

## Оценка эффективности введения образцов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) из коллекции ВИР в культуру *in vitro*

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-137-142



УДК: 58.085

Поступление/Received: 06.03.2021

Принято/Accepted: 06.10.2021

Е. С. КОРШИКОВА<sup>1,2</sup>, К. М. ЕРШОВА<sup>1,2</sup>,  
Ю. А. МОКШЕНИНОВА<sup>1,3</sup>, Ю. В. УХАТОВА<sup>1,2\*</sup>

Efficiency of *in vitro* culture techniques  
applied to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)  
accessions from the VIR collection

E. S. KORSHIKOVA<sup>1,2</sup>, K. M. ERSHOVA<sup>1,2</sup>,  
YU. A. MOKSHENINOVA<sup>1,3</sup>, YU. V. UKHATOVA<sup>1,2\*</sup>

<sup>\*1</sup> Федеральный исследовательский центр  
Всероссийский институт генетических ресурсов растений  
имени Н.И. Вавилова,  
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44  
<sup>\*</sup> ✉ y.ukhatova@vir.nw.ru

<sup>\*1</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute  
of Plant Genetic Resources (VIR),  
42, 44 Bolshaya Morskaya Street,  
St. Petersburg 190000, Russia  
<sup>\*</sup> ✉ y.ukhatova@vir.nw.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

<sup>2</sup> Saint Petersburg State University,  
7–9 Universitetskaya Emb.,  
St. Petersburg 199034, Russia

<sup>3</sup> Ленинградский государственный университет  
имени А.С. Пушкина,  
196605 Россия, г. Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское  
шоссе, 10

<sup>3</sup> Pushkin Leningrad State University,  
10 Peterburgskoye Shosse,  
Pushkin, St. Petersburg 196605, Russia

Соя – одна из самых востребованных индустрией сельскохозяйственных культур, однако применение методов селекции следующего поколения для получения новых сортов сои с заданными свойствами пока ограничено. Для успешного применения новых методик необходимы и новые направления изучения образцов коллекции, в частности изучение по способности к регенерации и каллусогенезу для последующего включения в биотехнологические программы.

С целью изучения возможности эффективного введения в культуру *in vitro* и проведения дальнейшей оценки способности образцов сои к каллусообразованию и регенерации в культуре *in vitro* выбраны 10 образцов различного происхождения, контрастных по срокам созревания. В ходе работы проводили оценку влияния различных приемов стерилизации семян (одноступенчатая, с применением коммерческого отбеливателя, и двухступенчатая, сочетающая воздействие хлор-содержащего препарата и перекиси водорода), оценивали влияние типа экспланта (эпикотили, гипокотили, семядольные узлы, сегменты семядольных листиков) и фитогормонального состава питательной среды: (1) МС + 1,13 мг/л БАП + 0,5 мг/л ГК и (2) МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК).

В результате проведенных исследований установлено, что вариант двухступенчатой стерилизации семян наиболее эффективен на этапе инициации культуры *in vitro* сои; гипокотили, эпикотили и семядольные узлы имеют наиболее высокую способность к каллусообразованию на обоих вариантах питательных сред.

**Ключевые слова:** регенерация, экспланты, стерилизация семян, каллусообразование.

Using a wide range of modern biotechnologies and genetic techniques to study plant germplasm accessions held by VIR makes it possible to procure valuable results, required for the development of new high-yielding cultivars adapted to adverse environmental conditions and possessing specified technological properties, particularly to identify and mark new genes and alleles useful for plant breeding. This research trend is in line with Presidential Decree No. 680 “Concerning the development of genetic technologies in the Russian Federation”. Soybean is among the key crops in agricultural production, but the use of next-generation breeding tools to obtain new soybean cultivars with desired properties is still limited. Successful application of novel methods also requires new approaches to studying soybean accessions, specifically their ability to regenerate and produce calluses for subsequent inclusion in biotechnological programs.

Ten soybean accessions of various origin, contrasting in ripening schedules, were selected to study the possibility of effective introduction into *in vitro* culture and further assessment of their ability to produce calluses and regenerate in *in vitro* culture. The work included evaluating the effects of different seed sterilization techniques (one-step sterilization, using a commercial bleach, and two-step one, combining the impacts of a chlorine-containing preparation and hydrogen peroxide), types of explants (epicotyls, hypocotyls, cotyledon nodes, and cotyledon leaf segments), and phytohormone composition of nutrient medium: (1) MS + 1.13 mg/L BAP + 0.5 mg/L HA, and (2) MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L IAA).

The assessment results showed that the option of two-step seed sterilization was the most effective for soybean at the stage of *in vitro* culture initiation, while hypocotyls, epicotyls, and cotyledon nodes had the highest callus formation ability in both types of nutrient media.

**Key words:** regeneration, explants, seed sterilization, callus formation.

## Введение

На сегодняшний день в мировом производстве растительного белка и масла соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ведущей культурой (Seferova, Vishnyakova, 2018). Соя – растение короткого дня. Для продвижения к северу важна реакция на продолжительность фотопериода. Удлинение вегетации при более длинном световом дне сильно влияет на возможность осеверения культуры. При использовании методов традиционной селекции необходимо выявлять в генофонде наиболее скороспелые сорта со слабой чувствительностью к фотопериоду для возможности выращивания культуры в северных широтах. Такая работа по изучению коллекции образцов сои, имеющих различное эколого-географическое происхождение, с успехом ведется в отделе генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР уже много лет (Seferova et al., 2008; Seferova, Novikova, 2015; Seferova, Vishnyakova, 2018), что позволило создать признаковую коллекцию образцов сои с низкой фотопериодической чувствительностью. Созданная коллекция образцов сои с изученной фотопериодической чувствительностью (ФПЧ) может быть использована для детальной оценки генов фотопериодической чувствительности молекулярно-генетическими методами.

Для получения растений с заданными свойствами в последние годы используют методы геномного редактирования, ведущие к изменению функционирования генов, что приводит к формированию новых генотипов в более сжатые сроки. Так, используя систему геномного редактирования CRISPR/Cas, можно получить высокопродуктивные генотипы сои для выращивания практически во всех климатических зонах, что будет экономически выгодным и приведет к решению проблемы возделывания данной культуры в более северных широтах по сравнению с существующими зонами возделывания сои (Kogotkova et al., 2017; Vinichenko et al., 2020).

У сои идентифицированы и охарактеризованы 12 локусов, контролирующих время цветения и созревания,

а также выявлены механизмы их функционирования и взаимодействия. Основная проблема возделывания сои в условиях укороченной длины дня тропических регионов – получение растений с признаками карликовости и полустерильности. Выявление признака длинного ювенильного периода (LJ) и идентификация генов, контролирующих его, позволили производить высокоурожайные сорта сои в регионах ниже 15° широты. При продвижении ареала возделывания сои в северные широты в условиях длинного дня сильно увеличивается продолжительность вегетационного периода и цветение может отсутствовать. Сорта сои, адаптированные к северным широтам, отличаются признаком нечувствительности к фотопериоду, который регулируется различными комбинациями аллелей локусов E1, E3 и E4. Выбор оптимальных условий *in vitro* позволит повысить уровень регенерации различных генотипов и вовлечь большее число образцов в развивающиеся программы генетического редактирования.

*Цель настоящей работы* – оценка эффективности инициации культуры *in vitro* и способности образцов сои к каллусообразованию в асептических условиях.

## Материалы и методы

В качестве материала для исследования из коллекции ВИР выбраны 10 образцов сои различного происхождения, контрастных по срокам созревания. Использовали пять скороспелых ('Fiskeby V', 'Светлая', 'KG-20', 'Aldana', 'Касатка') и пять среднеспелых ('Александровская', 'Таджикская 9', 'Manchu' ('Lafayette'), '390-24', 'Sennari Musume') сортов сои (табл. 1). Для работ в культуре *in vitro* были взяты семена репродукции 2020 года.

### *Введение образцов сои в культуру in vitro*

Оценку эффективности инициации стерильной культуры сои для дальнейшего изучения способности к регенерации и включения генотипов с наиболее высоким уровнем регенерационной способности в гено-инженерные эксперименты проводили в несколько этапов.

**Таблица 1.** Образцы сои коллекции ВИР, использованные для введения в культуру *in vitro*

**Table 1.** Soybean accessions from the VIR collection introduced into *in vitro* culture

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Название образца / Accession name	Происхождение / Origin
5829	Fiskeby V	Швеция
9960	Светлая	Россия
10539	KG-20	Канада
0624	Aldana	Польша
1114	Касатка	Россия
4702	Александровская	Россия
6501	Таджикская 9	Таджикистан
6686	Manchu (Lafayette)	США
7235	390-24	Южная Корея
7589	Sennari Musume	Япония

На первом этапе подбирали способы стерилизации семян сои для эффективного введения в асептические условия.

#### Стерилизация семян

Семена подвергали тщательной поверхностной стерилизации. Для выбора оптимального варианта стерилизации сравнивали два различных способа, по 20 семян в каждом варианте:

1) 15-минутная стерилизация 15-процентным водным раствором отбеливателя «АСЕ» с последующей промывкой автоклавированной дистиллированной водой трижды по 10 мин (Dunaeva et al., 2017);

2) в качестве стерилизующего агента использовали 20-процентный водный раствор отбеливателя «АСЕ», в котором выдерживали семена 15 минут, затем промывали их автоклавированной дистиллированной водой трижды по 10 минут, после чего дополнительно стерилизовали 3-процентной перекисью водорода в течение 15 минут, и в завершение этапа стерилизации семена дважды промывали автоклавированной дистиллированной водой по 10 минут (Varlamova et al., 2018).

В стерильных условиях ламинара семена сои высаживали на питательную среду МС – Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 2 мг/л БАП (Varlamova et al., 2018).

#### Оценка способности образцов сои к каллусогенезу

Для оценки регенерационной способности образцов сегменты стебля и семядоли высаживали горизонтально по 4 экспланта на чашку Петри (по 10–12 эксплантов на каждый изучаемый образец) на 1-2 недели.

#### Оценка влияния типа экспланта

Для оценки регенерационной способности образцов сои подбирали тип экспланта, наиболее эффективно формирующий каллус, из следующих вариантов: эпикотили, гипокотили, семядольные узлы, сегменты семядольных листиков (дистальные и базальные). Экспланты вычленили из проростков сои в возрасте 1,5–2 недель

в стерильных условиях и высаживали по 5–10 эксплантов каждого образца на чашки Петри.

*Оценка влияния состава питательной среды на способность сои к каллусогенезу*

Для оценки влияния состава регуляторов роста на регенерационные процессы сравнивали два варианта питательной среды МС:

1) МС + 1,13 мг/л БАП + 0,5 мг/л ГК (Efremova et al., 2017);

2) МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК (Varlamova et al., 2018).

#### Статистическая обработка

Для оценки различий между вариантами опыта вычисляли средние значения по трем независимым повторностям с подсчетом ошибки среднего. Статистическую обработку данных проводили с использованием методов описательной статистики. Влияние факторов «вариант стерилизации», «тип экспланта» и «питательная среда» оценивали методом однофакторного анализа. Существенные различия – при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

#### Стерилизация семян

В результате подобранной методики стерилизации семян все образцы были успешно введены в культуру *in vitro* в трех повторностях в варианте двухступенчатой стерилизации (табл. 2). Отметим, что среднеспелые образцы в целом сложнее поддавались стерилизации.

Как видно из полученных данных, представленных в таблице 2, статистически ( $p < 0,05$ ) наиболее эффективным способом стерилизации оказался вариант 2 – с применением двухступенчатой стерилизации.

Образцы были помещены в условия световой комнаты при температуре +23...+25°C с 16-часовым фотопериодом. Первые корешки появились уже на вторые-третьи сутки культивирования, а спустя неделю уже раскрылись

**Таблица 2. Эффективность введения семян сои в культуру *in vitro*, %**  
**Table 2. Efficiency of introducing soybean seeds into *in vitro* culture, %**

№ по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Название образца / Accession name	Вариант 1 / Option 1	Вариант 2 / Option 2
5829	Fiskeby V	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
9960	Светлая	70,0 ± 12,6	100,0 ± 0,0
10539	KG-20	40,0 ± 15,8	100,0 ± 0,0*
10624	Aldana	50,0 ± 21,3	100,0 ± 0,0*
1114	Касатка	70,0 ± 12,6	100,0 ± 0,0
4702	Александровская	10,0 ± 10,0	10,0 ± 10,0
6501	Таджикская 9	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0*
6686	Manchu (Lafayette)	0,0 ± 0,0	80,0 ± 13,3*
7235	390-24	0,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0*
7589	Sennari Musume	0,0 ± 0,0	70,0 ± 12,6*
<b>Среднее</b>		<b>34,0 ± 10,3</b>	<b>86,0 ± 10,0*</b>

Примечание: варианты стерилизации 1 и 2 подробно описаны в разделе «Стерилизация семян». Среднее – представлено среднее по трем повторностям значение и ошибка среднего. Знаком «\*» отмечены достоверные различия между вариантами опыта  
Note: sterilization options 1 and 2 are described in detail in the *Seed Sterilization* section. Mean is the mean value for three replications and the error of the mean. Significant differences between the options are marked with an asterisk (\*)

семядольные листочки (рис. 1). Для оценки способности к каллусообразованию брали экспланты с двухнедельных проростков.

вала каллус с частотой 100%, в то время как в тех же условиях на эксплантах дистальной половинки семядольного листочка каллус не образовался совсем. Таким



**Рис. 1.** Проращивание семян сои в культуре *in vitro*

**Рис. 1.** Soybean seed germination in *in vitro* culture

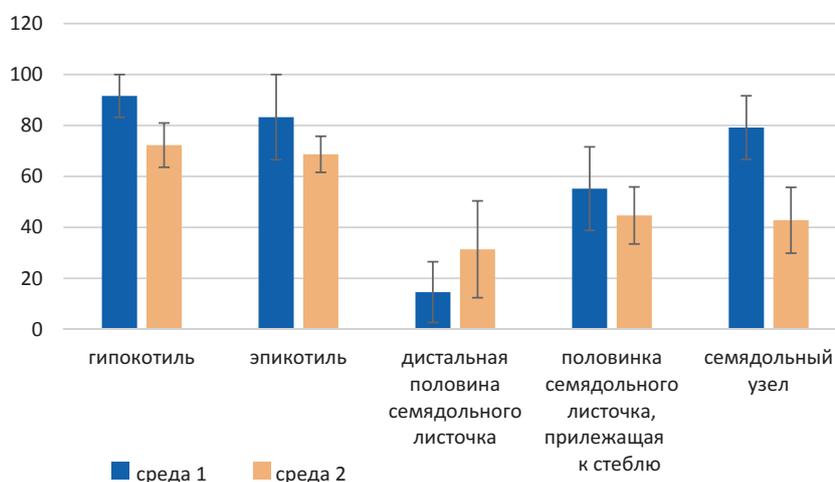
#### Оценка влияния типа экспланта

В результате исследований выявили, что экспланты гипокотыля, эпикотыля и, в ряде случаев, семядольного узла показали достоверно наиболее высокий ( $p < 0,05$ ) процент по образованию каллуса (до 100%), а части семядольных листочков характеризовались низкой способностью к формированию каллуса (рис. 2).

образом, для дальнейших исследований наиболее целесообразно использовать экспланты эпикотылей, гипокотылей и семядольные узлы.

#### Оценка влияния состава питательной среды на регенерационную способность сои

Частота формирования каллуса на питательной среде 1 (МС + 1,13 мг/л БАП + 0,5 мг/л ГК) в зависимости от



**Рис. 2.** Эффективность каллусообразования эксплантов сои на разных питательных средах в культуре *in vitro*

**Fig. 2.** Callus formation efficiency of soybean explants on different nutrient media in *in vitro* culture

Отметим, что два скороспелых сорта сои ('KG-20' и 'Светлая') из пяти показали самый высокий процент образования каллуса на трех типах экспланта – гипокотыли, эпикотыли и семядольные узлы, при этом каллус образовался на 100% таких эксплантов указанных сортов. У этих же образцов максимально отличалась частота каллусообразования из разных частей семядольных листочков: прилежащая к стеблю часть семядоли формиро-

вала каллус с частотой 100%, на питательной среде 2 (МС + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК) – от 43 до 64%. Достоверные отличия отмечены только в случае сравнения семядольных узлов на разных питательных средах (см. рис. 2), все остальные варианты и средние значения частоты формирования каллуса на двух средах не отличались. Из этого следует, что оба состава могут быть использованы для дальнейших экспериментов.

### Заключение

Таким образом, отмечено достоверное влияние стерилизующего агента и типа экспланта на способность образцов сои к формированию каллуса. Наиболее высокая способность к каллусообразованию отмечена у гипокотилей, в ряде случаев – у эпикотилей и семядольных узлов. Влияние фитогормонального состава питательной среды на регенерационную способность образцов сои недостоверно.

*Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Разработка подходов к расширению ареалов возделывания значимых культур семейства Бобовые на основе генетического редактирования при помощи системы CRISPR/Cas», PURE ID 62228741.*

*Авторы благодарят ведущего научного сотрудника отдела генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР И. В. Сеферову за любезно предоставленные для исследования образцы сои различных групп спелости.*

*This work was supported by the project “Development of approaches to expanding the cultivation areas of significant crops of the legume family based on genetic editing using the CRISPR/Cas system”, PURE ID 62228741.*

*The authors are grateful to Dr. I. V. Seferova, Leading Researcher at the Department of Legume Crop Genetic Resources, for soybean accessions of different earliness groups that she kindly made available for our research.*

### References / Литература

- Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Conservation of vegetatively propagated crops in *in vitro* and cryogenic collections: guidelines (Sokhraneniye vegetativno raznozhayemykh kultur v *in vitro* i kriokollektsiyakh: metodicheskiye ukazaniya). T.A. Gavrilenko (ed.). 2nd ed. St. Petersburg: VIR; 2017. [in Russian] (Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / под. ред. Т.А. Гавриленко. 2-е изд. Санкт-Петербург: ВИР; 2017).
- Efremova O.S., Shkryl Yu.N., Veremeichik G.N. Regeneration potential *in vitro* of soybean varieties in agrobacterial transformation. *Agrarny vestnik Primorya = Agrarian Bulletin of Primorye*. 2017;4(8):21-23. [in Russian] (Ефремова О.С., Шкрыль Ю.Н., Веремейчик Г.Н. Регенерационный потенциал *in vitro* сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) при агробактериальной трансформации. *Аграрный вестник Приморья*. 2017;4(8):21-23).
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29-37. DOI: 10.18699/VJ19.458
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Seferova I.V., Nekrasov A.Yu., Silaeva O.I., Kiyashko N.I., Teter Z.Yu., Kiva T.I., Nikishkina M.A. Catalogue of the VIR global collection. Issue 782. Soybean: source material for soybean breeding in Krasnodar Territory (Soya: iskhodny material dlya selektsii soyi v Krasnodarskom krae). M.A. Vishnyakova (ed.). St. Petersburg: VIR; 2008. [in Russian] (Сеферова И.В., Некрасов А.Ю., Силаева О.И., Кияшко Н.И., Тетер З.Ю., Кива Т.И., Никишкина М.А. Каталог мировой коллекции ВИР. Выпуск 782. Соя: исходный материал для селекции сои в Краснодарском крае / под ред. М.А. Вишняковой. Санкт-Петербург: ВИР; 2008).
- Seferova I.V., Novikova L.Y. Climatic factors affecting the development of early soybean accessions in the environments of the Russian Northwest. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2015;176(1):88-97. [in Russian] (Сеферова И.В., Новикова Л.Ю. Климатические факторы, влияющие на развитие скороспелых образцов сои в условиях северо-запада РФ. *Труды по прикладной ботанике генетике и селекции*. 2015;176(1):88-97). DOI: 10.30901/2227-8834-2015-1-88-97
- Seferova I.V., Vishnyakova M.A. Soybean gene pool from VIR collection for the promotion of agronomical area of the crop to the north. *Legumes and Groat Crops*. 2018;3(27):41-47. [in Russian] (Сеферова И.В., Вишнякова М.А. Генофонд сои из коллекции ВИР для продвижения агрономического ареала культуры к северу. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018;3(27):41-47). DOI: 10.24411/2309-348X-2018-11030
- Varlamova N.V., Rodionova M.A., Efremova L.N., Kharchenko P.N., Vysotskii D.A., Khaliluev M.R. Indirect shoot organogenesis of soybean *Glycine max* (L.) Merr. from stem segments and use of the explants for agrobacterium-mediated transformation. *Agricultural biology*. 2018;53(3):521-530. [in Russian] (Варламова Н.В., Родионова М.А., Ефремова Л.Н., Харченко П.Н., Высоккий Д.А., Халилуев М.Р. Индукция непрямого органогенеза побегов сои *Glycine max* (L.) Merr. из сегментов стебля для применения в качестве эксплантов при агробактериальной трансформации. *Сельскохозяйственная биология*. 2018;53(3):521-530). DOI: 10.15389/agrobiology.2018.3.521rus
- Vinichenko N.A., Salina E.A., Kochetov A.V. The scope of use of molecular markers in soybean breeding. *Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(3):107-125. [in Russian] (Виниченко Н.А., Салина Е.А., Кочетов А.В. Потенциал использования молекулярных маркеров в селекции сои. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;6(3):107-125). DOI: 10.18699/Letters2020-6-15

**Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities**

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

**Для цитирования / How to cite this article**

Коршикова Е.С., Ершова К.М., Мокшенинова Ю.А., Ухатова Ю.В. Оценка эффективности введения образцов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) из коллекции ВИР в культуру *in vitro*. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021;182(4):137-142. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-137-142

Korshikova E.S., Ershova K.M., Moksheninova Yu.A., Ukhatoeva Yu.V. Efficiency of *in vitro* culture techniques applied to soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) accessions from the VIR collection. Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2021;182(4):137-142. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-137-142

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

**Дополнительная информация / Additional information**

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-4-137-142>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

**ORCID**

Korshikova E.S. <https://orcid.org/0000-0002-7298-9212>  
Ershova K.M. <https://orcid.org/0000-0002-9593-146X>  
Moksheninova Yu A. <https://orcid.org/0000-0001-7758-1593>  
Ukhatoeva Yu.V. <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>