

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Научная статья

УДК 58.085:58.084.1:57.085.23:633.11

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28



Каллусообразование и органогенез мягкой пшеницы с использованием зрелых зародышей в качестве эксплантов

Г. Р. Гумерова¹, А. А. Галимова^{1,2}, Б. Р. Кулуев^{1,2}

¹ Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Гульнар Рафиловна Гумерова, gulnar.yas@mail.ru

Актуальность. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) как одна из главных хлебных культур вызывает большой интерес у селекционеров и других исследователей и требует постоянного контроля существующих сортов, а также создания новых с помощью классических методов селекции и современных методов генной инженерии, ключевым этапом в которых является успешный каллусогенез и органогенез у целевых объектов. В связи с этим в данном исследовании была проведена оценка регенерационного потенциала двух яровых ('Саратовская 55' и 'Сигма') и трех озимых ('Таня', 'Фишт' и 'Память') сортов мягкой пшеницы, а также подбор оптимальных условий для индукции каллуса и органогенеза с использованием зрелых зародышей.

Материалы и методы. В работе были использованы незрелые и зрелые зародыши мягкой пшеницы сортов 'Таня', 'Фишт', 'Память', 'Сигма' и 'Саратовская 55'. Морфогенетический потенциал *in vitro* оценивали при действии абиотических факторов (предварительная холодовая обработка зерновок) и экзогенных гормонов (2,4-Д в различных концентрациях).

Результаты и выводы. Проведенный анализ позволил выделить сорта мягкой пшеницы 'Фишт' и 'Сигма', обладающие высоким морфогенетическим и регенерационным потенциалом. Также было показано, что холодовое воздействие может являться хорошим стимулирующим фактором для получения большого количества каллуса, а в случаях, когда задачей эксперимента является получение регенерантов, лучше отказаться от такой обработки в пользу классических методов индукции каллуса в нормальных условиях.

Ключевые слова: яровая пшеница, озимая пшеница, каллусогенез, регенерация, предварительная холодовая обработка, 2,4-Д

Благодарности: работа Г. Р. Гумеровой выполнена в рамках государственного задания № 122030200143-8. Исследование А. А. Галимовой и Б. Р. Кулуева поддержано грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Гумерова Г.Р., Галимова А.А., Кулуев Б.Р. Каллусообразование и органогенез мягкой пшеницы с использованием зрелых зародышей в качестве эксплантов. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):19-28. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28

STUDYING AND UTILIZATION OF PLANT GENETIC RESOURCES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28

Bread wheat callusogenesis and organogenesis using mature embryos as explants

Gulnar R. Gumerova¹, Ayzilya A. Galimova^{1,2}, Bulat R. Kuluev^{1,2}

¹ Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia

² N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Gulnar R. Gumerova, gulnaryas@mail.ru

Background. Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the staple cereal crops, so it is of great interest to breeders and researchers and requires constant monitoring of existing cultivars, including the development of new ones through classical breeding and modern gene engineering. The key stage in these techniques is successful callusogenesis and organogenesis in target objects. With this in view, the regeneration potential of two spring ('Saratovskaya 55' and 'Sigma') and three winter ('Tanya', 'Fisht' and 'Pamyat') cultivars of bread wheat was assessed, and optimal conditions were identified for callus induction and organogenesis using mature embryos.

Materials and methods. Immature and mature embryos of the five bread wheat cultivars were used in the study. The *in vitro* morphogenetic potential was evaluated under the impact of abiotic factors: preliminary exposure of grains to cold and use of exogenous hormones (2,4-D in various concentrations). Pretreatment of wheat with cold was carried out as follows: sterilized grains were incubated on the hormonal medium at a temperature of 4°C for 2 weeks, and then transferred to 26°C for 4 more weeks. The efficiency of callusogenesis and rhizogenesis was assessed and the numbers of morphogenetic calluses, regenerated and acclimatized plants were calculated.

Results and conclusions. The analysis made it possible to identify the bread wheat cultivars 'Fisht' and 'Sigma' for their high morphogenetic and regenerative potential. It was also shown that exposure to cold can serve as a good stimulating factor for producing a large number of calluses, but regenerants are better induced under normal conditions. The results also depended on the concentration of hormones applied. Universal conditions for morphogenesis and regeneration were not identified.

Keywords: spring wheat, winter wheat, callusogenesis, regeneration, cold pretreatment, 2,4-D

Acknowledgements: the study of G. R. Gumerova was carried out within the framework of State Task No. 122030200143-8. The study of A. A. Galimova and B. R. Kuluev was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-1066 of September 28, 2021).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Gumerova G.R., Galimova A.A., Kuluev B.R. Bread wheat callusogenesis and organogenesis using mature embryos as explants. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):19-28. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-19-28

Введение

Результаты генетической трансформации растений во многом зависят от эффективности регенерационной системы, которая в свою очередь обусловлена как внутренними генетическими факторами самого растения, так и внешними условиями культивирования (питательные среды, гормоны, абиотические факторы и др.).

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.), как и большинство злаковых, является сложной для манипуляций культурой с низким морфогенным потенциалом *in vitro*. Необходимость тщательного подбора условий органо-генеза для каждого сорта отдельно еще более усложняет процесс разработки и внедрения методов генетической трансформации *T. aestivum*. Однако улучшение качеств имеющихся сортов, а также получение новых сортов с помощью современных генно-инженерных технологий является актуальным и перспективным подходом наряду с классическими методами селекции. Поэтому и в настоящее время остается актуальной разработка эффективных методов индукции каллусообразования и органо-генеза мягкой пшеницы в условиях *in vitro* (Aydin et al., 2011; Adero et al., 2019; Kyriienko et al., 2021).

Первым этапом генетической трансформации растений является выбор типа эксплантов для дальнейших манипуляций *in vitro*, который должен иметь высокий морфогенный потенциал. Это достигается благодаря свойству тотипотентности растительных клеток – способности клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма. Однако выяснилось, что не все клетки злаковых проявляют это свойство (Wernicke, Brettell, 1980); в связи с этим для культивирования пшеницы *in vitro* подходит относительно небольшое разнообразие эксплантов, которые способны регенерировать в целое здоровое растение (Repellin et al., 2001). В ходе многочисленных экспериментальных работ зрелые растения однодольных удалось регенерировать из незрелых (Hafeez et al., 2012) и зрелых зародышей (Bartók, Sági, 1990; Delporte et al., 2001; Filippov et al., 2006), coleoptилей (Benkirane et al., 2000), остей (Stober, Hessu, 1997), пыльников (Orshinsky, Sadasivaiah, 1997; Kanbar et al., 2022), незрелых листьев (Zamora, Scott, 1983), апикальной меристемы (McHughen, 1983) и незрелых соцветий (Barro et al., 1999). Анализ всех этих исследований показывает, что наиболее эффективными для генетической трансформации эксплантами мягкой пшеницы являются незрелые зародыши (Filippov et al., 2006; Poddar et al., 2022). Однако огромным недостатком такого типа экспланта является их весьма маленький срок (не более 1 недели), подходящий для генетической трансформации, а также необходимость в довольно трудоемком и постоянном выращивании пшеницы, в том числе и в лабораторных условиях. В связи с этим многие исследователи начали обращать внимание на зрелые зародыши в качестве эксплантов, которые пригодны для манипуляций *in vitro* круглогодично.

Предложено много различных методик индукции каллуса из зрелых зародышей (McHughen, 1983; Bartók, Sági, 1990; Delporte et al., 2001; etc.). Однако такие работы проводились на ограниченном количестве отечественных сортов (Stupko et al., 2008; Miroshnichenko et al., 2014). В связи с вышесказанным целью данной работы являлась оценка регенерационного потенциала различных российских сортов мягкой пшеницы, а также подбор оптимальных условий для индукции каллуса и органо-гене-

за при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие сорта озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): 'Фишт', 'Таня' и 'Память', а также два яровых сорта 'Саратовская 55' и 'Сигма'. Семена озимых сортов, а также сорта 'Саратовская 55', были любезно предоставлены Национальным центром зерна им. П.П. Лукьяненко (г. Краснодар), сорт 'Сигма' был получен из Омского аграрного научного центра (г. Омск). Для экспериментов отбирали неповрежденные, морфологически здоровые семена.

Введение семян в культуру *in vitro* начинали с промывки зрелых зерновок в дистиллированной воде с добавлением 100 мкл твина в течение 15 минут. Далее зерновок выдерживали 10 минут в 96-процентном этаноле. После первого этапа стерилизации семена вымачивали в стерильной воде с добавлением 100 мкл твина в течение 5 часов при постоянном перемешивании на шейкере (200 об/мин). Второй этап поверхностной стерилизации зерновок проводили в 50-процентном растворе коммерческого препарата «Белизна» (ОАО «Каустик», Россия) и твина (1-2 мкл) с экспозицией 30 минут (Bartók, Sági, 1990), после чего их промывали стерильной водой 5 раз. Изолированные зрелые зародыши помещали на питательные среды щитком вверх, а в экспериментах, когда использовали целые зерновки, раскладывали их бороздкой вниз. Зрелые зародыши травмировали в стерильных условиях двумя продольными надрезами и одним поперечным для предотвращения их прорастания (Filippov et al., 2006).

Экспланты культивировали на питательной среде МС, в которой микросоли МС были заменены на микросоли L7, а также дополнительно содержали 18,75 г/л L-глутамина, 3,75 г/л L-пролина и 2,5 г/л L-аспарагина (Spark, Jones, 2009). В качестве каллусиндуцирующего гормона были выбраны синтетический ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в различных концентрациях (2, 4, 6, 8 мг/л) и 0,5 мг/л природного ауксина 3-индолилуксусной кислоты (ИУК). На одну чашку Петри помещали по 26–30 стерильных зерновок и культивировали в камере роста Binder (Германия) при температуре 26°C в темноте в течение 2 недель. Далее каллусы помещали на безгормональную среду L7 в камеру роста с освещением 5000 люкс и температурой 26°C. После 30 дней культивирования определяли долю эксплантов, образовавших органо-генный (зеленый) каллус, корневую систему и регенерантов (табл. 1). В ходе эксперимента регенеранты высотой 1,5–3 см пересаживали в пластиковые контейнеры Magenta (MAGENTA GA-7 VESSEL, Sigma-Aldrich, США). После укоренения проростки высотой 10–15 см были адаптированы и акклиматизированы к условиям почвы. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

В каждом варианте опыта для всех сортов было использовано не менее 30 зерновок, эксперименты выполнены в трех биологических повторностях. На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения ($\mu \pm \sigma$). Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения *t*-критерия находили для 95-процентного уровня значимости. Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0.

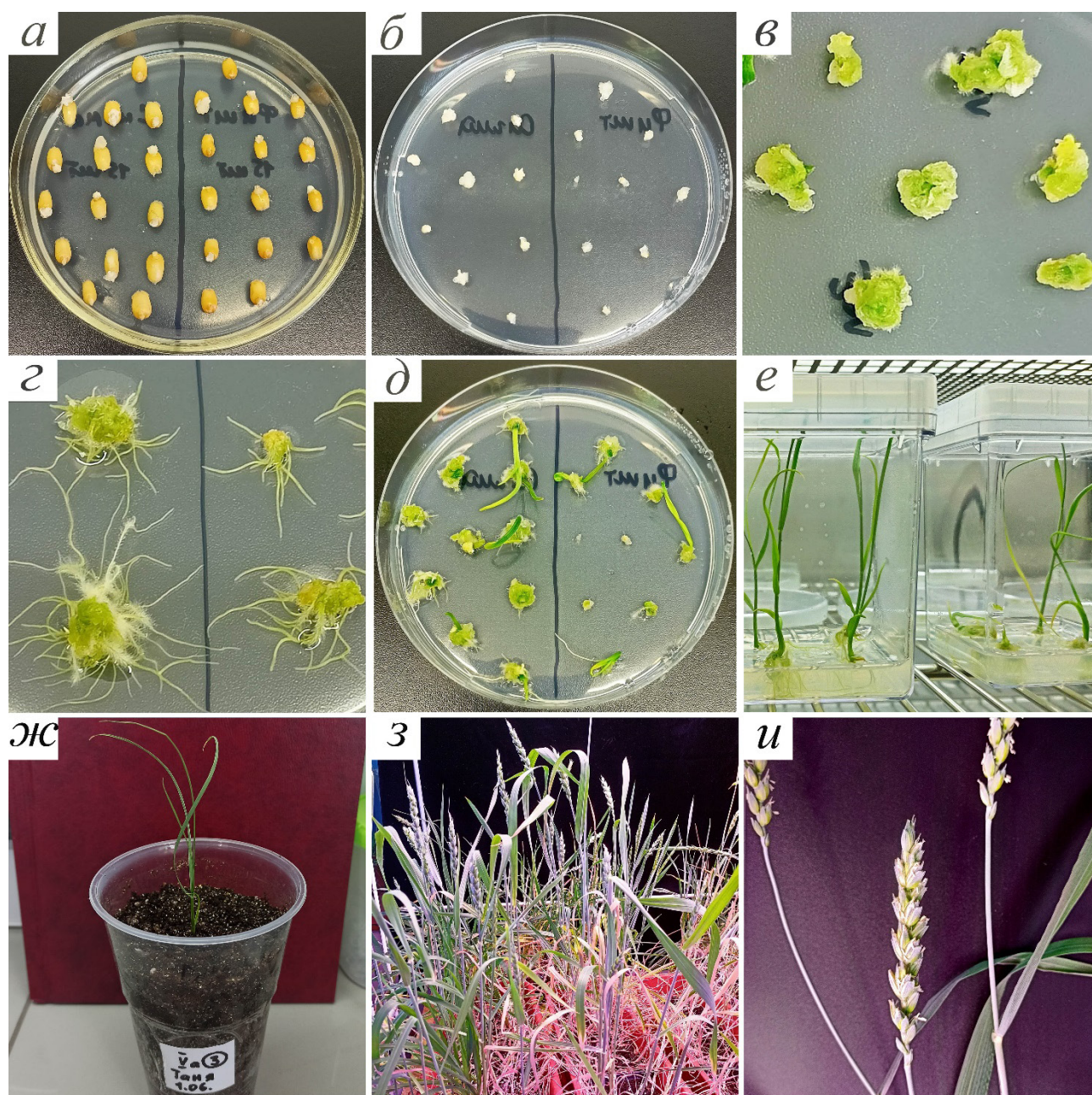


Рис. 1. Схема эксперимента: а) зерновки с каллусом; б) изолированные каллусы; в) морфогенный каллус; г) каллус с развитой корневой системой; д) регенерировавший каллус; е) пересадка регенерантов в Magenta; ж) акклиматизация проростков к условиям почвы; з) взрослые растения на почве; и) колосение и цветение взрослых растений

Fig. 1. Scheme of the experiment: а) wheat grains with a callus; б) isolated calluses; в) morphogenic callus; г) callus with a developed root system; д) regenerated callus; е) transplantation of regenerants in Magenta; ж) acclimatization of *in vitro* plants to soil conditions; з) plants growing on the soil; и) heading and flowering stages of plants

Результаты

Подбор условий стерилизации

Эффективная стерилизация эксплантов является первым шагом при подготовке растений к культивированию *in vitro*. При этом нужно соблюдать баланс между деконтаминацией и токсическим эффектом стерилизующих агентов. В случае с исследованными сортами мягкой пшеницы стандартная стерилизация – 5 минут в 70-процентном этиловом спирте, 15 минут в растворе 1,5-процентного NaClO и твина согласно С. А. Spark, Н. D. Jones (2009) и А. Ashraf et al. (2022) – приводила к полному заражению зерновок. Увеличение времени экспозиции и концентрации стерилизующих веществ

незначительно улучшало результат, причем только у яровых сортов. Озимые сорта были сильнее подвержены различного вида заражениям из-за особенностей полевого выращивания, что усложняет получение стерильных эксплантов.

Т. Bartók и F. Sági (1990) предложили более длительный процесс стерилизации зерновок озимых сортов, причем данный протокол оказался эффективным и для использованных нами сортов мягкой пшеницы. Помимо увеличения концентрации стерилизующих агентов (этилового спирта до 96% и NaClO до 7,5%) и времени экспозиции (до 10 и 30 минут, соответственно), они рекомендуют инкубировать зерновки в стерильной воде с добавлением твина в течение 5 часов при 28°C после обра-

ботки спиртом. Благодаря такому подходу жизнеспособные споры микроорганизмов выходят из состояния покоя и затем подвергаются полной стерилизации гипохлоритом натрия. При использовании данной методики нам удалось добиться 98% стерильности у сортов 'Саратовская 55' и Фишт, до 90% у сорта 'Память', до 87% у сорта 'Таня' и до 80% у сорта 'Сигма'. Преимущественно выявлялись грибковые заражения.

Получение каллуса из зрелых зародышей

Существует несколько техник получения каллусов из зрелых зародышей: 1) зародыши полностью отделяются от эндосперма (Aydin et al., 2011; Yin et al., 2011; Chopra et al., 2022; Ashraf et al., 2022) и 2) когда индукция каллуса происходит в неповрежденной зерновке (англ. термин: endosperm supported) (Bartók, Sági, 1990; Filippov et al., 2006; Adero et al., 2019). Предполагается, что в таком случае нативные метаболиты питательной ткани зерновки способствуют дополнительной (помимо экзогенных ауксинов) активации мезокотила зрелых зародышей (Bartók, Sági, 1990). Наши предварительные эксперименты показали, что интактные зародыши (без отделения от эндосперма) индуцировали морфогенный каллус с более высокой частотой, чем при их изолировании от эндосперма. В связи с этим последующие опыты проводили на зрелых зародышах без отделения от питательной ткани.

Воздействие температуры на эффективность каллусообразования и последующий органогенез

Для полноценной активации озимых сортов пшеница нуждается в этапе вернализации (яровизации) – продолжительном воздействии низких температур. Некоторые исследователи отмечают необходимость проведения

яровизации и для экплантов *in vitro* (Sparks, Jones, 2009). Таким образом, наши эксперименты проводились в двух температурных режимах: 26°C (зерновки после стерилизации сразу переносили в камеру роста) и 4°C (зерновки подвергались холодовому воздействию в течение двух недель, только затем переносились в камеру роста на 26°C). Каллусообразование наблюдали на 3–7 день в зависимости от концентрации 2,4-Д после перемещения на гормональную среду в нормальных условиях, а зерновки, проходившие предварительную холодовую обработку, образовывали каллус на несколько дней позже.

Эффект яровизации *in vitro* для озимых сортов пшеницы (Marcinińska, 1996; Sparks, Jones, 2009) был неоднозначным: зависел либо от возраста зародышей, либо от концентраций совместно использованных фитогормонов, либо имел положительное влияние на каллусообразование, а на регенеративные функции – отрицательное. В нашем исследовании предварительное воздействие холода в течение 2 недель до перемещения в камеру роста довольно часто ухудшало процесс каллусообразования независимо от того, озимой или яровой сорт использовался в работе. Так, у озимого сорта 'Таня' индукция каллусов достоверно снижалась после холодовой обработки при использовании всех концентраций гормона 2,4-Д, у сорта 'Фишт' – только при высоких концентрациях гормона, а для сорта 'Память' наблюдали, наоборот, положительное воздействие холода почти при всех концентрациях 2,4-Д (рис. 2).

В случае с яровыми сортами получились следующие результаты (рис. 3): каллусообразование у сортов 'Саратовская 55' и 'Сигма' значительно повысилось ($p < 0,05$) после холодового воздействия при низкой (2 мг/л) и высокой (8 мг/л) концентрации 2,4-Д. В остальных вариантах экспериментов низкие температуры либо никак не



Рис. 2. Каллусообразование у озимых сортов после предварительной инкубации в холоде (2, 4, 6 и 8 – концентрации 2,4-Д в мг/л)

Fig. 2. Winter wheat callusogenesis after preliminary exposure to cold (2, 4, 6 and 8 are concentrations of 2,4-D in mg/L)

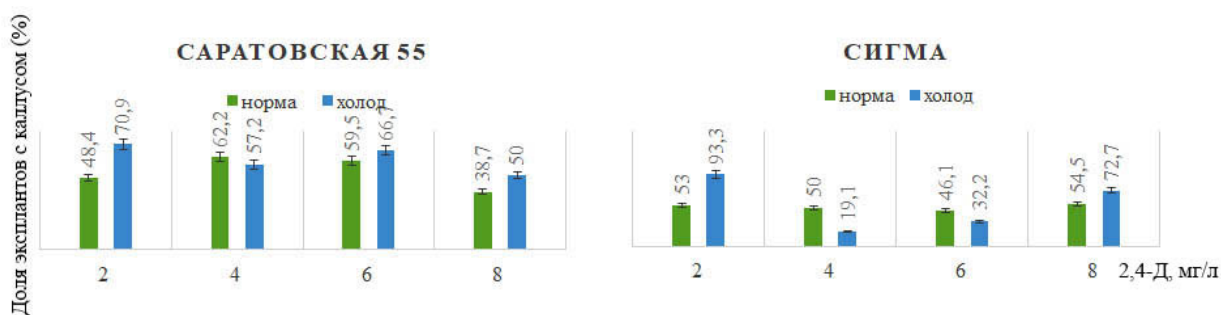


Рис. 3. Каллусообразование у яровых сортов после предварительной инкубации в холоде (2, 4, 6 и 8 – концентрации 2,4-Д в мг/л)

Fig. 3. Spring wheat callusogenesis after preliminary exposure to cold (2, 4, 6 and 8 are concentrations of 2,4-D in mg/L)

влияли (сорт 'Саратовская 55'), либо достоверно ухудшали каллусообразование (сорт 'Сигма').

Влияние предварительной холодной обработки на ризогенез у каллусов пшеницы оказалось менее ощутимым: эффективность корнеобразования у сорта 'Таня' варьировала от $60 \pm 3,12\%$, 'Фишт' – от $75 \pm 0,95\%$, 'Память' – от $66,7 \pm 1,45\%$, 'Саратовская 55' – от $75 \pm 1,15\%$, 'Сигма' – от $66,7 \pm 1,15\%$ до 100% (табл. 1). В целом холодная предобработка приводила к негативному результату, так как в большинстве случаев эффективность ризогенеза понижалась, но в то же время в определенных сочетаниях концентраций гормона 2,4-Д, наоборот, достоверно повышалась: у сортов 'Фишт', 'Память' и 'Саратовская 55' в сочетании с 4 мг/л 2,4-Д, а у сорта 'Сигма' – 6 мг/л (см. табл. 1).

Количество каллусов с зелеными точками регенерации после предварительной холодной обработки увеличилось у сорта 'Саратовская 55' в сочетании со всеми концентрациями 2,4-Д; у сорта 'Таня' – только при использовании высоких доз гормона (6 и 8 мг/л); у сортов 'Память' и 'Фишт' – при использовании 4 мг/л 2,4-Д (см. табл. 1).

Предварительное холодное воздействие в большинстве случаев отрицательно повлияло на регенерацию и последующую акклиматизацию взрослых растений в условиях почвы. Исключением является сорт 'Фишт', у которого оба эти показателя увеличились почти в 2 раза в сочетании с 2 мг/л 2,4-Д. Также наблюдалось достоверное повышение ($p = 0,02$) количества регенерантов *in vitro* совместно с влиянием 4 мг/л 2,4-Д у сорта

Таблица 1. Эффективность корнеобразования, регенерации и акклиматизации в зависимости от концентрации 2,4-Д и холодной предобработки зерновок
Table 1. Efficiency of root formation, regeneration, and plant acclimatization depending on the 2,4-D concentration and pretreatment of wheat grains with cold

Сорта мягкой пшеницы	Конц. 2,4-Д, мг/л	Количество каллусов с корневой системой, %	Количество каллусов с точками регенерации, %	Количество, полученных регенерантов, %	Количество акклиматизированных растений, %
Норма / холод					
Озимые:					
Таня	2	93,7 ± 2,46 / 80 ± 1,28 ^a	68,7 ± 2,3 / 60,1 ± 1,34 ^a	62,5 ± 1,83 / 60 ± 1,34	43,75 ± 1,78 / 0 ^a
	4	93,3 ± 1,06 / 91,6 ± 0,6	93,3 ± 1,06 / 91,6 ± 0,6	66,7 ± 1,73 / 25 ± 1,91 ^a	40 ± 2,33 / 13,3 ± 2,39 ^a
	6	92,3 ± 0,95 / 75 ± 1,82 ^a	88,5 ± 1,99 / 100 ^a	61,5 ± 2,21 / 0 ^a	30,8 ± 2,19 / 0 ^a
	8	100 / 60 ± 3,12 ^a	66,7 ± 2,03 / 99,8 ± 0,35 ^a	22,2 ± 3,05 / 20 ± 1,73	22,2 ± 3,15 / 11,1 ± 2,05 ^a
Память	2	100 / 95,2 ± 3,48	99,2 ± 0,75 / 95,2 ± 2,53	45,5 ± 2,03 / 71,4 ± 2,16 ^a	9,1 ± 2,09 / 18,2 ± 0,78 ^a
	4	66,7 ± 1,45 / 100 ^a	66,7 ± 1,45 / 100 ^a	66,7 ± 1,45 / 40 ± 2,75 ^a	16,7 ± 1,45 / 16,7 ± 2,38
	6	100 / 100	99,7 ± 0,52 / 100	75 ± 1,78 / 9,1 ± 1,87 ^a	25 ± 1,78 / 6,25 ± 2,96 ^a
	8	100 / 80,6 ± 0,95 ^a	92,3 ± 0,72 / 80,6 ± 0,95 ^a	61,5 ± 2,31 / 29,03 ± 3,12 ^a	23,1 ± 2,6 / 7,7 ± 2,53 ^a
Фишт	2	100 / 100	99,9 ± 0,17 / 99,7 ± 0,52	76,5 ± 0,82 / 65 ± 2,15 ^a	70,6 ± 0,8 / 29,4 ± 2,49 ^a
	4	80 ± 6,38 / 100 ^a	73,3 ± 1,04 / 99,8 ± 0,35 ^a	66,7 ± 4,09 / 77,3 ± 3,34 ^a	60 ± 1,34 / 26,7 ± 1,87 ^a
	6	90,9 ± 1,76 / 75 ± 0,95 ^a	86,4 ± 1,04 / 87,5 ± 0,87	81,8 ± 2,19 / 18,7 ± 2,46 ^a	45,4 ± 1,99 / 18,2 ± 2,63 ^a
	8	100 / 85,7 ± 1,91 ^a	100 / 66,7 ± 1,91 ^a	72,2 ± 1,57 / 38,1 ± 0,4 ^a	33,3 ± 2,17 / 5,5 ± 2,61 ^a

Таблица 1. Окончание
Table 1. The end

Сорта мягкой пшеницы	Конц. 2,4-Д, мг/л	Количество каллусов с корневой системой, %	Количество каллусов с точками регенерации, %	Количество, полученных регенерантов, %	Количество акклиматизированных растений, %
Норма / холод					
Яровые:					
Саратовская 55	2	93,3 ± 3,94 / 100 ^a	93,3 ± 0,56 / 100 ^a	46,6 ± 2,15 / 36,4 ± 2,61 ^a	13,3 ± 3,37 / 13,3 ± 3,21
	4	75 ± 1,15 / 95,8 ± 2,52 ^a	89,3 ± 1,37 / 99,6 ± 0,53 ^a	60,7 ± 3,34 / 25 ± 0,87 ^a	10,7 ± 2,63 / 7,1 ± 0,92
	6	100 / 95 ± 3,9	88,1 ± 1,18 / 95,1 ± 3,38 ^a	52 ± 2,46 / 5 ± 1,95 ^a	12 ± 1,49 / 4 ± 1,82 ^a
	8	91,7 ± 3,65 / 86,7 ± 1,66	66,7 ± 1,42 / 86,7 ± 1,66 ^a	33,3 ± 0,4 / 20 ± 4,06 ^a	8,3 ± 1,68 / 0,7 ± 0,62 ^a
Сигма	2	93,7 ± 4,01 / 99,7 ± 0,46	100 / 64,3 ± 1,13 ^a	93,7 ± 2,75 / 64,3 ± 1,13 ^a	43,7 ± 2,75 / 62,5 ± 1,13 ^a
	4	100 / 66,7 ± 1,15 ^a	93,3 ± 3,39 / 88,9 ± 2,65	80 ± 2,2 / 0 ^a	26,7 ± 2,2 / 0 ^a
	6	83,3 ± 2,43 / 100 ^a	94,4 ± 2,52 / 98,7 ± 1,54	50 ± 1,42 / 50 ± 3,64	50 ± 1,42 / 11,1 ± 3,64 ^a
	8	100 / 75 ± 2,17 ^a	99,4 ± 1,04 / 91,7 ± 1,57 ^a	72,2 ± 1,49 / 45,8 ± 2,23 ^a	27,8 ± 1,49 / 27,5 ± 2,23

Примечание: X^a – достоверные различия ($p < 0,05$) между нормальными условиями и предварительной холодной обработкой
Note: X^a – significant differences ($p < 0.05$) between normal conditions and preliminary treatment with cold

‘Фишт’. В случае с сортом ‘Сигма’ холодная обработка совместно с 2 мг/л 2,4-Д положительно повлияла на количество акклиматизированных растений (см. табл. 1), причем именно такое сочетание факторов оказалось наиболее эффективным при получении взрослых растений (табл. 2).

Влияние концентрации 2,4-Д в питательной среде на эффективность каллусообразования

Для определения регенерационного потенциала исследуемых сортов были использованы синтетический регулятор роста 2,4-Д в концентрациях 2, 4, 6 и 8 мг/л совместно с 0,5 мг/л ИУК (см. табл. 1).

Сорт ‘Таня’ показал наилучшие результаты при концентрации 6 мг/л 2,4-Д, однако при этом воздействие низких температур ухудшило каллусообразование (66,7 ± 2,19% и 42,8 ± 3,15% соответственно).

У сорта ‘Фишт’ при индукции каллуса в нормальных условиях концентрация фитогормона не имела значительного влияния на результат (от 50 ± 0,98% до 60 ± 2,79%), а при предварительной обработке холодом каллусогенез оказался наиболее эффективен при низких концентрациях синтетического гормона – 2 мг/л (64,5 ± 1,65%) и 4 мг/л (73,3 ± 0,95%).

Повышение концентрации 2,4-Д до 8 мг/л имело положительное влияние (почти в 2 раза) на сорт ‘Память’

(44,8 ± 2,07%), а холод дополнительно простимулировал каллусообразование до 68,9 ± 3,75%.

У сорта ‘Саратовская 55’ процесс каллусогенеза происходил лучше при концентрации гормона 4 мг/л (62,2 ± 3,93%), а в сочетании с холодом наиболее эффективной оказалась концентрация 2 мг/л (70,9 ± 3,61%).

Эффективность каллусогенеза при нормальных условиях у сорта ‘Сигма’ варьировала от 46,1 ± 2,41% до 54,5 ± 2,27%, а при предварительной холодной обработке происходило значительное увеличение каллусообразования до 93,3 ± 2,09% при концентрации 2 мг/л 2,4-Д и до 72,7 ± 2,82% при 8 мг/л.

Сортоспецифичность оптимальных условий культивирования для каллусообразования и органогенеза мягкой пшеницы

Как видно из обобщающей таблицы 2, оптимальные условия культивирования *in vitro* (температура и концентрация гормона 2,4-Д) зависят как от сорта мягкой пшеницы, используемого в опытах, так и от целей исследования. Холодовое воздействие может являться хорошим стимулирующим фактором для получения большого количества каллуса, а в случаях, когда задачей эксперимента является получение регенерантов, лучше отказаться от такой обработки в пользу классических методов индукции каллуса в нормальных условиях. Со-

Таблица 2. Оптимальные концентрации 2,4-Д и температурные условия для индукции каллусообразования, корнеобразования, регенерации и получения акклиматизированных к условиям почвы растений**Table 2. Optimal 2,4-D concentrations and temperature conditions for induction of callus formation, rhizogenesis, plant regeneration, and acclimatization to the soil**

Сорта мягкой пшеницы (о – озимая, я – яровая)	Задача эксперимента				
	Каллусогенез	Корнеобразование	Морфогенный каллус	Получение регенерантов	Получение акклиматизированных растений
	Концентрация 2,4 Д (мг/л) + температурные условия				
Таня (о)	6 + норма	2, 4, 6, 8 + норма 4 + холод	4 + норма 4, 6, 8 + холод	4 + норма	2, 4 + норма
Фишт (о)	4 + холод	2, 8 + норма 2, 4 + холод	2, 8 + норма 2, 4 + холод	6 + норма	2 + норма
Память (о)	8 + холод	2, 6, 8 + норма 2, 4, 6 + холод	2, 6, 8 + норма 2, 4, 6 + холод	6 + норма	6, 8 + норма
Саратовская 55 (я)	2 + холод	2, 6, 8 + норма 2, 4, 6 + холод	2 + норма 2, 4, 6 + холод	4 + норма	2, 4, 6 + норма 2 + холод
Сигма (я)	2 + холод	2, 4, 8 + норма 2, 6 + холод	2, 4, 6, 8 + норма 6, 8 + холод	2 + норма	2 + холод

гласно полученным результатам, не было выявлено универсальной для всех сортов концентрации каллус-индуцирующего гормона, что было вполне ожидаемо. Это в очередной раз подтверждает необходимость в предварительных пробных экспериментах для каждого сорта мягкой пшеницы.

При генетической трансформации главной задачей эксперимента является получение акклиматизированных к условиям почвы растений. Исходя из полученных результатов, могут быть предложены питательные среды с содержанием 2,4-Д от 2 мг/л (сорта 'Таня', 'Фишт', 'Саратовская 55', 'Сигма') до 6 мг/л (сорта 'Память', 'Саратовская 55') (см. табл. 2). При этом для получения акклиматизированных растений холодовая обработка оказалась полезной только для сортов 'Саратовская 55' и 'Сигма'.

В культуре зрелых зародышей *in vitro*, согласно полученным результатам, наиболее эффективными можно признать сорт озимой мягкой пшеницы 'Фишт' и яровой пшеницы 'Сигма', благодаря хорошему каллусообразованию, высокому морфогенному и регенерационному потенциалу и наибольшему числу акклиматизированных побегов, которые сформировали полноценные колосья. Выявленные условия культивирования можно считать достаточно оптимальными для проведения генно-инженерных и биотехнологических экспериментов. В случае с сортами 'Таня', 'Память' и 'Саратовская 55' необходим дальнейший подбор условий для более успешной реализации регенерационного потенциала зрелой зародышевой ткани.

Обсуждение

Мягкая пшеница является главной хлебной культурой не только в России, но и по всему миру, в связи с чем интерес к ней только растет. Улучшение существующих сортов пшеницы и создание новых являются актуальной задачей во все времена. Однако в ритм современного мира не укладывается применение только классических

методов селекции, которые для создания нового сорта требуют более десяти лет. С развитием технологий приходят новые современные методы, которые призваны значительно ускорить этот процесс. Это уже ставшая рутинной агробактериальная трансформация и ее различные модификации, физические и химические методы трансформации, а также относительно новая CRISPR/Cas-технология. Но в то же время ни один из этих подходов не достижим в отсутствие эффективных способов регенерации растений. Сортоспецифичность регенерационной системы еще более усложняет процесс генетической трансформации мягкой пшеницы.

Касаемо отечественных сортов, проведены единичные исследования по изучению регенерационного потенциала зародышевой ткани различных сортов мягкой пшеницы в культуре *in vitro* (Stupko et al., 2008; Miroshnichenko et al., 2014). Д. Н. Мирошниченко с соавторами (Miroshnichenko et al., 2014) сравнивали морфогенетический потенциал незрелой и зрелой зародышевой ткани 48 сортов и 10 различных видов пшениц. В результате данного скрининга были выявлены 24 сорта пшеницы, проявляющих высокий регенерационный потенциал, а также показано, что эффективность культуры *in vitro* зрелых зародышевых тканей большинства сортов и видов оказалась на порядок ниже в сравнении с тканями незрелых зародышей вследствие низкой регенерационной способности индуцированных морфогенных каллусов (Miroshnichenko et al., 2014). Действительно, в работе Д. Н. Мирошниченко с соавторами (Miroshnichenko et al., 2014) регенерация из зрелых зародышей сортов 'Память', 'Фишт', 'Таня' и 'Саратовская 55' составила $8,8 \pm 3,3\%$, $5,0 \pm 1,4\%$, $8,0 \pm 1,8\%$ и $15,1 \pm 1,8\%$ соответственно, в то время как по незрелым зародышам эффективность варьировала с $71,4 \pm 3,0\%$ до $88,5 \pm 2,1\%$. Стоит отметить, что авторы в своей работе использовали 10 мг/л 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты (дикамба) и 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК). Согласно нашим результатам, эффективность регенерации из зрелых зародышей с использованием сочетания гормонов 2,4-Д

и ИУК оказалась выше: 'Таня' – $66,7 \pm 1,73\%$, 'Фишт' – $81,8 \pm 2,19\%$, 'Память' – $75 \pm 1,78\%$, 'Саратовская 55' – $60,7 \pm 3,34\%$. Возможно, для такого типа эксплантов, как незрелые зародыши, более предпочтительной для получения регенерантов является дикамба, а для зрелых зародышей – 2,4-Д, в то время как в случае с индукцией каллусогенеза наблюдается противоположная картина. В то же время в статье тех же авторов (Miroshnichenko et al., 2011) по биобаллистической трансформации пшеницы (сорт 'Таежная') отмечается, что использование 2,4-Д для регенерации трансгенных растений оказалось более эффективным, в отличие от использования дикамбы. В недавнем исследовании (Ashraf et al., 2022) для регенерации зрелых зародышей мягкой пшеницы предлагается использование пиклорама в качестве более эффективного агента каллусообразования, чем дикамба и 2,4-Д. Однако авторы также отмечают сортоспецифичность для используемых ауксинов.

Настоящее исследование в очередной раз показывает генотипическую зависимость способности к индукции морфогенного каллуса и регенерации растений в культуре *in vitro*, а также необходимость подбора экзогенных факторов в зависимости от целей исследования (см. табл. 2). Предварительная холодовая обработка зерновок совместно с определенными концентрациями гормона 2,4-Д имела весьма положительный эффект на процессы морфогенеза, за исключением регенерации *in vitro*, практически у всех сортов. Также проведенный в данной работе анализ морфогенетической и регенерационной способности позволил выделить сорта озимой пшеницы 'Фишт' и яровой пшеницы 'Сигма', которые обладают достаточно высоким потенциалом, необходимым для генно-инженерных манипуляций. Необходимо подчеркнуть, что такого рода анализ для сорта 'Сигма' был проведен впервые. Для остальных сортов ('Таня', 'Память' и 'Саратовская 55') требуется дальнейший подбор условий для эффективного каллусогенеза и регенерации.

Анализ литературных данных и проведенное нами исследование показывают, что поиск путей активации морфогенеза пшеницы путем дальнейшего подбора гормонов, питательных сред и абиотических факторов всегда остается актуальной задачей, от решения которой зависит результативность генно-инженерных работ. Несмотря на то что морфогенный потенциал незрелых зародышей выше чем у зрелых зародышей, тем не менее применение последних является перспективным, ввиду возможности их круглогодичного использования. Таким образом, дальнейший скрининг генотипов, создание новых и оптимизация уже существующих методик индукции каллуса и получения регенерантов у мягкой пшеницы открывает более широкие возможности для исследователей, преследующих разнообразные фундаментальные и прикладные цели.

References / Литература

- Adero M.O., Syombua E.D., Asanda L.K., Amugune N.O., Mulanda E.S., Macharia G. Somatic embryogenesis and regeneration of Kenyan wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes from mature embryo explants. *African Journal of Biotechnology*. 2019;18(27):689-694. DOI: 10.5897/AJB2019.16890
- Ashraf A., Amhed N., Shahid M., Zahra T., Ali Z., Hussain A. et al. Effect of different media compositions of 2, 4-d, dicamba, and picloram on callus induction in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biological and Clinical Sciences Research Journal*. 2022;2022(1):159. DOI: 10.54112/bcsrj.v2022i1.159
- Aydin M., Tosun M., Haliloglu K. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(70):15749-15755. DOI: 10.5897/AJB11.1495
- Barro F., Martin A., Lazzeri P.A., Barcel Barceló P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*. 1999;108:161-167. DOI: 10.1023/A:1003676830857
- Bartók T., Sági F. A new endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990;22:37-41. DOI: 10.1007/BF00043696
- Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61:107-113. DOI: 10.1023/A:1006464208686
- Chopra A., Goyal S., Singhal P., Gupta M., Singh R., Sharma A.K., Sharma P. An optimized protocol for seed sterilization and shoot regeneration from mature embryo in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. HD2967. *Letters in Applied NanoBioScience*. 2022;12(4):129. DOI: 10.33263/LIANBS124.129
- Delporte F., Mostade O., Jacquemin J.M. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001;67(1):73-80. DOI: 10.1023/A:1011697316212
- Filippov M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;84(2):213-222. DOI: 10.1007/s11240-005-9026-6
- Hafeez I., Sadia B., Sadaqat N.A., Kainth R.A., Iqbal M.Z., Khan I.A. Establishment of efficient *in vitro* culture protocol for wheat land races of Pakistan. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(11):2782-2790. DOI: 10.5897/AJB11.2126
- Kanbar O.Z., Lantos C., Kiss E., Pauk J. Efficient *in vitro* anther culture for androgenic plant production in F3-6 winter wheat (*Triticum aestivum* L.) bulk combinations. *Indian Journal of Biotechnology*. 2022;20(3):284-293.
- Kyriienko A.V., Shcherbak N.L., Kuchuk M.V., Parii M.F., Symonenko Y.V. *In vitro* plant regeneration from mature embryos of amphidiploid spelt *Triticum spelta* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 2021;57(6):856-863. DOI: 10.1007/s11627-021-10158-4
- Marcinska I., Biesaga-Koscielniak J., Dubert F. Effect of vernalization conditions on growth and differentiation of callus from immature embryos and on generative development of regenerated plants of winter wheat. *Acta Physiologiae Plantarum*. 1996;18(1):67-74.
- McHughen A. Rapid regeneration of wheat *in vitro*. *Annals of Botany*. 1983;51(6):851-853.
- Miroshnichenko D.N., Poroshin G.N., Dolgov S.V. Genetic transformation of wheat using mature seed tissues. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(8):767-775. DOI: 10.1134/S0003683811080096
- Miroshnichenko D.N., Sokolov R.N., Alikina O.V., Dolgov S.V. Comparative analysis of tissue culture efficiency of di-, tetra- and hexaploid wheat breeds and species. *Russian Journal of Biotechnology*. 2014;(1):38-51.
- Orshinsky B.R., Sadasivaiah R.S. Effect of plant growth conditions, plating density, and genotype on the anther culture response of soft white spring wheat hybrids.

- Plant Cell Reports*. 1997;16(11):758-762. DOI: 10.1007/s002990050315
- Poddar S., Tanaka J., Running K.L.D., Kariyawasam G.K., Faris J.D., Friesen T.L. et al. Optimization of highly efficient exogenous-DNA-free Cas9-ribonucleoprotein mediated gene editing in disease susceptibility loci in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:1084700. DOI: 10.3389/fpls.2022.108470013
- Repellin A., Båga M., Jauhar P.P., Chibbar R.N. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: New challenges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001;64(2):159-183. DOI: 10.1023/A:1010633510352
- Sparks C.A., Jones H.D. Biolistics transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology*. 2009;478:71-92. DOI: 10.1007/978-1-59745-379-0_4
- Stober A., Hesse D. Spike pretreatments, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*. 1997;116(5):443-447. DOI: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb01028.x
- Stupko V.Yu., Zobova N.V., Surin N.A. Selecting conditions to develop stress resistant forms of spring soft wheat *in vitro*. *Siberian Herald of Agricultural Science*. 2008;6(186):20-26. [in Russian] (Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сурин Н.А. Подбор условий для создания в культуре *in vitro* стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2008;6(186):20-26).
- Wernicke W., Brettell R. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature*. 1980;287(5778):138-139. DOI: 10.1038/287138a0
- Yin G.X., Wang Y.L., She M.Y., Du L.P., Xu H.J., Ma J.X. et al. Establishment of a highly efficient regeneration system for the mature embryo culture of wheat. *Agricultural Sciences in China*. 2011;10(1):9-17. DOI: 10.1016/S1671-2927(11)60302-7
- Zamora A.B., Scott K.J. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. *Plant Science Letters*. 1983;29(2-3):183-189. DOI: 10.1016/0304-4211(83)90142-6

Информация об авторах

Гульнар Рафиловна Гумерова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, gulnar.yas@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2789-174X>

Айзиля Айтугановна Галимова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, aiz.galimova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7068-3359>

Буллат Разяпович Кулуев, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Information about the authors

Gulnar R. Gumerova, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, gulnaryas@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2789-174X>

Ayzilya A. Galimova, Cand. Sci., (Biology), Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, aiz.galimova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7068-3359>

Bulat R. Kuluev, Dr. Sci. (Biology), Professor, Leading Researcher, Head of a Laboratory, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, Leading Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 22.11.2022; одобрена после рецензирования 06.03.2023; принята к публикации 01.06.2023. The article was submitted on 22.11.2022; approved after reviewing on 06.03.2023; accepted for publication on 01.06.2023.