

БИОЛОГИЯ

УДК 581.6:601

Гормональная регуляция морфогенеза в культуре зрелых зародышей партеногенетической линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y)

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, заведующий кафедрой генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, yudakovaoi@info.sgu.ru

В статье представлены результаты поиска оптимального гормонального состава питательной среды для индукции прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей гомозиготной линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y). В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши, выделенные из зерновок. Для индукции прямого органогенеза было протестировано 11 вариантов сред MS без гормонов (контроль) и с добавлением фитогормонов в разной концентрации и сочетаниях. Присутствие в среде БАП в качестве единственного регулятора роста или в сочетании с другими гормонами (кинетином, ИУК и НУК) обеспечивало мультипликацию побегов. Наибольшее количество пазушных побегов на экспланте (в среднем 7,07) развивалось на среде, дополненной 2,0 мг/л БАП. Однако культивирование на этой среде более трех месяцев приводило к развитию большого количества микропобегов, которые было трудно отделить друг от друга и которые плохо приживались при переносе на свежую питательную среду. В некоторых случаях также наблюдался флоральный гомогенез. Для удлинения пазушных побегов через 2 месяца эксплант переносили на среду с пониженным содержанием БАП (0,2 мг/л). Таким образом, у линии АТТМ (bm, wx, y) в культуре зрелых зародышей эффективная мультипликация побегов посредством прямого органогенеза достигается культивированием экспланта на среде MS с 2,0 мг/л БАП в течение 2 месяцев с последующим субкультивированием на среде MS с 0,2 мг/л БАП.

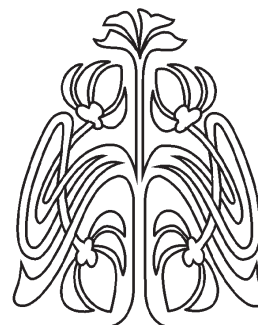
Ключевые слова: клональное микроразмножение, культивирование *in vitro*, культура зрелых зародышей, прямой органогенез, кукуруза, *Zea mays*.

Поступила в редакцию: 10.12.2019 / Принята: 26.12.2019 / Опубликовано: 31.08.2020

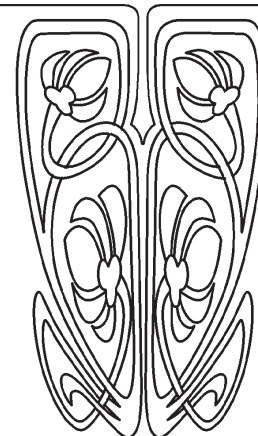
Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-315-323>

Культивирование клеток, тканей и органов растений *in vitro* является важным этапом многих современных методов селекции, таких как генетическая инженерия, получение гаплоидов *in vitro*, соматическая гибридизация и др. Использование данных методов в селекции кукурузы ограничивают сложности получения у нее растений-регенерантов. К настоящему времени выявлено небольшое количество генотипов кукурузы, которые характеризуются высокой регенерационной способностью [1–4]. Наиболее эффективным первичным эксплантом для развития морфогенных каллусов и ре-



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





генерации растений *in vitro* у кукурузы являются незрелые зиготические зародыши длиной 1–1,5 мм, выделенные из завязей в период от 12 до 18 сут после опыления [3, 5–16]. Выделение таких зародышей – сложная и трудоемкая процедура, ограниченная сезоном и сроками цветения растения, что заставляет исследователей искать альтернативные экспланты. В этом отношении ряд преимуществ имеют интактные зерновки или выделенные из них зрелые зародыши. Они доступны в течение всего года независимо от сезона вегетации, процедура вычленения зародышей из семян намного легче по сравнению с выделением незрелых зародышей из завязей.

С использованием в качестве первичных эксплантов зрелых зародышей и нодальных сегментов проростков у кукурузы были успешно регенерированы растения посредством непрямого соматического эмбриогенеза [17–20]. Однако в некоторых случаях, например при клонировании уникальных генотипов, предпочтительнее получать регенеранты посредством прямого эмбриогенеза или прямого органогенеза, так как эти пути морфогенеза исключают этап образования каллуса и тем самым снижают риск соматической изменчивости.

Направление морфогенеза в культуре *in vitro* зависит от целого ряда факторов: возраста растений-доноров, их физиологического состояния и условий выращивания, типа экспланта, состава питательной среды и др. [21]. Особенно важную роль в этом процессе играют фитогормоны.

Целью данного исследования был подбор оптимального гормонального состава питательной среды для индукции прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей гомозиготной линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y), предрасположенной к наследуемому партеногенезу. У растений этой линии регулярно в потомстве развиваются матроклинные гаплоиды. Линия представляет интерес как модельный объект для изучения партеногенеза, как исходный материал для создания на ее основе форм с диплоидным апомиксисом, а также как источник гаплоидов – ценного материала для селекции. Клональное микроразмножение может послужить основой для создания коллекции *in vitro* уникальных партеногенетических диплоидных и гаплоидных форм кукурузы, для проведения генно-инженерных работ, клеточной селекции и др.

В последние годы параллельно с нашими исследованиями [22, 23] было выполнено еще несколько работ по индукции прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы [24–27]. Для мультипликации побегов в каче-

стве индукторов морфогенеза использовали 6-бензиламинопури (БАП), один [24] или в сочетании с другими фитогормонами: индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) и гиббереллиновой кислотой (ГКЗ) [25], тидиазуроном, ИУК и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) [26], α -нафтилуксусной кислотой (НУК) [27]. Однако разработанные для определенного генотипа протоколы регенерации растений могут оказаться неэффективными для других сортов и линий. Большая зависимость культуры *in vitro* от генотипа растений делает невозможным создание одной универсальной технологии. Нередко для разных подвидов, сортов и линий требуется поиск оптимального только для них состава питательных сред и условий культивирования.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила линия кукурузы АТТМ (bm, wx, y), выведенная на кафедре генетики Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского [28, 29].

В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши. Зерновки замачивали в дистиллированной воде на 24 ч. Удаляли семенную кожуру в области зародыша и стерилизовали 70% этиловым спиртом и 0,1% ртутьсодержащим раствором в течение 5 мин. Отмывали тремя порциями стерильной дисциллированной воды. В условиях ламинар-бокса из зерновок вычленяли зародыши и пассировали их в чашки Петри на искусственную питательную среду.

Для инициации стерильной культуры использовали безгормональную среду Мурасиге – Скуга (MS) [30] с добавлением витаминов по прописи среды, 20 мг/л сахарозы, 7 г/л агары (Rapheas). Для собственно размножения использовали среды MS без гормонов (контроль) и MS с добавлением фитогормонов: БАП, кинетина (КИН), ИУК и НУК в разных концентрациях и сочетаниях. Всего было апробировано 11 вариантов сред (таблица).

Среды автоклавируют 20 мин при 120° С. Этапы инициации стерильной культуры проводили в чашках Петри, этапы микроразмножения – в стеклянных банках объемом 200 мл. В чашки Петри и банки добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в климатоканере Sanyo MLR-352 при температуре 24° С при 16-часовом фотопериоде.

Через 2 месяца культивирования определяли частоту приживаемости эксплантов как отношение количества прижившихся эксплантов



к общему количеству пассированных на среду, измеряли длину первичного (основного) побега и подсчитывали количество развившихся пазушных побегов. Длину побега измеряли от места среза до верхней точки влагалища первого листа. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 и AGROS.

Результаты и их обсуждение

Зрелые зародыши, выделенные из зерновки, пассировали на среду MS без гормонов. Через 7 сут от начала культивирования у полученных проростков удаляли корень, а побеги переносили на среды MS разного гормонального состава.

В контроле на безгормональной среде MS приживаемость эксплантов была крайне низкой (в среднем 19,2%). Через 2 месяца культивирования у прижившихся проростков развивался только основной побег длиной в среднем $29,7 \pm 1,5$ мм с нормальными листьями и придаточными корнями.

Для индукции прямого органогенеза необходимо было добиться несвойственного для кукурузы развития пазушных вегетативных побегов. Для этого требовалось не только снять апикальное доминирование, но и исключить образование у проростков корней, которые, как известно, препятствуют мультипликации побегов.

На средах, которые были дополнены фитогормонами, приживаемость эксплантов варьировала от 77,4 до 100% (см. таблицу). Присутствие

Показатели роста и развития проростков кукурузы на средах для размножения разного гормонального состава через 2 месяца культивирования
Growth and development indicators of maize seedlings on the media for the propagation with different hormonal composition after 2 months of cultivation

Фитогормоны, мг/л Phytohormones, mg/l	Приживаемость эксплантов, % / Explant survival rate, %	Длина основного побега, мм / The length of the pri- mary shoot, mm	Количество развившихся пазушных побегов, шт. / The number of developed axillary shoots, pcs	Спонтанный ризогенез (+ да, – нет) / Spontaneous rhizogenesis (+ yes, – no)
Без гормонов (контроль)/Hormone- free (control)	19,20 a	29,67g	0,00 a	+
КИН 0,5 KIN 0,5	86,87 bc	21,73 f	0,00 a	+
КИН 2,0 KIN 2,0	93,33 bc	17,87 e	0,00 a	+
БАП 0,5 + КИН 0,5 BAP 0,5 + KIN 0,5	100,00 c	8,6 cd	1,19 d	–
БАП 2,0 + КИН 2,0 BAP 2,0 + KIN 2,0	100,00 c	4,77 ab	1,90 d	–
БАП 2,0 + НУК 0,02 BAP 2,0 + NAA 0,02	95,24 bc	6,90 bc	1,37 d	–
БАП 2,0 + НУК 0,2 BAP 2,0 + NAA 0,2	95,24 bc	10,13 d	1,33 d	+
БАП 2,0 + ИУК 0,02 BAP 2,0 + IAA 0,02	77,40 b	5,00 ab	1,13 bcd	–
БАП 2,0 + ИУК 0,2 BAP 2,0 + IAA 0,2	100,00 c	6,40 b	1,17 cd	–
БАП 0,5 BAP 0,5	91,67 bc	4,83 ab	1,57 d	–
БАП 2,0 BAP 2,0	91,17 bc	3,50 a	7,07e	–
F	7,62*	6,08*	17,30*	

Примечание. В каждом варианте изучены три повторности по 15 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются друг от друга при $p \leq 0,05$ по результатам однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, Duncan's Multiple Range Test); * $p \leq 0,05$.

Note. In each variant, three replicates of 15 explants were studied. The data indicated by different letters in one column reliably differ from each other at $p \leq 0.05$ according to the results of one-way analysis of variance (one-way ANOVA, Duncan's Multiple Range Test); * $p \leq 0,05$.



в среде кинетина в концентрации 0,5 мг/л замедляло рост побегов по сравнению с контролем. Их длина через 2 месяца культивирования достигала в среднем 21,7 мм. В остальном развитие эксплантов не отличалось от контроля: в базальной части формировались придаточные корни, пазушные побеги отсутствовали (рис. 1, а). Увеличение в среде концентрации кинетина до 2,0 мг/л в еще большей степени угнетало рост экспланта, но, тем не менее, не препятствова-

ло образованию корней и не способствовало мультипликации побегов (см. таблицу, рис. 1, б).

Совершенно иные особенности морфогенеза наблюдались при добавлении в среду 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л БАП. Сочетание этих гормонов снимало апикальное доминирование у экспланта, приводило к развитию пазушных побегов и исключало ризогенез. Через 2 месяца культивирования длина побега в среднем составляла 8,6 мм. В его базальной части, как правило, в зоне

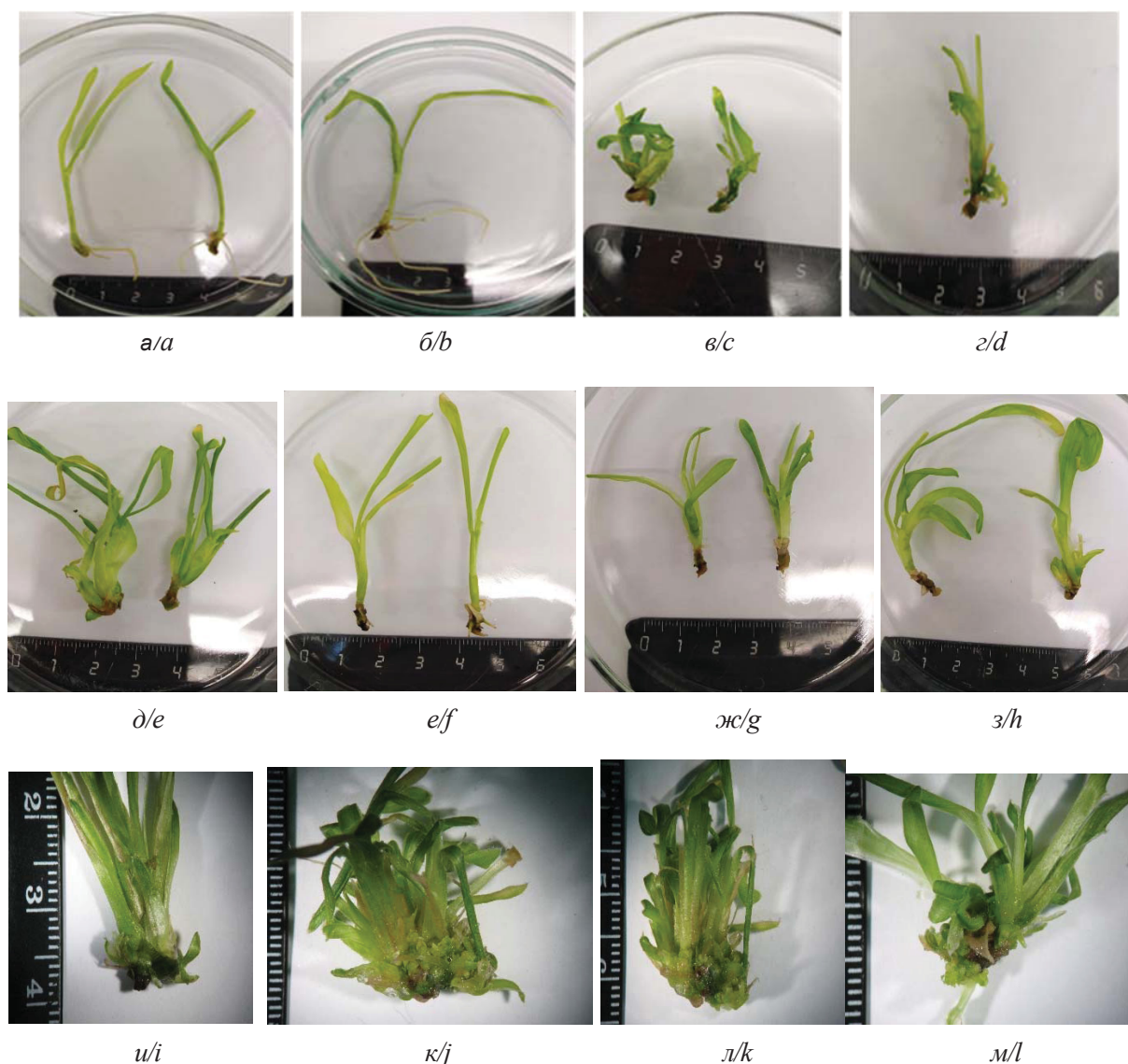


Рис. 1. Проростки кукурузы линии АТТМ (bm, wx, y) после 2 (а–к) и 4 (л, м) месяцев культивирования на среде MS с разным содержанием фитогормонов, мг/л: а – КИН 0,5; б – КИН 2,0; в – БАП 0,5 + КИН 0,5; г – БАП 2,0 + КИН 2,0; д – БАП 2,0 + НУК 0,02; е – БАП 2,0 + НУК 0,2; ж – БАП 2,0 + ИУК 0,02; з – БАП 2,0 + ИУК 0,2; и – БАП 0,5; к–м – БАП 2,0

Fig. 1. The maize line АТТМ (bm, wx, y) seedlings after 2 (a–j) and 4 (k, l) months of cultivation on MS medium supplemented phytohormones, mg/l: a – KIN 0,5; b – KIN 2,0; c – BAP 0,5 + KIN 0,5; d – BAP 2,0 + KIN 2,0; e – BAP 2,0 + NAA 0,02; f – BAP 2,0 + NAA 0,2; g – BAP 2,0 + IAA 0,02; h – BAP 2,0 + IAA 0,2; i – BAP 0,5; j–l – BAP 2,0



узла, ближайшего к месту среза, развивались 1–2 коротких пазушных побега. Однако у проростков наблюдались морфозы: искривление побегов, расширение и деформация листовых пластинок (см. рис. 1, в). Повышение концентрации обоих гормонов в среде до 2 мг/л еще значительно замедляло рост первичного побега (средняя длина 4,7 мм), но не увеличивало количества развивающихся пазушных побегов (см. таблицу). Морфозы также сохранялись (см. рис. 1, з).

Сходные результаты были получены при сочетании в среде БАП с ауксинами НУК и ИУК. Статистически значимое уменьшение длины первичного побега по сравнению с контролем свидетельствовало о снятии апикального доминирования под действием данных гормонов (см. таблицу). Активизация интеркалярных меристем, так же как в вариантах с БАП и кинетином, приводила к развитию 1–2 пазушных побегов (см. рис. 1, д–з). Вместе с тем на средах с БАП и ауксинами у проростков практически отсутствовали морфозы, которые были характерны для эксплантов, развившихся на средах с БАП и кинетином. Исключение составил вариант культивирования на среде с 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК. При таком сочетании гормонов проростки желтели и в базальной части у некоторых из них развивались небольшие придаточные корни (см. рис. 1, е).

Образования максимального количества пазушных побегов удалось добиться лишь на среде, в которой в качестве индуктора морфогенеза присутствовал только БАП в концентрации 2,0 мг/л. Если на всех апробированных средах с гормонами включая среду с 0,5 мг/л БАП на первичном побеге через 2 месяца культивирования развивались только 1–2 коротких пазушных побега (см. рис. 1, и), то на среде с 2,0 мг/л БАП их количество увеличивалось до 7–10 (см. таблицу, рис. 1, к). Этот вариант среды как наиболее эффективный был выбран нами для разработки на его основе технологии клонального микроразмножения линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y).

Несмотря на то что на среде с 2,0 мг/л БАП развивалось максимальное количество пазушных побегов (см. таблицу), для длительного культивирования она оказалась непригодной. Если время культивирования на ней превышало три месяца, эксплант превращался в пучок многочисленных укороченных микропобегов (см. рис. 1, л, м), которые было сложно отделить друг от друга и которые затем плохо приживались при переносе на новую среду того же состава. Кроме того, у некоторых эксплантов вместо вегетативных почек начинали закладываться генеративные (рис. 2, а,

б), из которых затем развивались недоразвитые женские соцветия (початки) (см. рис. 2, в–д). Для исключения таких нежелательных явлений через 2 месяца культивирования экспланты пассировали на среду с пониженным содержанием БАП (0,2 мг/л). Это приводило к удлинению пазушных побегов и не индуцировало флоральный гомогенез.

Заключение

В отношении гормональной регуляции морфогенеза еще в 1957 г. F. Skoog и С. О. Miller [31] была сформулирована гипотеза гормонального баланса, известная сегодня как «правило Скуга – Миллера». Согласно данному правилу образование стеблей, корней или недифференцированный рост каллуса можно получить, изменяя относительное содержание в среде фитогормонов. Сбалансированное соотношение ауксинов и цитокининов вызывает образование каллуса, превышение уровня цитокининов над ауксинами, способствует развитию вегетативных почек, а высокое содержание в среде ауксинов – развитию корней.

Цитокинины способствуют снятию апикального доминирования и развитию почек, именно поэтому для индукции прямого органогенеза в качестве регуляторов роста используют гормоны этого типа. Проведенное нами исследование выявило разный эффект от присутствия в питательной среде кинетина и БАП. Кинетин замедлял апикальный рост побега, но не индуцировал развитие интеркалярных меристем, тогда как присутствие в среде БАП как единственного регулятора роста или в сочетании с другими гормонами приводило к развитию пазушных побегов. Наибольшее количество таких побегов было получено на среде, дополненной 2,0 мг/л БАП. Дополнительные к БАП гормоны снижали его эффективность, причем не только ауксины ИУК и НУК, но и кинетин. Если на среде с 2,0 мг/л БАП у эксплантов развивалось в среднем 7,07 пазушного побега, то в сочетании с другими гормонами при такой же концентрации БАП развивалось только 1,1–1,9 пазушного побега.

Следует отметить, что у других линий кукурузы при аналогичных концентрациях гормонов наблюдали сходные с полученными нами показатели мультипликации побегов. Так, в экспериментах, проведенных R. Mushke et al. [24], добавление в среду MS только БАП в концентрации 8,80 μ M вызывало в среднем развитие 12,0 \pm 1,15 пазушного побега. O. J. Olawuyi et al. [27] сочетали в среде MS БАП и НУК в концентрациях 3,0 и 0,3 мг/л соответственно. Максимальное количество пазушных

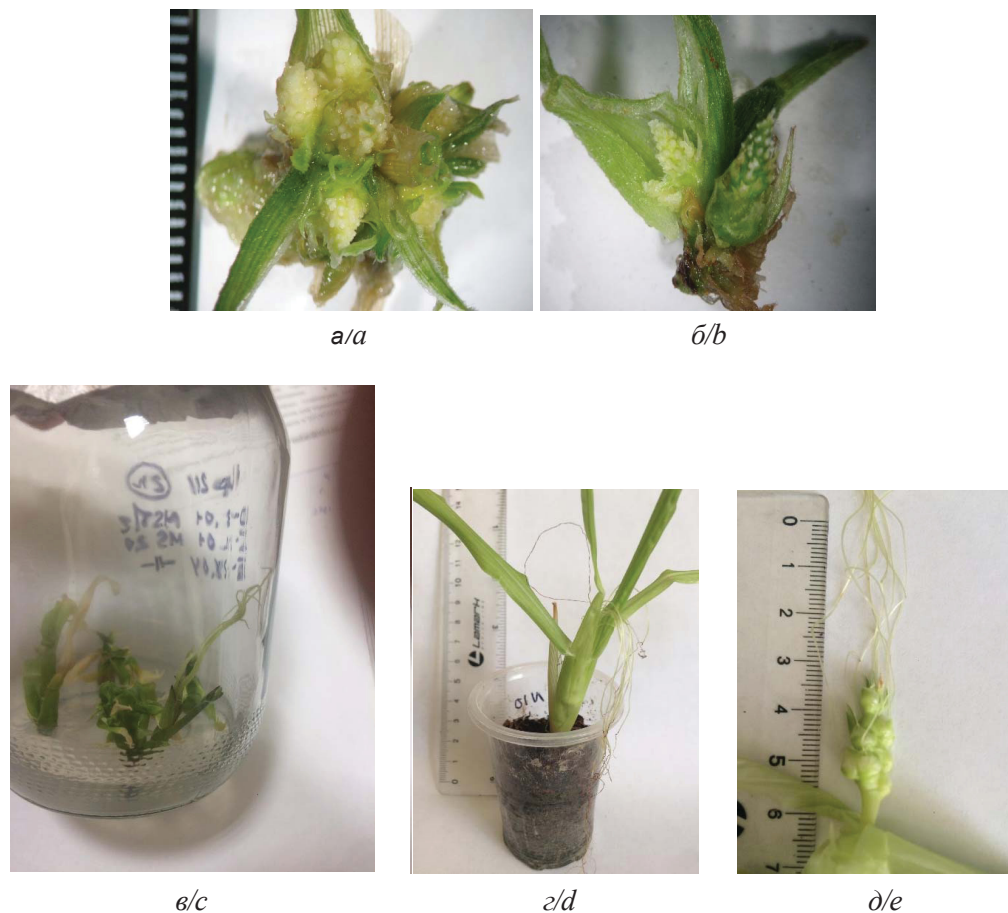


Рис. 2. Флоральный гомогенез в культуре зрелых зародышей кукурузы: а, б – развившиеся на экспланте микропочатки (листья удалены); в – эксплант с развивающимся початком после 4 месяцев культивирования на среде MS, дополненной 2,0 мг/л БАП (видны рыльца (*st*), выходящие из кроющих листьев микропочатка); г – регенерант с микропочатком через 6 месяцев от начала культивирования; д – початок, с которого удалили кроющие листья

Fig. 2. Floral homogenesis in a culture of mature maize embryos: a, b – microear developed on the explant (leaves removed); c – explant with ear after 4 months of cultivation on MS medium supplemented with 2.0 mg/l BAP (stigmas (*st*) emerging from the covering leaves of the microear are visible); d – regenerant with a ear after 6 months of cultivation; e – ear, from which removed the covering leaves

побегов у культивируемых ими линий составило лишь 1,7. Сходство результатов, полученных на разных генотипах кукурузы, скорее всего, обусловлено спецификой первичного экспланта. Регенерация растений из апексов побегов менее зависима от генотипа по сравнению с другими типами эксплантов [25].

Анализ литературных и полученных нами данных свидетельствует о том, что зрелые зародыши являются перспективным эксплантом, а БАП – наиболее эффективным регулятором роста для индукции прямого органогенеза в культуре *in vitro* кукурузы.

У линии АТТМ (bm, wx, y) в культуре зрелых зародышей эффективная мультипликация побегов посредством прямого органогенеза достигает-

ся культивированием экспланта на среде MS с 2,0 мг/л БАП в течение 2 месяцев с последующим субкультивированием на среде MS с 0,2 мг/л БАП.

Список литературы

1. 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00396083>
2. Armstrong C. L. Regeneration of plants from somatic cells cultures: applications for *in vitro* genetic manipulation // *The Maize* / eds. M. Freeling, V. Walbot. N.Y. : Springer Verlag, 1994. P. 663–671.
3. Aguado-Santacruz G. A., Garcia-Moya E., Aguilar-Acuna J. L., Moreno-Gómez B., Solis-Moya E., Preciado-Ortiz E. R., Jimenez-Bremont J. F., Rascon-Cruz Q.



- In vitro* plant regeneration from quality protein maize // *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 2007. Vol. 43. P. 215–224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9042-9>
4. Altpeter F., Springer N. M., Bartley L. E., Blechl A. E., Brutnell T. P., Citovsky V., Conrad L. J., Gelvin S. B., Jackson D. P., Kausch A. P., Lemaux P. G., Medford J. I., Orozco-Cardenas M. L., Tricoli D. M., Van Eck J., Voytas D. F., Walbot V., Wang K., Zhang Z. J., Stewart C. N. Advancing crop transformation in the era of genome editing // *Plant Cell*. 2016. Vol. 28. P. 1510–1520.
 5. Green C. E., Phillips H. L. Plant regeneration from tissues cultures of maize // *Crop Science*. 1975. Vol. 15, № 5. P. 417–421.
 6. Duncan D. R., Williams M. E., Zehr B. E., Widholm J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes // *Planta*. 1985. Vol. 165. P. 322–332. <https://doi.org/10.1007/BF00392228>
 7. Furini A., Jewell D. C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes // *Maydica*. 1994. Vol. 39. P. 155–164. DOI: 10.2225/vol15-issue1-fulltext-7
 8. Bohorova N. E., Luna B., Brito R. M., Huerta L. D., Hoisington D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude and highland maize inbred // *Maydica*. 1995. Vol. 40. P. 275–281.
 9. Carvalho C. H. S., Bohorova N., Bordallo P. N., Abreu L. L., Valicente F. H., Bressan W., Paiva E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes // *Plant Cell Reports*. 1997. Vol. 17, № 1. P. 73–76. <https://doi.org/10.1007/s002990050355>
 10. 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.
 11. Anh N. T. M. *In vitro* culture of maize (*Zea mays* L.) inbred line SM5-4 // Abstract of thesis presented to the Senate of University Putra Malaysia in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science. Putra, 2005. P. 1–8.
 12. Vasil I. K. Tissue cultures of maize // *Maydica*. 2005. Vol. 50. P. 361–365.
 13. 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 Organ Cult*. 2010. Vol. 100, № 1. P. 31–37.
 14. Petrillo C. P., Carneiro N. P., Purcino A. A. C., Carvalho C. H. S., Alves J. D., Carneiro A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines // *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF*. 2008. Vol. 43, № 3. P. 371–378. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000300012>
 15. Guruprasad M., Sridevi T., Vijayakumar G., Kumar M. S. Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.) // *Indian J. Agr. Res*. 2016. Vol. 50, № 2. P. 135–138. DOI: 10.18805/ijare.v0i0F.8435
 16. De Vasconcelos M. J. V., Antunes M. S., De Oliveira M. F., Lopes M. A., Figueiredo J. E. F. Callus induction and plant regeneration from immature embryos culture of tropical maize // *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2018. Vol. 17, № 3. P. 359–368.
 17. Sawahel W. A., Ali A. M. Callus induction and maintenance of *Zea mays* kernels // *Biotechnology Letters*. 1994. Vol. 16, № 4. P. 397–400.
 18. Monalisha R., Chakraborty M., Banerjee M., Prasad K., Shree B., Tudu V. K. Response of different genotypes on *in vitro* regeneration of maize (*Zea mays* L.) // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018. Vol. 1. P. 2422–2424.
 19. Sidorov V., Gilbertson L., Aday P., Duncan D. Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus // *Plant Cell Reproduction*. 2006. Vol. 25. P. 320–328. DOI: 10.1007/s00299-005-0058-5
 20. Gudlavalleti P. K., Pagidaju S., Muppala S., Kodandarami R. M., Puligandla S. K. Coleoptilar node – a season-independent explant source for *in vitro* culture in maize (*Zea mays* L.) // *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2018. Vol. 6, № 3. P. 20–28.
 21. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // *Биополимеры и клетка*. 1997. Т. 13, № 5. С. 362–371.
 22. Хумуд Б. М. Х., Анапасова Н. В., Юдакова О. И. Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 320–324. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324
 23. Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы // *Изв. Саратов. ун-та. 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>
 24. 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. P. 49–53.
 25. 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.
 26. Ovchinnikova V. N., Sotchenko V. S., Sotchenko Y. V., Varlamova N. V., Rodionova 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.
 27. 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, № 6. P. 65–73. DOI: 10.7176/JNSR
 28. 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.



29. Апанасова 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
30. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.
31. Skoog, F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro* // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1957. Vol. 11. P. 118–131.

Образец для цитирования:

Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Гормональная регуляция морфогенеза в культуре зрелых зародышей партеногенетической линии кукурузы АТТМ (bm, wx, y) // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 3. С. 315–323. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-315-323>

Hormonal Regulation of Morphogenesis in the Culture of Mature Embryo in the Maize Parthenogenetic Line АТТМ (bm, wx, y)

В. М. Н. Humood, О. И. Yudakova

Buthaina H. M. 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, yudakovaoi@info.sgu.ru

The article presents the results of the search for the optimal hormonal composition of the nutrient medium for the induction of direct organogenesis in the culture of mature embryos of the maize homozygous line АТТМ (bm, wx, y). The mature embryos isolated from kernels were used as the primary explant. The 11 media variants were tested for induction of direct organogenesis: MS without hormones (control) and with phytohormones in different concentrations and combinations. The presence of BAP in the medium as a single growth regulator or in combination with other hormones ensured shoot multiplication. The largest number of axillary shoots on the explant (on average 7,07) developed on a medium with 2,0 mg/l BAP. However, long-term cultivation on this medium led to the development of many microshoots that were difficult to separate from each other and which did not survive after being transferred on a fresh nutrient medium. In some cases, floral hemogenesis was also observed. In order to exclude these phenomena the explants were transferred onto a medium with a low concentration of BAP (0,2 mg/l) after two months of cultivation. Thus, in the АТТМ (bm, wx, y) line effective shoot multiplication by direct organogenesis is achieved by explant cultivation on MS medium with 2,0 mg/l BAP for 2 months with followed subcultivation on MS medium with 0,2 mg/l BAP.

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

Received: 10.12.2019 / Accepted: 26.12.20 / Published: 31.08.2020

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0)

Reference

1. 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00396083>
2. Armstrong C. L. Regeneration of plants from somatic cells cultures: applications for *in vitro* genetic manipulation. In: M. Freeling, V. Walbot, eds. *The Maize*. New York, SpringerVerlag, 1994, pp. 663–671.
3. Aguado-Santacruz G. A., Garcia-Moya E., Aguilar-Acuna J. L., Moreno-Gómez B., Solis-Moya E., Preciado-Ortiz E. R., Jimenez-Bremont J. F., Rascon-Cruz Q. *In vitro* plant regeneration from quality protein maize. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.*, 2007, vol. 43, pp. 215–224. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9042-9>
4. Altpeter F., Springer N. M., Bartley L. E., Blechl A. E., Brutnell T. P., Citovsky V., Conrad L. J., Gelvin S. B., Jackson D. P., Kausch A. P., Lemaux P. G., Medford J. I., Orozco-Cardenas M. L., Tricoli D. M., Van Eck J., Voytas D. F., Walbot V., Wang K., Zhang Z. J., Stewart C. N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*, 2016, vol. 28, pp. 1510–1520. DOI: 10.1105/thc.16.00196
5. Green C. E., Phillips H. L. Plant regeneration from tissues cultures of maize. *Crop Science*, 1975, vol. 15, no. 5, pp. 417–421.
6. Duncan D. R., Williams M. E., Zehr B. E., Widholm J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*, 1985, vol. 165, pp. 322–332. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00392228>
7. Furini A., Jewell D. C. Somatic embryogenesis a nd plant regeneration from immature and mature embryos of tropical and subtropical *Zea mays* L. genotypes. *Maydica*, 1994, vol. 39, pp. 155–164. DOI: 10.2225/vol15-issue1-fulltext-7
8. Bohorova N. E., Luna B., Brito R. M., Huerta L. D., Hoisington D. A. Regeneration potential of tropical, subtropical, mid altitude and highland maize inbred. *Maydica*, 1995, vol. 40, pp. 275–281.
9. Carvalho C. H. S., Bohorova N., Bordallo P. N., Abreu L. L., Valicente F. H., Bressan W., Paiva E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports*, 1997, vol. 17, no. 1, pp. 73–76. <https://doi.org/10.1007/s002990050355>
10. 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.



11. Anh N. T. M. *In vitro* culture of maize (*Zea mays* L.) inbred line SMS-4. In: *Abstract of thesis presented to the Senate of University Putra Malaysia in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science*. Putra, 2005, pp. 1–8.
12. Vasil I. K. Tissue cultures of maize. *Maydica*, 2005, vol. 50, pp. 361–365.
13. 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 Organ Cult.*, 2010, vol. 100, no. 1, pp. 31–37.
14. Petrillo C. P., Carneiro N. P., Purcino A. A. C., Carvalho C. H. S., Alves J. D., Carneiro A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF*, 2008, vol. 43, no. 3, pp. 371–378. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000300012>
15. Guruprasad M., Sridevi T., Vijayakumar G., Kumar M. S. Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Indian J. Agr. Res.*, 2016, vol. 50, no. 2, pp. 135–138. DOI: 10.18805 / ijare.v0iOF.8435
16. De Vasconcelos M. J. V., Antunes M. S., Oliveira De M. F., Lopes M. A., Figueiredo J. E. F. Callus induction and plant regeneration from immature embryos culture of tropical maize. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2018, vol. 17, no. 3, pp. 359–368.
17. Sawahel W. A., Ali A. M. Callus induction and maintenance of *Zea mays* kernels. *Biotechnology Letters*, 1994, vol. 16, no. 4, pp. 397–400.
18. Monalisha R., Chakraborty M., Banerjee M., Prasad K., Shree B., Tudu V. K. Response of different genotypes on *in vitro* regeneration of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2018, vol. 1, pp. 2422–2424.
19. Sidorov V., Gilbertson L., Aday P., Duncan D. Agrobacterium-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Reproduction*, 2006, vol. 25, pp. 320–328. DOI: 10.1007 / s00299-005-0058-5
20. Gudlavalleti P. K., Pagidoju S., Muppala S., Kodandarami R. M., Puligandla S. K. Coleoptilar node – a season-independent explant source for *in vitro* culture in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2018, vol. 6, no. 3, pp. 20–28.
21. Kunakh V. A. Genomic variability of somatic plant cells. 3. Callus formation *in vitro*. *Biopolymers and Cell*, 1997, iss. 13, no. 5, pp. 362–371 (in Russian).
22. Humood B. M. H., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Introduction of parthenogenetic lines of maize into *in vitro* culture. *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
23. Humood B. M. H., Yudakova O. I. Induction of direct organogenesis in the culture of mature maize embryos. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, iss. 19, no. 3, pp. 289–294 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294>
24. 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. DOI: 10.1016/ j.jgeb.2016.03.001
25. 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.
26. Ovchinnikova V. N., Sotchenko V. S., Sotchenko Y. V., Varlamova N. V., Rodionova 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.
27. 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. DOI: 10.7176 / JNSR
28. Gutorova O. V., Apanasova N. V., Yudakova O. I. Creation of genetically labeled maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izvestia of Samara Scientific Center of Russian Academy of Sciences*, 2016, iss. 18, no. 2–2, p. 341–344 (in Russian).
29. 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. *Izvestia of Samara Scientific Center of Russian Academy of Sciences*, 2017, iss. 19, no. 2–2, pp. 216–219 (in Russian).
30. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.
31. Skoog, F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1957, vol. 11, pp. 118–131.

Cite this article as:

Humood B. M. H., Yudakova O. I. Hormonal Regulation of Morphogenesis in the Culture of Mature Embryo in the Maize Parthenogenetic Line ATTM (bm, wx, y). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2020, vol. 20, iss. 3, pp. 315–323 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2020-20-3-315-323>