84, pp. 233–237.
 6. Obert B., Barnabas B. Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 2004, vol. 77, pp. 283–285.
 7. Santos M. A., Torne J. M., Blanco J. L. Methods of obtaining maize totipotent tissue. I. Seedling segments culture. *Plant Sci Lett.*, 1984, vol. 33, pp. 309–315.
 8. Ahmadabadi M., Ruf S., Bock R. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res.*, 2007, vol. 16, pp. 437–448.
 9. Mushke R., Yarra R., Bulle M. Efficient in vitro direct shoot organogenesis from seedling derived split node explants of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016, vol. 14, pp. 49–53.
 10. Ahmad M. Z., Hussain I., Ahmed S., Roomi S. Direct in vitro multiple shoot regeneration in maize (*Zea mays*) inbred lines. *J. Innov Bio-Res.*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 24–29.
 11. Ovchinnikova V. N., Sotchenko V. S., Sotchenko Y. V., Varlamiva N. V., Radionova M. A., Kharchenko P. N. Susceptibility of maize mesocotyl culture to agrobacterium transformation and its in vitro regeneration. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2018, vol. 54, no. 8, pp. 808–815.
 12. Humood B. M. H., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Introduction to Culture *in vitro* of Corn Parthenogenetic Lines. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 320–324 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324
 13. Olawuyi O. J., Dalamu O., Olowe O. M. In vitro regeneration and proliferation of maize (*Zea mays* L.) genotypes through direct organogenesis. *Journal of Natural Sciences Research*, 2019, vol. 9, no. 6, pp. 65–73.
 14. Armstrong C., Green C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline. *Planta*, 1985, vol. 164, no. 2, pp. 207–214.
 15. Gutorova O. V., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izv. Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2016, vol. 18, no. 2-2, pp. 341–344 (in Russian).
 16. Apanasova N. V., Gutorova O. V., Yudakova O. I., Smolkina Yu. V. Features of the structure and development of female generative structures in maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izv. Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2017, vol. 19, no. 2-2, pp. 216–219 (in Russian).
 17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.

Cite this article as:

Humood B. M. H., Yudakova O. I. Induction of Direct Organogenesis in the Culture of Mature Embryo in Maize. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 3, pp. 289–294 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294>
