

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF PLANTS

УДК 575.1:581.143

doi: 10.21685/2307-9150-2023-2-5

Гистологические особенности и динамика развития пазушных побегов при прямом органогенезе в культуре зрелых зародышей кукурузы

Б. М. Х. Хумуд¹, О. И. Юдакова²

^{1,2}Саратовский национальный исследовательский государственный
университет имени Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия

¹bobogold18@gmail.com, ²yudakovaai@info.sgu.ru

Аннотация. *Актуальность и цели.* Изучение особенностей морфогенеза важно для разработки эффективных технологий регенерации растений в условиях *in vitro*. Наименее изученным путем морфогенеза в эмбриокультуре кукурузы является прямой органогенез. Целью проведенного исследования было выявление особенностей индукции и реализации прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы. *Материал и методы.* Объектом исследования послужила гомозиготная линия кукурузы АТТМ (bm, y, wx). В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши. Инициацию стерильной культуры осуществляли на среде MS без гормонов, микроразмножение – на среде MS, дополненной 0,5 и 2,0 мг/л 6-бензиламинопурином (БАП). Гистологические особенности морфогенеза изучали на препаратах продольных срезов эксплантов, которые фиксировали темпорально. *Результаты.* Показано, что БАП стимулирует деление клеток интеркалярных меристем проростков и изменяет направление их дифференцировки. В coleoptиллярном узле проростка и в основании выше расположенных фитомеров формируется от 1 до 4 вегетативных почек, которые затем прорастают в пазушные побеги. Концентрация БАП в среде оказывает влияние на динамику развития пазушных побегов. На среде с 2,0 мг/л БАП пазушные побеги первого порядка начинают развиваться на экспланте в среднем через 10 сут, пазушные побеги второго порядка – через 40 сут, третьего порядка – через 60 сут от начала культивирования. На среде с 0,5 мг/л БАП этим стадиям соответствуют следующие сроки культивирования: 25, 55, 85 сут. Выявленные закономерности следует учитывать при разработке эффективных технологий клонального микроразмножения кукурузы посредством прямого органогенеза.

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

Для цитирования: Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Гистологические особенности и динамика развития пазушных побегов при прямом органогенезе в культуре зрелых зародышей кукурузы // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2023. № 2. С. 64–76. doi: 10.21685/2307-9150-2023-2-5

© Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И., 2023. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License / This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License.

Histological features and development dynamics of axillary shoots during direct organogenesis in the maize mature embryo culture

Humood Buthaina Mohammed Humood¹, O.I. Yudakova²

^{1,2}Saratov State University, Saratov, Russia

¹bobogold18@gmail.com, ²yudakovaoi@info.sgu.ru

Abstract. *Background.* The study of the morphogenesis is important for the development of effective technologies for plant regeneration *in vitro*. The least studied pathway of morphogenesis in the maize embryoculture is direct organogenesis. The purpose of the study is to identify the features of the direct organogenesis in the maize mature embryo culture. *Material and methods.* The material of the study was a homozygous maize line ATTM (bm, y, wx). Mature embryos were used as the primary explant. Sterile culture was initiated on MS medium without hormones, micropropagation was performed on MS medium supplemented with 0,5 and 2,0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP). Histological features of morphogenesis were studied on preparations of longitudinal sections of explants, which were fixed temporally. *Results.* The induction of cell division in the intercalary meristems of seedlings and a change in the direction of their differentiation under the influence of BAP was established. Vegetative buds (1-4) are formed in the coleoptilary node and at the base of the higher located phytomers of the seedling. This buds grow into axillary shoots. The dynamics of the axillary shoots development depends on the hormone concentration. Axillary shoots of the first order began to develop on the explant after an average of 10 days, axillary shoots of the second order - after 40 days, and axillary shoots of the third order - after 60 days from the start of cultivation on the medium with 2,0 mg/l BAP. These stages correspond to the following periods on a medium with 0,5 mg/l BAP: 25, 55, 85 days. The revealed patterns should be taken into account when developing effective technologies for clonal micropropagation through direct organogenesis in maize.

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

For citation: Humood Buthaina Mohammed Humood, Yudakova O.I. Histological features and development dynamics of axillary shoots during direct organogenesis in the maize mature embryo culture. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* = *University proceedings. Volga region. Natural sciences*. 2023;(2):64–76. (In Russ.). doi: 10.21685/2307-9150-2023-2-5

Введение

Кукуруза – одна из наиболее важных сельскохозяйственных культур и мировой лидер среди злаков по объему посевных площадей. Кукуруза – удобный модельный объект для решения прикладных и теоретических научных задач. Широкая сфера применения кукурузы делает актуальным создание новых форм, отвечающих требованиям конкретного направления их использования и адаптированных к специфическим условиям региона выращивания.

Биотехнологические и генно-инженерные методы, способствующие ускорению селекционного процесса, предполагают работы с растениями в условиях *in vitro*. К сожалению, у кукурузы многие сорта и линии характеризуются низким регенерационным потенциалом [1–5]. Это осложняет, а иногда делает невозможным получение растений-регенерантов у ценных форм кукурузы и, как следствие, не позволяет применять к ним современные ускоренные методы селекции.

Генотип растений оказывает влияние на все этапы формирования клеточных культур с максимальным вкладом на этапе развития морфогенного каллуса [6–8]. Учитывая это, правомерно предположить, что снизить зависимость регенерации от генотипа можно, исключив стадию каллусообразования путем индукции прямого соматического эмбриогенеза или прямого органогенеза. Например, имеются данные, указывающие на независимость от генотипа процесса мультипликации побегов при прямом органогенезе в культуре незрелых зародышей пшеницы [9] и зрелых зародышей кукурузы [10]. Детальное изучение особенностей инициации и реализации прямых путей морфогенеза может способствовать разработке более универсальных, менее зависимых от генотипа донорных растений технологий *in vitro*. У кукурузы наиболее разработанными на сегодня являются методы регенерации растений посредством непрямого соматического эмбриогенеза в культуре незрелых [1–3, 5, 8, 9, 11–15] и зрелых [4, 16–18] зародышей, тогда как в области изучения особенностей прямого органогенеза в эмбриокультуре сделаны лишь первые шаги [10, 19–25].

Целью проведенного исследования стало выявление гистологических особенностей индукции прямого органогенеза и динамики развития пазушных побегов в культуре зрелых зародышей кукурузы.

Материал и методы

Объектом исследования послужили растения гомозиготной линии кукурузы (*Zea mays* L.) АТТМ (bm, y, wx), которая характеризуется регулярным развитием в потомстве (с частотой до 10 %) матроклиных гаплоидов [26, 27]. Эта линия представляет интерес как донор гаплоидных растений, а также как исходный материал для создания новых форм с наследуемым типом гаплоидии или с диплоидным апомиксисом. Линия маркирована рецессивными генами, которые контролируют хорошо проявляемые фенотипические признаки: *bm* (*brown midrib*) – коричневая средняя жилка листа; *y* (*yellow endosperm*) – желтый эндосперм; *wx* (*waxy endosperms*) – восковидный эндосперм. Растения выращивались в условиях открытого грунта на опытных полях в окрестностях г. Саратова. Перед появлением рылец початки кукурузы помещали под пергаментные изоляторы и через 5–7 сут опыляли пыльцой того же растения.

В качестве первичного экспланта использовали зрелые зародыши. Зерновки промывали проточной водой в течение 10 мин, помещали на 40 мин в раствор «Доместос» (действующее вещество – гипохлорит натрия (NaOCl), в концентрации 5 %), вновь промывали 10 мин проточной водой и оставляли в дистиллированной воде на 24 ч при температуре 28 °С. После этого у зерновок в области зародыша удаляли семенную кожуру, стерилизовали 70 % этиловым спиртом (1 мин) и 0,5 % раствором мертиолата (действующее вещество – этилмеркуритиосалицилат натрия, ≥ 97 %) (5 мин). Отмывали тремя порциями стерильной дистиллированной воды. В условиях ламинар-бокса из зерновок вычленили зародыши и помещали их на искусственную питательную среду.

Для инициации стерильной культуры использовали безгормональную среду Мурасиге – Скоуга (MS) [28] с добавлением витаминов по прописи среды, 20 мг/л сахарозы, 7 г/л агара (Panreac) [22]. Для собственно размножения использовали среды MS без гормонов (контроль) и MS с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л. Данные концен-

трации индукторов морфогенеза были выбраны по результатам ранее проведенного эксперимента как наиболее эффективные для индукции прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы [23, 25].

Среды автоклавировали 20 мин при 120 °С. Этапы инициации стерильной культуры осуществляли в чашках Петри, этапы микроразмножения – в стеклянных сосудах объемом 200 мл. Культуры выращивали в климатической камере Sanyo MLR-352 при температуре 24 °С при 16-часовом фотопериоде.

Изучение гистологических особенностей морфогенеза проводили на препаратах продольных срезов развивающихся побегов. Экспланты фиксировали ацеталкоголем (3:1) темпорально через 3, 5, 7, 10 и далее через каждые 5 сут, включая 90 сут от начала культивирования на средах для собственно размножения: MS без гормонов и с добавлением 0,5 и 2,0 мг/л БАП. Срезы окрашивали гематоксилином по Гейденгайну [29]. Препараты анализировали с помощью стереомикроскопа «Discovery» (C. Zeiss, Германия) при увеличении $\times 4$, $\times 8$ и микроскопа «AxioStar Plus» (C. Zeiss, Германия) при увеличении $\times 20$.

Результаты и обсуждение

На безгормональной среде MS зрелые зародыши, выделенные из обработанных стерилизующими растворами зерновок, прорастали (рис. 1,а). У них развивался первичный корень, coleoptиль и первый лист. Спустя 7 сут у проростков отсекали корень ниже coleoptильного узла. Побеги помещали на среды для собственно размножения: MS без гормонов (контроль) и с добавлением 0,5 и 2,0 мг/л БАП (рис. 1,б).

На безгормональной среде побеги лишь удлинялись, тогда как на средах с БАП происходила их мультипликация (рис. 1,в, 2,б–е). Через 2 мес. культивирования на среде с 0,5 мг/л БАП на эксплантах можно было обнаружить 1–2 пазушных побега. Постепенно их количество увеличивалось, и через 5–6 мес. эксплант состоял из многочисленных микропобегов (рис. 2,е). На среде с 2,0 мг/л БАП процесс мультипликации проходил быстрее: через 2 мес. на эксплантах присутствовало в среднем 7 пазушных побегов (рис. 2,б–г), а через 3–4 мес. – от 10 и более (рис. 2,д).

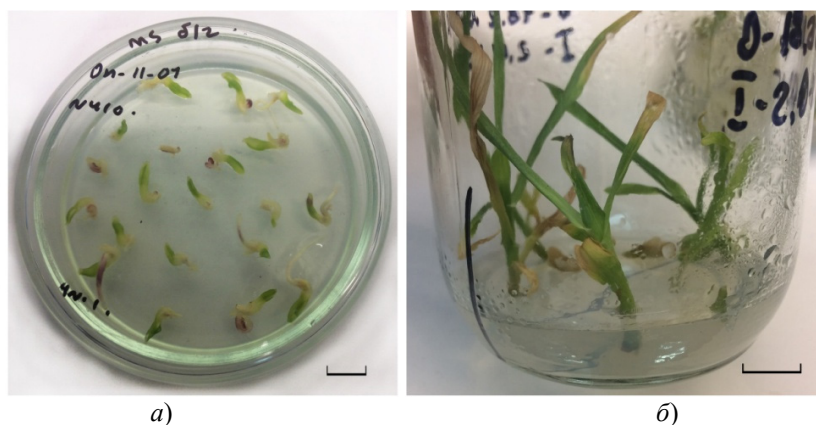
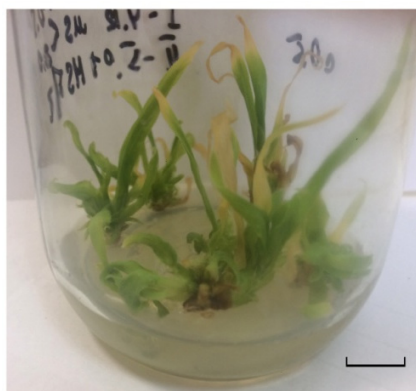


Рис. 1. Экспланты кукурузы линии АТТМ (bm, wx, y): а – на среде MS без гормонов через 3 сут от начала культивирования; б, в – на среде MS с 2,0 мг/л БАП через 15 сут и 3 мес. от начала культивирования соответственно. Масштаб: 1 см (начало)



в)

Рис. 1. Окончание

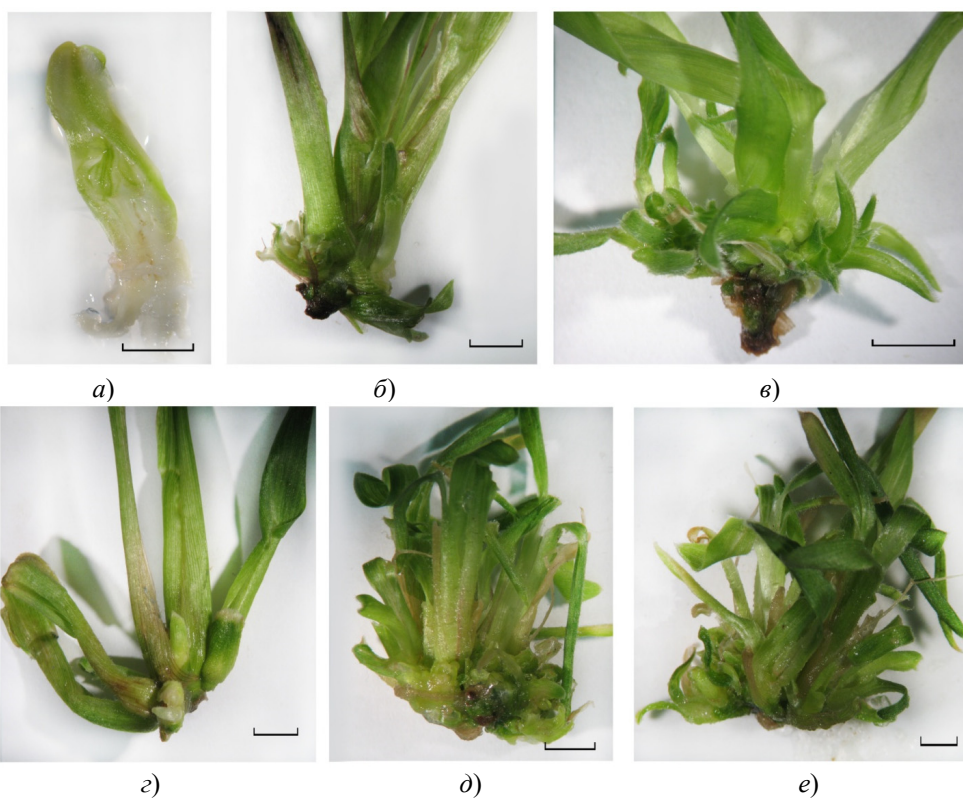


Рис. 2. Экспланты кукурузы линии АТТМ (bm, wx, y): а – через 1 сут культивирования на среде MS с 2,0 мг/л БАП; б-г – через 60 сут культивирования на среде MS с 2,0 мг/л БАП; д – через 4 мес. культивирования на среде MS с 2,0 мг/л БАП; е – через 6 мес. культивирования на среде MS с 0,5 мг/л БАП. Масштаб: 0,5 см

У кукурузы влагалища листьев плотно охватывают стебель и закрывают участки, на которых формируются почки. В связи с этим при визуальном анализе интактных эксплантов невозможно точно определить не только время и место заложения почек, но и количество развивающихся пазушных по-

бегов. Для изучения особенностей прямого органогенеза был проведен гистологический анализ эксплантов. Исследование показало, что семидневные проростки, которые помещали на среду для размножения, состояли из 4–5 укороченных фитомеров. В области отсечения корня клетки побега имели признаки дегенерации (рис. 3,а). На безгормональной среде наблюдался рост экспланта. Деление клеток интеркалярных меристем приводило к постепенному увеличению размеров междоузлий (рис. 3,б).

На всех апробированных средах на эксплантах каллус не формировался (рис. 3). БАП – гормон цитокининовой группы, а каллусогенез у кукурузы инициируется ауксинами: 2,4-Д или пиклорамом [4, 18, 30]. На безгормональных средах не только у злаков, но и у однодольных растений, в целом, не зарегистрировано ни одного случая каллусообразования. Это объясняют отсутствием у них генетически обусловленной способности к формированию раневого каллуса [31].

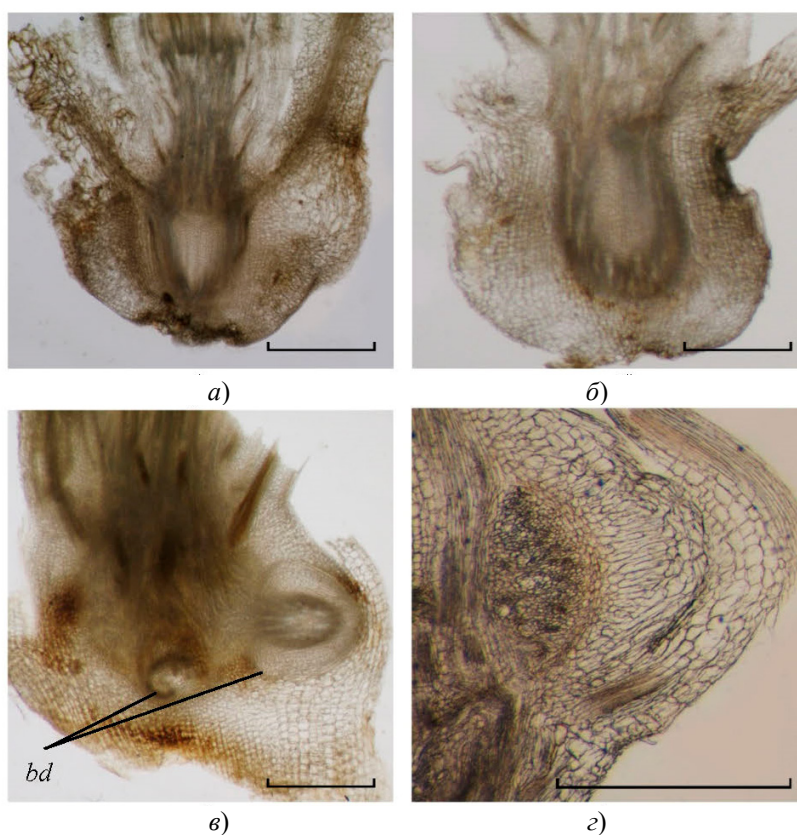


Рис. 3. Продольные срезы эксплантов, развившихся на среде MS без добавления гормонов (а, б) и с добавлением 2,0 мг/л БАП (в–ж): а, б – базальная часть проростка (3 и 10 сут культивирования); в – формирующиеся почки (bd) в зоне coleoptильного узла (10 сут); г – развивающаяся пазушная почка (10 сут); д, е – эксплант с развивающимися пазушными побегами первого порядка (sh) (20 и 40 сут); ж – почки на пазушных побегах первого порядка (45 сут).

Перед приготовлением препаратов листья на побегах были удалены.

Масштаб: а–г – 1 мм; д–ж – 3 мм (начало)

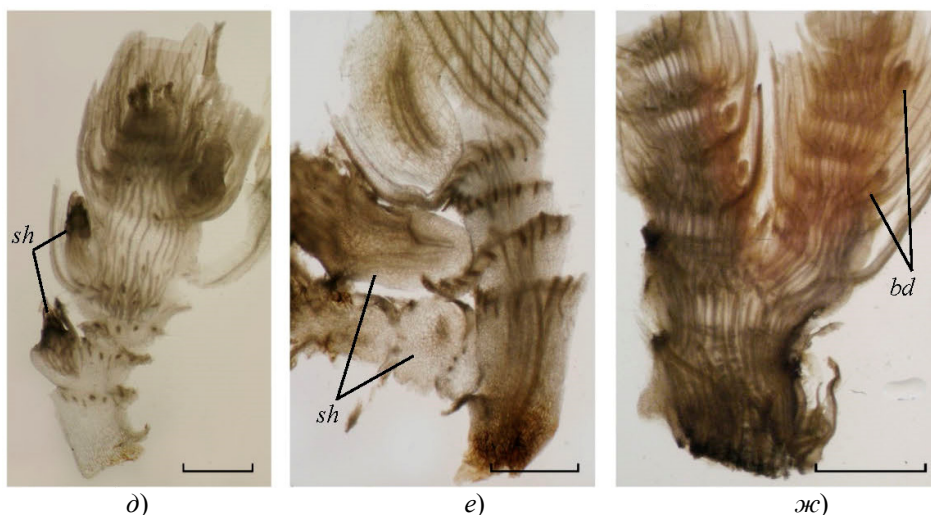


Рис. 3. Окончание

Как было ранее установлено W. A. Sawahel и A. M. Ali [30], на проростках кукурузы каллус образуется под действием гормона 2,4-Д за счет деления меристематических клеток coleoptильного узла. В наших экспериментах эти клетки также, как правило, первыми отзывались на воздействие экзогенного гормона, но под воздействием БАП их пролиферация и последующая дифференциация приводили не к каллусогенезу, а к геммогенезу (рис. 3, в, г). На среде с 2,0 мг/л БАП геммогенез начинался через 7–10 сут культивирования, а на среде с 0,5 мг/л БАП – в среднем через 20–25 сут.

БАП стимулировал деление меристематических клеток не только coleoptильного узла проростка, но и узлов вышерасположенных фитомеров (рис. 3, д, е). Степень развития пазушных побегов не зависела от номера фитомера, на котором они формировались. Наблюдались случаи, когда более развитыми были пазушные побеги не нижних, а, наоборот, верхних фитомеров (рис. 3, д).

У покрытосеменных в условиях *in vivo* расположение пазушных почек повторяет расположение листьев, но у изученных нами эксплантов эта закономерность не всегда выполнялась. Несмотря на то, что кукуруза – растение с очередным расположением листьев на стебле, в зоне стеблевых узлов могло закладываться до четырех почек, которые располагались радиально, на одинаковом расстоянии друг от друга (рис. 3, в). Таким образом, под воздействием БАП у эксплантов происходит нетипичное для кукурузы ветвление побега. Однако нельзя говорить о том, что этот синтетический гормон кардинально меняет направление дифференциации клеток интеркалярных меристем. Скорее он обеспечивает реализацию одного из генетически детерминированных путей морфогенеза. В норме у кукурузы в условиях *in vivo* из coleoptильного узла побега образуется второй ярус придаточных корней, а из 3–5 сближенных узлов стебля, расположенных у поверхности почвы, – третий ярус. Вместе с тем крайне редко от данных узлов могут отрастать и пазушные побеги – пасынки [32]. Многовековой отбор на одностебельность привел к тому, что у современных сортов и гибридов кукурузы при нормальных условиях развитие пасынков подавляется.

Проведенный гистологический анализ позволил установить точные сроки начала стадий развития эксплантов, которые необходимо учитывать при разработке эффективных протоколов регенерации *in vitro*. На среде с 2,0 мг/л БАП они следующие: 10 сут – начало заложения первых пазушных почек; 30 сут – пазушных побеги в среднем состоят из 4–5 фитомеров (именно такие побеги после отделения от экспланта хорошо приживаются на новых средах); 40 сут – начало развития в узлах побегов первого порядка пазушных побегов второго порядка; 60 сут – начало развития в узлах побегов второго порядка пазушных побегов третьего порядка. На среде, дополненной 0,5 мг/л БАП, экспланты развивались медленнее, с опозданием примерно на 15 сут: 25 сут – индукция геммогенеза; 45 сут – присутствие на экспланте побегов первого порядка, состоящих из 4–5 фитомеров; 55 и 85 сут – начало развития побегов второго и третьего порядка соответственно.

Учитывая динамику мультипликации побегов, можно более эффективно планировать процедуру микроразмножения в зависимости от той задачи, которая будет решаться на следующем этапе: укоренение или дальнейшее размножение эксплантов. Так, при индукции ризогенеза не желательно, чтобы на экспланте присутствовали пазушные побеги второго и третьего порядка, поскольку это может привести к развитию регенеранта с аномальной морфологией (ветвящимся побегом). В таком случае разделение пазушных побегов для их дальнейшего укоренения следует проводить не позднее 45 сут культивирования на среде MS с 0,5 мг/л БАП и 30 сут на среде с 2,0 мг/л БАП. Если же разделенные побеги предполагается пассировать на новые среды для дальнейшего микроразмножения, наличие у них почек и пазушных побегов второго и третьего порядка будет способствовать их мультипликации. В этом случае разделение эксплантов, развившихся на среде с 0,5 мг/л БАП, следует проводить не ранее 60 сут культивирования, а развившихся на среде с 2,0 мг/л БАП – не ранее 40 сут.

Заключение

У линии кукурузы АТТМ (bm, у, wx) в культуре зрелых зародышей прямой органогенез инициируется добавлением в среду MS БАП в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л. Гистологический анализ эксплантов показал, что экзогенный гормон стимулирует деление клеток интеркалярных меристем и изменяет направление их дифференцировки. Как правило, сначала в колеоптилярном узле, а затем и в основании выше расположенных фитомеров формируются вегетативные почки. Постепенно они прорастают в пазушные побеги, на которых затем развиваются побеги второго и третьего порядков. Концентрация гормона в среде определяет динамику процесса мультипликации побегов. На среде с 2,0 мг/л БАП первые пазушные почки закладываются в среднем через 10 сут от начала культивирования. Через 40 сут на пазушных побегах первого порядка начинают развиваться побеги второго порядка, а через 60 сут – третьего порядка. На среде с 0,5 мг/л БАП каждый из этих этапов начинается примерно на 15 сут позже. Выявленные закономерности следует учитывать при разработке эффективных технологий клонального микроразмножения кукурузы посредством прямого органогенеза.

Высокие показатели роста микропобегов – главная цель микроразмножения, тогда как для поддержания растительных коллекций *in vitro* предпо-

читательным является создание условий, замедляющих рост побегов без потери их жизнеспособности. Исходя из установленной зависимости динамики развития эксплантов от концентрации БАП, культивирование проростков кукурузы на среде MS с 2,0 мг/л БАП целесообразно использовать для клонального микроразмножения, а культивирование на среде с пониженной до 0,5 мг/л концентрацией БАП – для создания длительно пролиферирующих стерильных культур.

Отсутствие при прямом органогенезе этапа каллусообразования и развитие новых побегов из меристем экспланта способствуют сохранению генетического единообразия культивируемого растительного материала. Это позволяет использовать индукцию данного пути морфогенеза в культуре зрелых зародышей для размножения элитных генотипов и создания коллекций *in vitro*.

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: 10.1007/BF00396083
2. Armstrong C. L. Regeneration of plants from somatic cells cultures: applications for *in vitro* genetic manipulation // *The Maize*. New York : Springer Verlag, 1994. P. 663–671.
3. Aguado-Santacruz G. A., Garcia-Moya E., Aguilar-Acuna J. L. [et al.]. *In vitro* plant regeneration from quality protein maize // *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 2007. Vol. 43. P. 215–224. doi: 10.1007/s11627-007-9042-9
4. Monalisha R., Chakraborty M., Banerjee M. [et al.]. Response of different genotypes on *in vitro* regeneration of maize (*Zea mays* L.) // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018. Vol. 1. P. 2422–2424. doi: 10.13140/RG.2.2.24107.34087
5. De Vasconcelos M. J. V., Antunes M. S., De Oliveira M. F. [et al.]. 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. doi: 10.3923/biotech.2018.12.18
6. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. СПб. : Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2003. 228 с.
7. Круглова Н. Н., Титова Г. Е., Сельдиминова О. А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // *Онтогенез*. 2018. Т. 49, № 5. С. 273–288. doi: 10.1134/S0475145018050038
8. Диас С., Долгих Ю. И., Шамина З. Б. Значение физиологических и генетических факторов в индукции эмбрионного каллуса у различных линий кукурузы // *Доклады Россельхозакадемии*. 1994. № 2. С. 6–8.
9. Mokhtari A., Alizadeh H., Yazdi B. [et al.]. Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants // *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*. 2013. Vol. 1, iss. 3. P. 74–80. doi: 10.18005/JAEB0103004
10. Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Регенерационный потенциал партеногенетических линий кукурузы в культуре зрелых зародышей // *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки*. 2021. № 2. С. 3–13. doi: 10.21685/2307-9150-2021-2-1
11. Springer W. D., Green C. E., Kohn K. A. Histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize // *Springer Protoplasma*. 1979. Vol. 101. P. 269–281.
12. Oduor R. O., Njagi N. M., Machuka J. S. *In vitro* regeneration of Dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis // *International Journal of Botany*. 2006. Vol. 2, № 2. P. 146–151. doi: 10.3923/ijb.2006.146.151

13. Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J. C. [et al.]. 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. doi: 10.1007/s11240-009-9613-z
14. Bedada L. T., Seth M., Runo S. M. [et al.]. Regenerability of elite tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines using immature zygotic embryo explants // African Journal of Biotechnology. 2012. Vol. 11, № 8. P. 598–605. doi: 10.5897/AJB11.812
15. Malini N., Ananadakumar C. R., Hariramakrishnan S. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction // Journal of Applied and Natural Science. 2015. Vol. 7, № 1. P. 131–137. doi: 10.31018/jans.v7i1.576
16. Huang X. Q., Wei Z. M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell Reports. 2004. Vol. 22. P. 793–800. doi: 10.1007/s00299-003-0748-9
17. Алаторцева Т. А., Тырнов В. С. Влияние питательной среды и генотипа на морфогенез в культуре зрелых зародышей кукурузы // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. 2008. № 7. С. 194–198.
18. Gudlavalleti P. K., Pagidoju S., Muppala S. [et al.]. 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. doi: 10.7324/JABB.2018.60304
19. 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 & Biotechnology. 2016. Vol. 14. P. 49–53. doi: 10.1016/j.jgeb.2016.03.001
20. Ahmad M. Z., Hussain I., Ahmed S. [et al.]. Direct *in vitro* multiple shoot regeneration in maize (*Zea mays*) inbred lines // J. Innov Bio-Res. 2017. Vol. 1, № 1. P. 24–29.
21. Ovchinnikova V. N., Sotchenko V. S., Sotchenko Y. V. [et al.]. Susceptibility of maize mesocotyl culture to *Agrobacterium* transformation and its *in vitro* regeneration // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. Vol. 54, № 8. P. 808–815. doi: 10.1134/s0003683818080057
22. Хумуд Б. М. Х., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Введение в культуру *in vitro* партеногенетических линий кукурузы // Известия 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
23. Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Индукция прямого органогенеза в культуре зрелых зародышей кукурузы // Известия Сарат. ун-та. Сер.: Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 3. С. 289–294. doi: 10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294
24. 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/9-6-09
25. Хумуд Б. М. Х., Юдакова О. И. Гормональная регуляция морфогенеза в культуре зрелых зародышей партеногенетических линий кукурузы // Известия Саратовского университета. Сер.: Химия. Биология. Экология. 2020. Т. 20, вып. 3. С. 315–323. doi: 10.18500/1816-9775-2020-20-3-315-323
26. Апанасова Н. В., Гуторова О. В., Юдакова О. И. [и др.]. Особенности строения и развития женских генеративных структур у линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Известия Самарского научного центра РАН. 2017. Т. 19, № 2-2. С. 216–219.
27. Гуторова О. В., Апанасова Н. В., Юдакова О. И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. Т. 18, № 2-2. С. 341–344.
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Plant Physiology. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

29. Юдакова О. И., Гуторова О. В., Беляченко Ю. А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений. Саратов : Изд-во Саратов. ун-та, 2012. 38 с.
30. Sawahel W. A., Ali A. M. Callus induction and maintenance of *Zea mays* kernels // *Biotechnology Letters*. 1994. Vol. 16, № 4. P. 397–400.
31. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // *Биополимеры и клетка*. 1997. Т. 13, № 5. С. 362–371. doi: 10.7124/bs.000497
32. Шпаар Д. Кукуруза. Выращивание, уборка, хранение и использование. М. : Зерно, 2012. 464 с.

References

1. Armstrong C., Green C.E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline. *Planta*. 1985;164(2):207–214. doi: 10.1007/BF00396083
2. Armstrong C.L. Regeneration of plants from somatic cells cultures: applications for *in vitro* genetic manipulation. *The Maize*. New York: Springer Verlag, 1994:663–671.
3. Aguado-Santacruz G.A., Garcia-Moya E., Aguilar-Acuna J.L. et al. *In vitro* plant regeneration from quality protein maize. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 2007;43:215–224. doi: 10.1007/s11627-007-9042-9
4. Monalisha R., Chakraborty M., Banerjee M. et al. Response of different genotypes on *in vitro* regeneration of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;1:2422–2424. doi: 10.13140/RG.2.2.24107.34087
5. De Vasconcelos M.J.V., Antunes M.S., De Oliveira M.F. et al. Callus induction and plant regeneration from immature embryos culture of tropical maize. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2018;17(3):359–368. doi: 10.3923/biotech.2018.12.18
6. Lutova L.A. *Biotehnologiya vysshikh rasteniy = Biotechnology of higher plants*. Saint Petersburg: Izd-vo S.-Peterburg. un-ta, 2003:228. (In Russ.)
7. Kruglova N.N., Titova G.E., Sel'dimirova O.A. Callusogenesis as a path of *in vitro* morphogenesis in cereals. *Ontogenez = Ontogenesis*. 2018;49(5):273–288. (In Russ.). doi: 10.1134/S0475145018050038
8. Dias S., Dolgikh Yu.I., Shamina Z.B. Significance of physiological and genetic factors in the induction of embryogenic callus in various maize lines. *Doklady Rossiiskoi akademii nauk = Reports of the Russian Academy of Sciences*. 1994;(2):6–8. (In Russ.)
9. Mokhtari A., Alizadeh H., Yazdi B. et al. Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat immature embryonic explants. *Journal of Agricultural Engineering and Biotechnology*. 2013;1(3):74–80. doi: 10.18005/JAEB0103004
10. Khumud B.M.Kh., Yudakova O.I. The regeneration potential of partenogenetic maize lines in the culture of mature embryos. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki = University proceedings. Volga region. Natural sciences*. 2021;(2):3–13. (In Russ.). doi: 10.21685/2307-9150-2021-2-1
11. Springer W.D., Green C.E., Kohn K.A. Histological examination of tissue culture initiation from immature embryos of maize. *Springer Protoplasma*. 1979;101:269–281.
12. Oduor R.O., Njagi N.M., Machuka J.S. *In vitro* regeneration of Dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. *International Journal of Botany*. 2006;2(2):146–151. doi: 10.3923/ijb.2006.146.151
13. Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J.C. et al. Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant cell Tiss Organ Cult*. 2010;100(1):31–37. doi: 10.1007/s11240-009-9613-z
14. Bedada L.T., Seth M., Runo S.M. et al. Regenerability of elite tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines using immature zygotic embryo explants. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(8):598–605. doi: 10.5897/AJB11.812

15. Malini N., Ananadakumar C.R., Hariramakrishnan S. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through callus induction. *Journal of Applied and Natural Science*. 2015;7(1):131–137. doi: 10.31018/jans.v7i1.576
16. Huang X.Q., Wei Z.M. High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*. 2004;22:793–800. doi: 10.1007/s00299-003-0748-9
17. Alatortseva T.A., Tyrnov V.S. The effect of nutrient medium and genotype on morphogenesis in the culture of mature corn germs. *Byulleten' Botanicheskogo sada Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta* = *Bulletin of the Botanical Garden of Saratov State University*. 2008;7(7):194–198. (In Russ.)
18. Gudlavalleti P.K., Pagidoju S., Muppala S. et al. Coleoptilar node – a season-independent explant source for in vitro culture in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2018;6(3):20–28. doi: 10.7324/JABB.2018.60304
19. 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 & Biotechnology*. 2016;14:49–53. doi: 10.1016/j.jgeb.2016.03.001
20. Ahmad M.Z., Hussain I., Ahmed S. et al. Direct in vitro multiple shoot regeneration in maize (*Zea mays*) inbred lines // *J. Innov Bio-Res*. 2017;1(1):24–29.
21. Ovchinnikova V.N., Sotchenko V.S., Sotchenko Y.V. et al. Susceptibility of maize mesocotyl culture to *Agrobacterium* transformation and its *in vitro* regeneration. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(8):808–815. doi: 10.1134/s0003683818080057
22. Khumud B.M.Kh., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Introduction to in vitro culture of parthenogenetic maize lines. *Izvestiya Sarat. un-ta. Ser.: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* = *Proceedings of Saratov University. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2018;18(3):320–324. (In Russ.). doi: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-320-324
23. Khumud B.M.Kh., Yudakova O.I. Introduction to in vitro culture of parthenogenetic maize lines. *Izvestiya Sarat. un-ta. Ser.: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* = *Proceedings of Saratov University. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2019;19(3):289–294. (In Russ.). doi: 10.18500/1816-9775-2019-19-3-289-294
24. 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;9(6):65–73. doi: 10.7176/jnsr/9-6-09
25. Khumud B.M.Kh., Yudakova O.I. Hormonal regulation of morphogenesis in the culture of mature embryos of maize parthenogenetic lines. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Ser.: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* = *Proceedings of Saratov University. Series: Chemistry. Biology. Ecology*. 2020;20(3):315–323. (In Russ.). doi: 10.18500/1816-9775-2020-20-3-315-323
26. Apanasova N.V., Gutorova O.V., Yudakova O.I. et al. Features of the structure and development of female generative structures and maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN* = *Proceedings of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2017;19(2-2):216–219. (In Russ.)
27. Gutorova O.V., Apanasova N.V., Yudakova O.I. Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN* = *Proceedings of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2016;18(2-2):341–344. (In Russ.)
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 1962;15:473–497. (In Russ.)
29. Yudakova O.I., Gutorova O.V., Belyachenko Yu.A. *Metody issledovaniya reproductivnykh struktur i organov rasteniy* = *Methods for studying the reproductive structures and organs of plants*. Saratov: Izd-vo Sarat. un-ta, 2012:38. (In Russ.)
30. Sawahel W.A., Ali A.M. Callus induction and maintenance of *Zea mays* kernels. *Biotechnology Letters*. 1994;16(4):397–400.

31. Kunakh V.A. Genomic variability of plant somatic cells. 3. Callus formation in vitro. *Biopolimery i kletka = Biopolymers and the cell*. 1997;13(5):362–371. (In Russ.). doi: 10.7124/bc.000497
32. Shpaar D. *Kukuruza. Vyrashchivanie, uborka, khranenie i ispol'zovanie = Corn. Cultivation, harvesting, storage and use*. Moscow: Zer-no, 2012:464. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Хумуд Бутхайна Мохаммед Хумуд
аспирант, Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н. Г. Чернышевского
(Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83)

E-mail: bobogold18@gmail.com

Humood Buthaina Mohammed Humood
Postgraduate student, Saratov State
University (83 Astrakhanskaya
street, Saratov, Russia)

Ольга Ивановна Юдакова
доктор биологических наук, доцент,
заведующий кафедрой генетики,
Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н. Г. Чернышевского
(Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83)

E-mail: yudakovaioi@info.sgu.ru

Olga I. Yudakova
Doctor of biological sciences, associate
professor, head of the sub-department
of genetics, Saratov State University
(83 Astrakhanskaya street, Saratov, Russia)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests.

Поступила в редакцию / Received 10.04.2023

Поступила после рецензирования и доработки / Revised 15.05.2023

Принята к публикации / Accepted 07.06.2023