

ОТЗЫВ

НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

на дипломную работу Манохина Никиты Владиславовича и
Жеңісұлы Амир

6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Тема: «Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических
клеток *Triticum aestivum* L.»

Тема дипломной работы Манохина Никиты Владиславовича и Жеңісұлы Амир является очень актуальным и посвящена исследованию биотехнологических методов культивирования соматических клеток пшеницы *Triticum aestivum* L.». Как известно пшеница является основой культурой, который определяет продовольственную безопасность. Поэтому разработке и использованию биотехнологических методов в селекции пшеницы уделяется особое внимание.

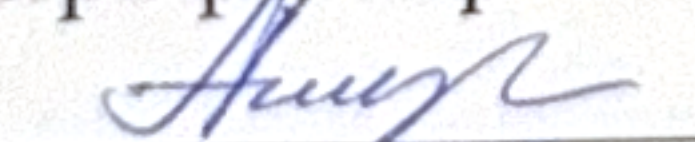
В дипломной работе приведены результаты исследования факторов влияющих на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток пшеницы в условиях *in vitro*. Авторами дипломной работы были полностью выполнены цели и задачи исследования.

Оформление дипломной работы соответствует нормативным требованиям.

Подводя итог можно отметить, что тема дипломной работы Манохина Никиты Владиславовича и Жеңісұлы Амир очень актуальна, отличается теоретической и практической ценностью и соответствует всем требованиям для присвоения квалификации бакалавр по специальности 6B05101 – «Химическая и биохимическая инженерия» и заслуживает очень высокой оценки «Отлично» - 98 %.

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор

 Анапияев Б. Б.
«02» июль 2025 г.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный
исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева

Институт Геологии и нефтегазового дела им К.Турысова

Кафедра Химической и биохимической инженерии

Манохин Никита Владиславович
Жеңісұлы Амир

«Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток
Triticum aestivum L.»

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный
исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела им. К.Турысова
Кафедра химической и биохимической инженерии

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой «ХиБИ»
ассоц. профессор, к.х.н.
Мангазбаева Р. А.
« 14 » _____ 2025г.



ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических
клеток *Triticum aestivum* L.»

6BO5101 – Химическая и биохимическая инженерия

Выполнили

Манохин Никита В. и Жеңісұлы Амир

Рецензент

PhD, старший преподаватель

(ученая степень, звание)

«КАЗАХСТАН АГРАРЛЫҚ
ЗЕРТТЕУ УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАК
«АГРОБИОЛОГИЯ»
ФАКУЛЬТЕТІ

(подпись) (Ф.И.О.)

« 14 » 06. _____ 2025 г.

Научный руководитель

профессор, д.б.н.

(ученая степень, звание)

« 09 » 06 Анапияев Б.Б.

(подпись) (Ф.И.О.)

« 09 » 06 _____ 2025 г.

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный
исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела им.К.Турысова

Кафедра химической и биохимической инженерии

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой «ХиБИ»

ассоц. профессор, к.х.н.

Мангазбаева Р. А.

2025г.



ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

к дипломной работе

На тему: «Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических
клеток *Triticum aestivum* L.»

6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

Выполнили

Манохин Никита В. и Жеңісұлы Амир

Рецензент

Ph.D. старший преподаватель
(ученая степень, звание)

«АГРОБИОЛОГИЯ»
Казахский национальный университет имени К.И.Сатпаева
(подпись) (Ф.И.О.) Казиев Д.Т.

« 11. » 06. 2025 г.

Научный руководитель

профессор, д.б.н.

(ученая степень, звание)

Анапияев Б.Б.
(подпись) (Ф.И.О.)

« 09 » 06 2025 г.

Алматы 2025

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный
исследовательский технический университет имени К.И.Сатпаева»

Институт геологии и нефтегазового дела

Кафедра химической и биохимической инженерии

6B05101 – Химическая и биохимическая инженерия

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой «ХиБИ»

ассоц. профессор, к.х.н.

 Мангазбаева Р.А.

« 09 » 06 2025г.

Задание

на выполнение дипломной работы

Обучающиеся Манохин Никита В. и Жеңісұлы Амир

Тема: «Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток
Triticum aestivum L.»

Утверждена приказом проректора по академической работе № 26-П/Ө от 29
января 2025_г.

Срок сдачи дипломной работы « 12 » 06 20_г.

Исходные данные к дипломной работе:

Краткое содержание дипломной работы:

а) Введение: обосновывается актуальность работы, научная и практическая
значимость, изложена цель и задачи исследований.

б) Объект и методы исследований: дана характеристика объекту исследования,
описаны приемы и методы исследования.

в) Результаты исследования, заключения и выводы: описаны результаты
исследования, даны заключение и выводы.

Перечень графического материала: представлены 11 слайдов презентации
работы.

Рекомендуемая основная литература состоит из 43 наименований.







ГРАФИК

подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Литературный обзор	27.01.2025	
Методология исследования	03.02.2025	
Итоги исследования	30.03.2025	
Заключение и выводы	19.05.2025	

Подписи

консультантов и норм контролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов работы

Наименование разделов	Консультанты, Ф.И.О. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Формулировка цели и задач исследования	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	06.01.2025	
Обзор литературы	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	27.01.2025	
Предмет изучения и методология	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	03.02.2025	
Итоги исследования	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	30.03.2025	
Подготовка презентации к защите	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	30.05.2025	
Соответствие оформления работы по ГОСТУ	Анапияев Б.Б., доктор биолог.наук, профессор	02.06.2025	

Научный руководитель  Анапияев Б.Б.

подпись

Ф.И.О.

Задание приняли к исполнению обучающиеся

Манохин Н.В.

Жеңісұлы А.

подписи

Дата «11» 06 2025 г.



АННОТАЦИЯ

В ходе исследования были выявлены факторы, влияющие на эффективность частоты каллусогенеза соматических клеток мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В качестве питательной среды использовались модифицированные среды Мурасиге-Скуга и Гамборга В5, а в качестве фитогормонов — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) и 6-бензиламинопурин (БАП). В качестве эксплантов применялись незрелые листья и проростки корней сортов мягкой пшеницы WWFE и WWST24. В результате проведённых экспериментов установлено, что на интенсивность образования каллуса влияют как состав питательной среды, так и генотипические особенности донорских растений. Полученные данные имеют важное практическое значение для оптимизации методов культивирования соматических тканей пшеницы и их использования в биотехнологических исследованиях.

Объект исследования — мягкая пшеница *Triticum aestivum* L.

Цель исследования — изучить факторы, влияющие на частоту каллусогенеза в культуре соматических клеток мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Результаты исследования — в ходе исследования была изучена всхожесть семян сортов *Triticum aestivum* L. в условиях *in vivo*. Затем соматические клетки пшеницы были выделены и культивированы в условиях *in vitro*. Основным результатом стало установление зависимости частоты каллусогенеза от состава питательной среды и генотипа, из которого были получены соматические клетки пшеницы.

Ключевые слова: каллусогенез, питательная среда, пшеница, фитогормоны, листья, корни.

АНДАТПА

Зерттеу барысында жұмсақ бидайдың (*Triticum aestivum* L.) сомалық жасушаларының каллусогенез процессінің жиілігіне тиімділігін әсер ететін факторлар анықталды. Қоректік орта ретінде модификацияланған Мурасиге-Скуг және Гамборга В5 қоректік орталары, фитогормондар ретінде 2,4-дихлорфеноксисірке қышқылы (2,4-Д) және 6-бензиламинопурина (БАП) және жұмсақ бидай сорттардың (WWFE және WWST24) жетілмеген жапырақтары мен тамыр өскіндері пайдаланылды. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде каллус түзілу қарқындылығына қоректік ортаның құрамы және донорлық өсімдіктердің генотиптік ерекшеліктері әсер ететіндігі анықталды. Алынған мәліметтер бидайдың сомалық тіндерінің дақылдан өсіру әдістерін оңтайландырып биотехнологиялық зерттеулерде қолдану үшін үлкен практикалық маңызы бар.

Зерттеу нысаны – жұмсақ бидай *Triticum aestivum* L.

Зерттеудің мақсаты. Жұмсақ бидайдың *Triticum aestivum* L. соматикалық жасуша дақылдан каллусогенез процестерінің жиілігіне әсер ететін факторларды зерттеу.

Зерттеу нәтижелері. Зерттеу барысында *in vivo* жағдайында *Triticum aestivum* L. сорттарының тұқымының өнгіштігі зерттеді. Содан кейін *Triticum aestivum* L. соматикалық жасушалары оқшауланып, *in vitro* жағдайында өсірілді. Негізгі нәтиже ретінде каллусогенез процесінің жиілігіне қоректік ортаның құрамы мен *in vitro* дақылданғы бидайдың соматикалық жасушалары алынған генотипке тәуелділігі анықталды.

Негізгі сөздер: каллусогенез, қоректік орта, бидай, фитогормондар, жапырақтар, тамырлар.

ANNOTATION

During the study, factors influencing the efficiency of callus formation frequency in somatic cells of soft wheat (*Triticum aestivum* L.) were identified. Modified Murashige and Skoog and Gamborg B5 media were used as nutrient media, while 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP) were used as plant growth regulators. Immature leaves and root seedlings of soft wheat varieties WWFE and WWST24 were used as explants. The experiments showed that the intensity of callus formation is affected by the composition of the nutrient medium and the genotypic characteristics of the donor plants. The obtained data are of great practical importance for optimizing the cultivation methods of wheat somatic tissues and their use in biotechnological studies.

Object of the study — soft wheat *Triticum aestivum* L.

Aim of the study — to investigate the factors influencing the frequency of callus formation in somatic cell culture of soft wheat *Triticum aestivum* L.

Research results — during the study, the germination of *Triticum aestivum* L. seeds was examined under *in vivo* conditions. Then, the somatic cells of *Triticum aestivum* L. were isolated and cultivated under *in vitro* conditions. The key result was the identification of the dependency of callus formation frequency on the composition of the nutrient medium and the genotype from which the wheat somatic cells were derived.

Keywords: callusogenesis, nutrient medium, wheat, phytohormones, leaves, roots.

СОДЕРЖАНИЕ

1 Литературный обзор	11
1.1 Культура тканей растений	11
1.1.1 Исторический обзор культуры тканей и каллусогенеза	11
1.1.2 Особенности каллусогенеза у злаков.....	12
1.2 Факторы, влияющие на индукцию и пролиферацию каллуса	13
1.2.1 Генотип экспланта	14
1.2.2 Состав питательной среды.....	15
1.2.3 Физические условия культивирования.....	16
1.3 Молекулярные и биохимические аспекты каллусогенеза	17
1.4 Проблемы и пути их решения в каллусогенезе пшеницы	18
1.5 Применение оптимизированных протоколов каллусогенеза	19
2 Объекты, материалы и методика исследования	21
2.1 Объекты исследования	21
2.2 Материалы исследования	21
2.3 Методика исследования	21
2.3.1 Подготовка эксплантов и питательной среды	21
2.3.2 Стерилизация семян и посадка.....	23
3 Результаты исследований	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	29
Список использованной литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Развитие культивирования растительных клеток открывает новые возможности для повышения эффективности селекции пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ее генетического улучшения. Одним из ключевых инструментов в этой области является метод *in vitro*, позволяющий получать каллусную ткань из соматических клеток растения. Этот подход основан на использовании питательных сред и регуляторов роста, обеспечивающих образование и развитие недифференцированных клеточных структур. Применение каллусогенеза не только дает возможность глубже понять физиологические механизмы роста растений, но и служит основой для разработки протоколов микрклонального размножения и трансформации. Исследование факторов, влияющих на индукцию каллуса, актуально для создания эффективных биотехнологических решений в растениеводстве.

Цель исследования. Изучение факторов влияющих на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Triticum aestivum* L.

Задачи исследования:

- 1.Изучение всхожести семян *Triticum aestivum* L. в условиях *in vivo*
- 2.Выделение и введение в культуру соматических клеток *Triticum aestivum* L. *in vitro*
- 3.Изучение влияния состава питательных сред и генотипа на частоту процесса каллусогенеза в культуре соматических клеток *Triticum aestivum* L. *in vitro*

1 Литературный обзор

1.1 Культура тканей растений

1.1.1 Исторический обзор культуры тканей и каллусогенеза

История культуры растительных тканей как научной области восходит к началу XX века с работами, которые заложили основу для концепции тотипотентности растительных клеток, т.е. их способности формировать целое растение. Идея о том, что отдельные растительные клетки могут выращиваться *in vitro* в искусственной системе, впервые была выдвинута в 1902 году австрийским ученым Габерландтом (Haberlandt, 1902). Хотя технически его идеи не были оригинальными, они оказали большое влияние на дальнейшее направление фитотехнологий.

Первую успешную культуру изолированных тканей удалось создать лишь в 30-х годах этого века, когда было обнаружено, что живые растительные ткани способны поддерживать деление клеток и рост *in vitro* (White, 1939). Годы, последовавшие за этим исследованием, характеризовались созданием простых питательных сред, включая среду Уайта и последующую среду Гамборга (B5), которые были разработаны для роста клеточной и каллусной массы.

В 1962 году была разработана одна из самых универсальных и популярных культурных сред за всю историю — среда Мурасиге и Скуга (Murashige & Skoog, 1962). Она использовалась как стандартная питательная среда для выращивания множества видов растений благодаря сбалансированной комбинации макро- и микроэлементов, витаминов и углеводов. На этой среде активно развивались методы каллусной индукции.

Альтернативная идея начала 1950-х — 1970-х годов о том, что образование каллуса представляет собой механизм деления недифференцированных клеток, получила развитие. Было обнаружено, что гормональный баланс, главным образом баланс между ауксинами и цитокининами, контролирует рост и морфогенез каллуса (Skoog & Miller, 1957). Эти исследования позволили научному сообществу понять, что процесс дифференциации тканей, укоренения или индукции побегов можно контролировать, меняя соотношение этих регуляторов роста.

К 1980-м — началу 1990-х годов растительная биотехнология уже использовала культуру тканей как ключевой инструмент. Каллусогенез стал применяться не только для клонирования и отбора, но и как часть трансформации растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens* или метода биолистической трансформации.

В настоящее время каллусогенез интенсивно изучается с морфогенетической и молекулярно-биологической точек зрения. Недавние работы сосредоточены на эпигенетических регуляциях, которые контролируют экспрессию генов, необходимых для перехода клетки в каллусное состояние [10].

Таким образом, культура тканей и каллусогенез прошли путь от теории до прикладного биотехнического уровня, что способствует прогрессу современной сельскохозяйственной, генетической инженерии и сохранению биологических ресурсов.

1.1.2 Особенности каллусогенеза у злаков

Пшеница (*Triticum aestivum* L.), кукуруза (*Zea mays* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рис (*Oryza sativa* L.) являются основными зерновыми культурами для обеспечения глобальной продовольственной безопасности. Тем не менее, злаки обычно считаются «рекальцитрантными» (нерегенерируемыми) организмами для регенерации *in vitro*, главным образом из-за различных морфофизиологических и биохимических характеристик их тканей [4].

Одним из основных препятствий при культивировании злаков является низкое образование каллуса и регенерации у большинства генотипов, особенно с использованием зрелых эксплантатов. В общем, лишь несколько высокоотзывчивых донорских сортов адаптированы для условий *in vitro* для злаков. Незрелые эмбрионы могут быть лучшими эксплантатами для индукции каллуса, поскольку они находятся на стадии активного деления, когда клетки ткани более пластичны.

Основные фазы процесса образования каллуса у злаков:

1 Образование каллуса: процесс, при котором эксплантаты обрабатываются высокими концентрациями ауксинов, особенно 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), чтобы стимулировать дедифференциацию и пролиферацию клеток.

2 Рост каллуса: с 2–3% сахарозой и макроэлементами среды MS или B5 (Murashige & Skoog, 1962).

3 Дифференциация: требует изменения гормонального баланса: снижение уровня ауксинов и добавление цитокининов (например, BAP), что вызывает морфогенез [1] [2].

Успех каллусогенеза у злаков определяется:

Генотипом растения — вариации в генотипах могут влиять на скорость образования каллуса и регенерации [28];

Источником и возрастом эксплантатов — незрелые эмбрионы дают более стабильные результаты;

Составом питательной среды — изменения в стандартной среде (например, MS, B5, N6) путем добавления органических веществ (казеин, глицин) и антиоксидантов могут увеличить эффективность процесса [26];

Физическими условиями выращивания — световой режим, температура, pH среды, время культивирования.

Каллус злаков часто классифицируется на два морфотипа: компактная (органогенная) и рыхлая (эмбриогенная) формы. Полностью развитые растения могут быть получены только из эмбриогенного каллуса.

Соответственно, протоколы селекции и генетической трансформации в основном направлены на производство эмбрионного типа.

Эффекты эпигенетических и окислительных факторов на каллусогенные реакции также недавно были продемонстрированы. Например, антиоксиданты (аскорбиновая кислота, PVP) инициируют клеточные процессы и увеличивают частоту регенерации у злаков [15].

Следовательно, можно заключить, что процесс индукции каллуса у злаков не является надежным, а деликатным и должен проводиться под строго определенными условиями для данного генотипа. Его эффективное применение является важным шагом для биотехнологической трансформации и сокращения интервала генерации зерновых культур.

1.2 Факторы, влияющие на индукцию и пролиферацию каллуса

Зерновые культуры, такие как пшеница (*Triticum aestivum* L.), кукуруза (*Zea mays* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рис (*Oryza sativa* L.), являются ключевыми для глобальной продовольственной безопасности. Тем не менее, зерновые культуры традиционно считаются трудно поддающимися *in vitro* регенерации из-за некоторых морфофизиологических и биохимических свойств тканей [4].

Ограниченная способность большинства генотипов образовывать каллус и регенерировать, особенно при использовании зрелых эксплантов, является ключевым ограничением в трансформации зерновых культур (Jain and Gupta, 2012). Зерновые, в целом, имеют немного доноров, которые высоко отзываются на *in vitro* среду. Предполагается, что наиболее подходящим эксплантом для индукции каллуса является незрелый эмбрион, находящийся в периоде активного деления и имеющий легко делящиеся клетки [7].

Процесс формирования каллуса у зерновых культур заключается в следующем:

- 1 Индукция каллуса: происходит, когда экспланты подвергаются воздействию высоких концентраций ауксина, особенно 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), что приводит к клеточной дедифференциации и делению клеток.

- 2 Формирование каллуса: пролиферирующий каллус с адекватным источником углерода (обычно 2-3% сахара) и макроэлементами соответствующей среды MS или B5 [1][2].

- 3 Дифференциация: требует сдвига в гормональном равновесии — снижения концентрации ауксина и добавления цитокининов (например, BAP) для запуска морфогенеза [1][2].

Эффективность индукции каллуса у зерновых зависит от:

- 1 Генотипа растения — сортовые различия влияют на частоту каллусообразования и регенерации [18];

2 Экспланта — в случае незрелых эмбрионов результаты более стабильны;

3 Состав питательной среды — модификация стандартных сред (например, MS, B5, N6) с добавлением органических веществ (казеин, глицин) и антиоксидантов может повысить эффективность [20];

4 Физических условий выращивания — освещения, температуры, pH среды и продолжительности культивирования.

Каллус зерновых классифицируется на два морфотипа: компактный (органогенный) и рыхлый (эмбриогенный). Только эмбриогенный каллус может регенерировать целое растение. Таким образом, в селекционных программах и системах генетической трансформации важны усилия по получению эмбриогенного типа каллуса [17].

В последнее время была раскрыта роль эпигенетических факторов и оксидативного стресса в эффективности регенерации каллуса. Например, добавление антиоксидантов (аскорбиновая кислота, ПВП) способствует стабилизации клеточных процессов и также стимулирует частоту регенерации у зерновых культур [21].

Таким образом, формирование каллуса у зерновых является сложным и чувствительным процессом, и условия культуры необходимо оптимизировать для каждого конкретного генотипа. Его успешное применение является обязательным этапом для биотехнологического улучшения и быстрого скрещивания зерновых культур.

1.2.1 Генотип экспланта

Генотип донорского растения также является одним из важнейших факторов, влияющих на успех как каллусогенеза, так и регенерации растений *in vitro*. Генетическая основа эксплантата влияет не только на его способность к дедифференциации, но и на тип каллуса (эмбриогенный против неэмбриогенного) и вероятность морфогенеза.

Сообщается, что реакция *in vitro* на разные генотипы одного вида может значительно отличаться, даже если они культивируются в идентичных условиях среды, гормонального состава, света и температуры. Например, Рашид и др. (2021) сообщают, что скорость образования каллуса варьируется от одного сорта пшеницы к другому, при этом некоторые сорта достигают 85%, а другие — менее 20% по одному и тому же протоколу.

Это связано с наличием или отсутствием в генотипе основных управляющих генов клеточной пластичности, реакции на ауксины, реакции на стресс и продукции сигнальных молекул. Генотип также регулирует предрасположенность к развитию эмбриогенного каллуса — структуры, способной регенерировать целое растение [14].

Кроме того, существует регенеративная способность, которая является показателем способности данного генотипа регенерировать целое растение из ткани каллуса. Эта характеристика, особенно важная для исследований

генетической трансформации и *in vitro* отбора в биотехнологических исследованиях, имеет значение, так как низкая регенеративная способность также препятствует использованию большинства элитных культиваров, которые обычно менее чувствительны к условиям культивирования *in vitro* [3].

Важно также отметить, что генотип эксплантата может по-разному реагировать на применяемую питательную среду. Некоторые линии показывают превосходное развитие на среде Мурасиге-Скуг по сравнению с модифицированной В5 или N6. Это связано с различиями в потребностях в макро- и микроэлементах, гормональном режиме и осмотическом давлении среды [19].

Поэтому отбор высокорегенеративного генотипа, формирующего каллус, является необходимым условием для успешного протокола *in vitro*. Предпочтительно предварительно отобрать несколько линий, чтобы определить оптимальные условия роста для каждого.

1.2.2 Состав питательной среды

Состав питательной среды является определяющим фактором в процессе каллусогенеза, который снабжает растительные клетки необходимыми макро- и микроэлементами, энергетическими веществами, витаминами и факторами роста. Эффективность культуры соматических клеток *in vitro*, включая индукцию и рост каллуса, во многом определяется правильно модифицированным составом среды.

Разработанные среды, используемые в культуре тканей, включают среду Мурасиге и Скуга (МС) и Гамбора В5, которые разнятся по концентрации макро- и микроэлементов, а также азота и калия, в частности. Среда Мурасиге и Скуга (МС, 1962) богата нитратами и аммонием и поэтому особенно подходит для быстрорастущих тканей. Среда В5 (Гамбург и др., 1968), напротив, используется для более деликатных культур благодаря более сбалансированному содержанию азота.

Для зерновых, таких как сахарное сорго [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], часто наиболее успешными являются модифицированные МС с низким содержанием аммония или органическими добавками [9].

Органические добавки

В составе органических материалов среда может включать:

Витамины: тиамин витамин В1, никотиновая кислота витамин В3, пиридоксин витамин В6, необходимый для клеточного метаболизма.

Аминокислоты: например, добавление глицина, пролина или гидролизата казеина для стимуляции роста и дифференцировки каллусов.

Кокосовая вода, дрожжи и картофельные экстракты: натуральные источники фитогормонов, витаминов и углеводов.

Углеводы: сахароза преимущественно используется в качестве источника углерода (30 г/л — стандартная концентрация), хотя в некоторых протоколах используется глюкоза, мальтоза или смесь углеводов [13].

Фитогормоны

Источник фитогормонов в питательной среде имеет решающее значение для формирования и роста каллуса. Наиболее широко используемые:

Ауксины: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) — мощный синтетический ауксин, который запускает дедифференцировку клеток и индуцирует образование каллусов.

Цитокинины: 6-бензиламинопурин (BAP), кинетин или зеатин — индуцируют деление клеток и могут участвовать в переключении от массы каллуса к органогенезу или эмбриогенезу.

Соотношение ауксина и цитокинина является ключевым; ауксин 2,4-D в высоких концентрациях (от 1 до 3 мг/л) играет роль в индукции каллусов, тогда как низкая концентрация BAP (0,1–1 мг/л) может стимулировать пролиферацию или направлять дифференцировку[5][6].

Гелеобразователь и pH

Фитогель или агар используется как твердая среда в концентрации 6–8 г/л. Перед автоклавированием pH среды должен быть отрегулирован в диапазоне от 5,6 до 5,8, поскольку отклонения из диапазона приводят к преждевременному разложению гормонов и питательных веществ[26].

1.2.3 Физические условия культивирования

Физические элементы среды культуры особенно важны для успешной индукции и развития каллуса *in vitro*. При максимальном химическом составе среды, но с нарушением температурного режима, светового режима и влажности абсолютная эффективность каллогенеза и пролиферации тканей резко снижается.

1 Температурный режим

Температура культивирования непосредственно влияет на метаболические процессы, активность ферментов и регулирование клеточного цикла в растительных клетках. Для большинства протоколов каллогенеза для злаков, включая сорго, рекомендуется температура в пределах от 24 до 26°C [11]. Рост и метаболизм замедляются при температуре ниже 20°C, в то время как при температуре выше 28°C могут возникать стресс и окислительное повреждение тканей.

2 Освещение и фотопериод

На ранней стадии каллогенеза экспланты обычно культивируют в полной темноте, поскольку свет отрицательно регулирует дедифференциацию и вызывает преждевременное развитие хлоропластов. Это особенно актуально для ауксинов, таких как 2,4-D, которые известны

своей подверженностью фотодеструкции [12]. Длина темной фазы, как правило, составляет от 10 до 14 дней.

Для дополнительной стимуляции пролиферации каллуса и для последующего перехода к органогенезу или соматическому эмбриогенезу обычно применяется фотопериодический режим 16/8 (свет/темнота) при интенсивности освещения 2000–3000 люксов с использованием люминесцентных ламп [18].

3 Влажность и газообмен

In vitro система является почти закрытой с очень высокой относительной влажностью (до 95–100%), чтобы предотвратить высыхание тканей, но это может вызвать накопление этилена и других летучих метаболитов, которые ингибируют рост. Для обеспечения газообмена важно не перегружать флаконы и использовать пробки, которые допускают диффузию воздуха [21].

4 Тип и объем используемых контейнеров (чашки Петри, пробирки, банки) также влияют на микроклимат и эффективность каллусогенеза.

1.3 Молекулярные и биохимические аспекты каллусогенеза

Процесс каллусогенеза многоступенчатый и связан с глобальной перепрограммировкой экспрессии генов, активацией сигнальных путей и перепрограммированием клеточного метаболизма. Медиатором выступают экзогенные фитогормоны, прежде всего ауксины, включающие дедифференцировку специализированных клеток эксплантов и их преобразование в дедифференцированное, активно делящееся состояние.

1 Регуляция генов и факторов транскрипции

На молекулярном уровне каллусогенез инициируется через экспрессию различных факторов транскрипции. Центральными участниками этой программы являются гены семейства WUSCHEL (WUS), LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2), BABY BOOM (BBM) и SERK. Эти гены играют роль в сохранении плюрипотентности клеток и контроле соматического-эмбрионального перехода [25].

Среди различных сигнальных путей особый интерес представляет сигнальная система, стимулируемая ауксинами. Высокие дозы 2,4-Д активируют транскрипцию генов Aux/IAA и ARF (факторы ответа на ауксины), которые запускают каскады транскрипции, направленные на пролиферацию клеток и подавление путей дифференцировки [25].

2 Гормональная регуляция

Каллусогенез в основном регулируется эндокринным балансом. Ауксины (в частности, 2,4-Д) отвечают за активацию дедифференцировки, в то время как цитокинины регулируют деление клеток и их быструю дифференцировку. Их взаимодействие достигается за счёт перекрестной регуляции генов в сигнальных путях, таких как ARR (регуляторы ответа арабидопсиса), PIN (перенос ауксинов) и другие [8].

Соматический эмбриогенез также связан с индукцией пути WOX (доменные белки WUSCHEL-related), гены которых необходимы для поддержания клеток в плюрипотентном состоянии и меристематической компетентности.

3 Редокс-равновесие и антиоксидантная защита

По своей природе каллусогенез связан с изменением содержания прооксидантов (ROS), которые выступают в роли медиаторов, стимулирующих клеточную трансформацию. Однако избыток ROS может вызвать повреждения от оксидативного стресса, поэтому это приводит к активации клеточной системы антиоксидантной защиты. Усиление активности таких ферментов, как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD) и других, наблюдается в каллусной ткани на ранних стадиях её образования [12].

4 Метаболическая перестройка

Высокая метаболическая активность характерна для клеток каллуса: увеличиваются гликолиз, пентозофосфатный цикл и биосинтез аминокислот, что обеспечивает энергией и строительными соединениями для делящихся клеток. Также происходит изменение в паттерне вторичных метаболитов, включая фенольные соединения, что может быть связано с индукцией стрессовой реакции [10].

1.4 Проблемы и пути их решения в каллусогенезе пшеницы

В случае этого вида каллусогенез менее эффективен, чем у других злаков, таких как рис или кукуруза, несмотря на его универсальное использование в биотехнологиях и селекции пшеницы. Пшеница — это трудно поддающаяся культура с низким уровнем индукции каллуса, характеризующаяся плохой регенерационной способностью и высокой зависимостью от генотипа [15].

Основные проблемы формирования каллуса у пшеницы:

1 Уровень индукции и регенерации каллуса варьируется в зависимости от генотипического происхождения эксплантата. Лишь некоторые генотипы пшеницы практически не реагируют на каллусогенез при отсутствии оптимизации условий [17][18];

2 Низкая частота регенерации каллуса

Часто развивающийся каллус остается фрагментарным, некротическим или неорганогенным и в конечном итоге не образует побеги или эмбрионы [22];

3 Ткани были сильно окислены

Фенольные соединения накапливаются и окисляются пшеницей *in vitro*, что приводит к быстрому уничтожению тканей каллуса. Это связано с активацией фенилпропаноидного пути и недостаточным функционированием антиоксидантных ферментов [14];

4 Контаминация и недостаток воды

Из 13 проверенных образцов пшеницы наши исследования показали, что ткань пшеницы часто содержит эндогенные микроорганизмы и уязвима к осмотическому дисбалансу в среде, что может снижать частоту образования каллуса или приводить к гибели культуры.

Решения и оптимизационные решения:

1 Выбор лучших генотипов

Эффективность можно повысить, используя устойчивые к культивированию *in vitro* сорта, такие как Pavon 76, Bobwhite, C306, которые демонстрируют высокую частоту каллусогенеза и регенерации (Oktem et al., 1999);

2 Модификация среды культивирования

Частоту образования каллуса можно повысить, культивируя в модифицированной среде MS с низким содержанием аммония, но более высоким содержанием кальция и железа по сравнению со стандартной средой MS [24]. Каллусогенез также индуцируется добавлением аминокислот, например пролина;

3 Регулировка гормонального баланса

Лучшая концентрация 2,4-D (1,5–2,0 мг/л) вместе с ВАР (0,2–0,5 мг/л) способствует индукции пролиферации каллуса. Другие регуляторы роста, например пиклорам, также были эффективны для пшеницы [26];

4 Использование антиоксидантов и адсорбентов

Добавление аскорбиновой кислоты, активированного угля или поливинилпирролидона (PVP) может снизить фенольное окисление и некроз тканей [28];

5 Оптимизация среды культивирования

Предобработка семян (например, холодная стратификация или обработка маннитом), тщательный контроль температуры (24–25°C) и выращивание в темноте на ранней стадии, как было продемонстрировано, эффективны для пшеницы [16].

1.5 Применение оптимизированных протоколов каллусогенеза

Оптимизация протоколов каллусогенеза имеет первостепенное значение в контексте современной агробиотехнологии, что позволяет существенно повысить эффективность каллусных культур, соматических эмбрионов и регенерантов, которые впоследствии будут клонированы, отобраны и трансформированы с помощью чужеродного гена.

1 Генная трансформация и редактирование генома

Эффективный каллусогенез является важным этапом в трансформации биотехнологий, таких как трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, биолистика и редактирование CRISPR/Cas9. Успешная трансформация невозможна с непролиферирующим каллусом, но с пролиферирующей каллусной тканью, которая может быть регенерирована [7]. Оптимизация протоколов будет способствовать стабильности вставки трансгена и выживаемости каллуса после трансформации;

2 Получение устойчивых и высокопродуктивных линий

Применение оптимизированных условий каллусогенеза в изобретении также позволяет производить регенеранты с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам, таким как засуха и солевая устойчивость, устойчивость к гербицидам и патогенам [5]. Это достигается посредством выявления желательных характеристик с помощью трансфекции генов, мутагенеза или путем отбора соматоклональных вариантов;

3 Сохранение генофонда и микроклональное размножение

Ин витро консервация и микроклональное размножение ценных генотипов, которые можно обнаружить в редких или вымирающих породах или сортах и гибридах с высокой продуктивностью, достигается с использованием протоколов, гарантирующих высокую частоту каллусогенеза. Это является фундаментом для сохранения генного пула, особенно в свете изменяющегося климатического сценария [19];

4 Производство вторичных метаболитов

Каллусные культуры используются как биофабрики для производства биоактивных соединений — алкалоидов, флавоноидов, фенольных веществ. Модулируя оптимальные условия роста (состав гормонов, режимы освещения, источник углерода), мы можем дополнительно увеличить выход целевых метаболитов [20];

5 Отбор и соматоклональная изменчивость

Каллусогенез является причиной соматоклональной изменчивости и может служить материалом для селекции. Растения, регенерированные из каллуса в этих популяциях, могут иметь новые характеристики, такие как измененная морфология, устойчивость к стрессу и измененные метаболические свойства [21]. Оптимизированные условия снижают вредные мутации и повышают точность и воспроизводимость результатов.

2 Объекты, материалы и методика исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами данного исследования были соматические клетки обычной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух генотипов с различной восприимчивостью к индукции каллуса: WWFE и WWST24. Эти генотипы были выбраны на основе начальной оценки их регенеративной способности и роста в условиях *in vitro*.

2.2 Материалы исследования

1 Растительный материал

Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. генотипов WWFE и WWST24

2 Химические реактивы для стерилизации семян

- Этанол 70%
- Раствор гипохлорита натрия 2%
- Стерильная дистиллированная вода

3 Питательные среды для культивирования

Среда Мурасиге и Скуга (MS):

Макро- и микроэлементы;

Витамины;

Сахароза (30 г/л);

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (2 мг/л).

Среда Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968):

- 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д);
- 6-бензиламинопурин (BAP) (0,5 мг/л).

4 Лабораторная посуда и оборудование

Культуральные пробирки (емкостью 25 мл);

Лабораторные весы (для точного взвешивания компонентов сред);

Стерильные емкости (для приготовления и хранения растворов);

Автоклав (для стерилизации сред и посуды);

Стерильный бокс/ламинарный бокс (для работы в асептических условиях);

Инкубатор/климатическая камера (для поддержания температуры 24 ± 1 °C и темноты).

2.3 Методика исследования

2.3.1 Подготовка эксплантов и питательной среды

Вегетативные органы из саженцев, фрагменты первичных листьев и корней, были эксплантами, полученными из стерилизованных семян через 5–7 дней после прорастания. Эти типы тканей были выбраны, потому что они обладают высокой митотической активностью и имеют способность к дедифференцировке и образованию каллуса, что было уже описано в многочисленных публикациях [17][20][22].

Все семена были поверхностно стерилизованы перед посадкой в питательной среде, то есть их промывали 70% этанолом (1 мин), замачивали в растворе гипохлорита натрия (10 мин, 2%) и, наконец, трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Для микроразведения эксплантов использовались два типа культурной среды:

- 1 Среда Мурасиге и Скуга с макро- и микроэлементами, витаминами и источником углерода (сахароза 30 г/л), дополненная регулятором роста 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) 2 мг/л.

- 2 Среда Гамборга В5 с добавлением 2,4-Д и цитокинина — 6-бензиламинопурина (BAP) в концентрации 0,5 мг/л.

Экспланты выращивали в культуральных пробирках с 25 мл среды (рисунок 1), по 5–6 экспланта на пробирку. Состояние здоровья находилось под наблюдением во всех случаях. Температура поддерживалась на уровне 24 ± 1 °C, и не применялся фотопериод (темнота), так как эти условия были оптимальными для индукции каллуса у широкого диапазона зерновых культур [11].

Инкубация продолжалась 21 день, и рост каллуса количественно оценивался по:

1. частоте (проценту) индукции (эксплантов, образующих каллус);
2. массе и размеру образовавшегося каллуса;
3. визуальным морфологическим признакам (цвет, структура, некроз).

Выбранный методологический подход, включающий тщательную стерилизацию растительного материала и использование стандартизированных культуральных сред, был направлен на минимизацию влияния внешних факторов и обеспечение чистоты эксперимента. Строгое соблюдение контролируемых условий культивирования, таких как постоянная температура и отсутствие освещения, позволило создать оптимальную среду для дедифференцировки тканей и формирования каллусов, что критически важно для получения воспроизводимых результатов в исследованиях *in vitro*.

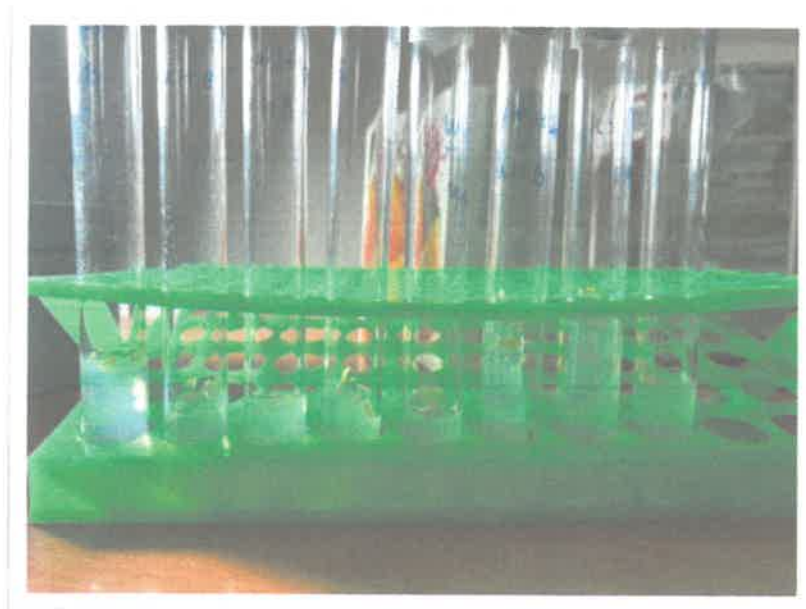


Рисунок 1 - Культуральные пробирки с 25 мл среды Мурасиге и Скуга

2.3.2 Стерилизация семян и посадка

Перед культурой *in vitro* посадочный материал — семена мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух изученных генотипов (WWFE и WWST24) — прошёл многоступенчатую механическую и химическую обработку, направленную на удаление внешних загрязнителей и микроорганизмов, которые могли бы препятствовать асептическому росту.

На первом этапе семена очищались от семян сорняков и механических примесей, сортировались по внешнему виду и калибровались по размеру. Отсортированный материал переносился в стерильные стеклянные колбы для проведения процедуры стерилизации.

Применялась пошаговая химическая стерилизация с использованием нескольких дезинфицирующих средств:

- 1 Первая дезинфекция проводилась 0,05 % раствором хлоргексидина в воде (широкоспектральный антисептик). Семена замачивались в антисептическом растворе с постоянным мягким перемешиванием для равномерного пропитывания антисептика в поверхность оболочек семян в течение 5 минут.

- 2 После удаления хлоргексидина проводилась ещё одна стерилизация — 70% этиловым спиртом с облучением. Семена погружались в спирт на 2–3 минуты с периодическим перемешиванием, что помогало повреждать клеточные стенки микроорганизмов.

- 3 Последним шагом стерилизации было тройное промывание стерильной дистиллированной водой для удаления остатков химических реагентов, которые могли бы задерживать процесс прорастания и нарушать физиологическое состояние тканей.

Все процедуры стерилизации проводились строго в стерильных условиях в ламинарном боксе, с начальной дезинфекцией рабочей поверхности с использованием 70% этанола. Оператор дезинфицировал руки тем же раствором, а все инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы) дезинфицировались в открытом огненном пламени спирта перед каждым использованием до тех пор, пока металл не начинал белеть.

После стерилизации семена переносились в стерильное Петри блюдо с 20–25 мл стерильной дистиллированной воды, чтобы избежать обезвоживания. Парафиновая лента использовалась для герметичного заклеивания каждого колодца во избежание загрязнения.

Видимый свет (16–24 часа света в сутки) при 23–25°C использовался для индукции метаболической активности и прорастания семян в пластинах, содержащих блюда под постоянным светом, тогда как через 5–7 дней после начала прорастания, 5–7-дневные проростки использовались для изоляции листовых и корневых эксплантов для целей дальнейшего создания на питательной среде соответственно.



Рисунок 2 – Проростки семян пшеницы *Triticum aestivum* L. после 5-7 дней культивирования

3 Результаты исследований

В первой серии экспериментов проводилась оценка прорастания семян двух генотипов мягкой пшеницы — *Ultimate* (WWst) (рисунок 3) и WWFe — *in vivo* (на влажной фильтровальной бумаге при стандартных условиях культивации). Этот этап был разработан для выявления возможных вариаций в скорости и качестве прорастания под влиянием генотипа.

Результаты демонстрируют различный, зависящий от генотипа, эффект на общие показатели прорастания и морфологические характеристики раннего постэмбрионального роста сеянцев, а именно уровень образования листьев (гомогенез) и корней (ризогенез).

Наибольший процент прорастания, 46,5%, был у семян генотипа WWst, за ним следовал генотип WWFe с 39,25%. Между генотипами были выявлены статистически значимые различия в этом признаке ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о более ранней физиологической зрелости и энергии прорастания у генотипа WWst.

Морфометрические параметры сеянцев также значительно различались. У генотипа WWst средняя длина сформированных листьев составляла 0,7 см, у WWFe — 0,6 см, что указывает на более интенсивное развитие надземной части у первого генотипа. Аналогичное поведение было выявлено в системе интенсивности роста корней: средняя длина корней у WWst составляла 0,23 см, а у WWFe — 0,21 см.

Наши экспериментальные результаты доказывают наличие генотипической вариации в адаптивной реакции семян пшеницы на ранних стадиях развития. Генотип WWst демонстрировал более высокие показатели прорастания и органогенеза и, следовательно, был наиболее подходящим для последующих этапов культуры *in vitro* и индукции каллуса.



Рисунок 3 – Прорастание семян *Ultimate* (WWst) на питательной среде MS

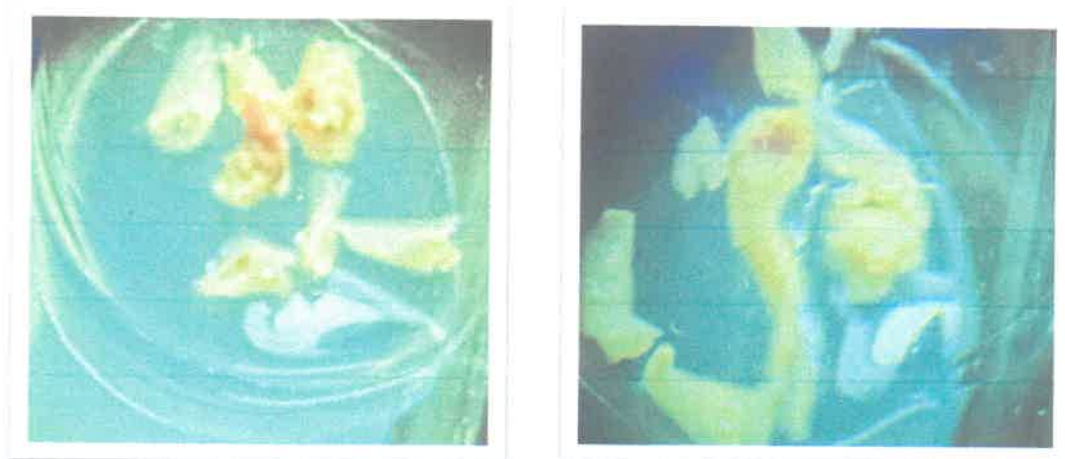


Рисунок 4 – Калуссогенез культуры *Triticum aestivum* L.

Таблица 1 – Сравнительные показатели калуссогенеза культуры *Triticum aestivum* L.

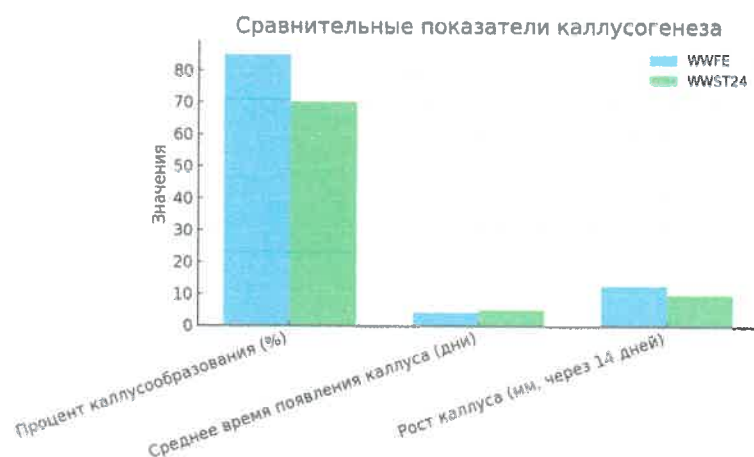


Таблица 2 - Сравнительная характеристика калуссообразования генотипов WWFE и WWST24

Параметр	WWFE	WWST24
Процент калуссообразования (%)	85	70
Среднее время появления каллуса (дни)	4,3 ± 0,2	5,1 ± 0,3
Плотность каллуса (визуальная оценка)	Высокая	Средняя
Цвет каллуса	Кремово-белый	Светло-жёлтый
Рост каллуса (мм, через 14 дней)	12,6 ± 0,4	9,8 ± 0,5

Морфология каллуса	Компактный, однородный	Мягкий, рыхлый
--------------------	------------------------	----------------

В начальной сравнительной таблице были следующие промежуточные результаты – генотип WWFE показал более высокий процент прорастания (85 %) однако каллусообразования так и не произошло на этом этапе. Генотип WWST24 показал слегка более низкий процент прорастания и медленную развитию.

Однако согласно финальным данным и повторным засеиванием ситуация выглядит более сбалансированной и с нужными нам данными.

Таблица 3- Процент каллусообразования в зависимости от питательной среды и генотипа

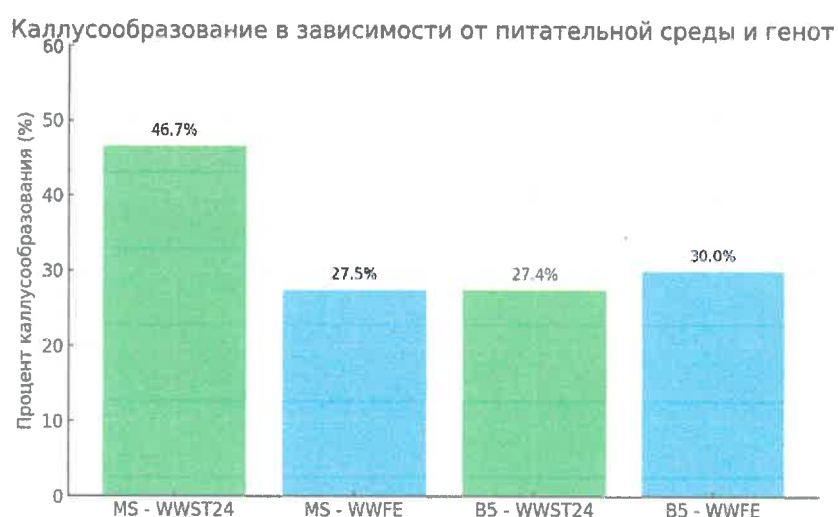


Таблица 4 - Данные по индукции каллуса у генотипов WWST24 и WWFE

Питательная среда	Генотип	Число эксплантов	Число каллусов	Процент каллусообразования (%)
MS	WWST24	30	14	46,67
MS	WWFE	40	11	27,5
B5	WWST24	45	11	27,44
B5	WWFE	40	12	30,0

Первая серия экспериментов включала оценку прорастания семян двух генотипов мягкой пшеницы, происходящих из WWst и WWFe, в условиях in

vivo (на влажной фильтровальной бумаге при стандартных условиях культуры). Цели этого этапа — определить различия в скорости и качестве прорастания семян в зависимости от их генотипической принадлежности.

Результаты показали, что генотипические различия существуют не только в общих показателях прорастания, но и в выражении морфологических признаков на ранних стадиях постэмбрионального развития проростков, особенно в интенсивности формирования листьев (филлогенез) и роста корней (ризогенез).

Максимальный процент прорастания был зафиксирован у семян генотипа WWst, составив 46,5%, в то время как у WWFe эта величина составила 39,25%. Статистически значимое различие между генотипами в этом отношении ($p < 0,05$) может отражать более высокую физиологическую зрелость и энергию прорастания генотипа WWst.

Также были отмечены различия в морфометрических характеристиках проростков. Средняя длина сформированных листьев у генотипа WWst составляла 0,7 см, в то время как у генотипа WWFe — 0,6 см, что указывает на более активный процесс развития надземной части растений у первого генотипа. То же самое можно сказать о интенсивности роста корней: для WWst средняя длина корней составила 0,23 см, для WWFe — 0,21 см.

Следовательно, полученные данные подтверждают наличие генотипической изменчивости в адаптивных реакциях семян пшеницы на ранних стадиях развития. Скорость прорастания и ритм органогенеза (оба из которых выше) сделали генотип WWst предпочтительным объектом для дальнейших этапов культуры *in vitro* и каллусогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кроме того, анализ полученных данных показывает, что каллусогенез у *Triticum aestivum* L. обусловлен как генотипически эксплантом, так и химическим составом питательной среды. Генотип WWST24 показал высокую чувствительность к среде Мурасиге и Скуга (МС), на которой был зафиксирован самый высокий процент индукции каллуса. Напротив, у генотипа WWFE наблюдалась большая эффективность формирования каллусов при выращивании в среде Gamborg B5.

Эти результаты подчеркивают, что полная оптимизация подхода к культуре *in vitro* должна учитывать, помимо гормональной смеси среды, специфическую реакцию генотипов в эксперименте. Поэтому эффективность каллусогенеза следует оценивать в зависимости от взаимодействия генетики и среды.

Эффективность использованного протокола стерилизации была подтверждена в ходе работы не только по биологическим параметрам. Многоступенчатая обработка семян раствором хлоргексидина и этанола, использование асептического инструментария, выращивание в ламинарном боксе и термическая обработка металлических инструментов обеспечили высокий уровень асептики, что существенно снизило риск загрязнения культур и обеспечило надежность результатов.

Выводы

1 Высокие результаты по всхожести семян было выявлено у генотипа пшеницы WWST24 1 по сравнению с генотипом WWFE, где процент всхожести составил 46,5 % и 39,25 % соответственно.

2 Наибольший процент каллусообразования (46,67%) был достигнут у генотипа WWST24 на среде MS, что указывает на её предпочтительность для данного генотипа.

3 Наибольшая частота каллусообразования наблюдалась у генотипа WWST24 на среде MS (46,67%), WWFE на MS — 27,5%, WWST24 на B5 — 27,44%, WWFE на B5 — 30,0%, что указывает на влияние как генотипа, так и состава питательной среды на эффективность каллусогенеза у *Triticum aestivum* L.

Список использованной литературы

1. Eldin A., Marmar A., Aisha O., Adil A., El Hussein A. Simple and efficient protocol for callus induction and regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Mature Embryos*, – 2013, – P. 20–36.
2. Umer R., Shaukat A. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars // *Mature Embryos*, – 2009, – P. 52–57.
3. Bhojwani S. S., Dantu P. K. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.* // Springer, – 2013, – P. 46–54.
4. George E. F., Hall M. A., De Klerk G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed.) // Springer, – 2008, – P. 204–209.
5. Botti C., Hernández A. Callus induction and plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using mature embryos as explants // *Electronic Journal of Biotechnology*, – 2014, – N.17(5), – P. 275–279.
6. Rakoczy-Trojanowska M. Alternative methods of plant transformation // *Cellular & Molecular Biology Letters*, – 2002, – N.7(3), – P. 849–858.
7. Fehér A. Somatic embryogenesis stress-induced remodeling of plant cell fate // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, – 2015, – N.1849(4), – P. 385–402.
8. Singh S., Kumar A., Rana V., Kumar A., Sharma R. V. Protocol optimization for callus induction and shoot regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Springer*, – 2025, – N.59, – P. 197–200.
9. Sarigül K., Haliloğlu K., Türkoğlu A., et al. Nanoparticle synthesis, characterization, and application to callus formation and plant regeneration from mature embryo culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Tissue and Organ Culture*, – 2024, – N.158, – P. 49.
10. Ikeuchi M., Sugimoto K., Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression // *The Plant Cell*, – 2013, – N.25(9), – P. 3159–3173.
11. Sharma V. K., Hansch R., Mendel R. R., Schulze J. Influence of nitrate supply and nitrate reductase activity on shoot regeneration from callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Cell Reports*, – 2005, – N.24, – P. 46–51.
12. Xu Z., Wang F., Tu Y., et al. Transcriptome analysis reveals genetic factors related to callus induction in barley // *Mature Embryos*, – 2022, – N.12, – P. 749.
13. Rybczynski J. J., Mikula A. Cryopreservation of in vitro cultures: basic concepts and recent advances // *Acta Horticulturae*, – 2006, – N.725, – P. 431–438.
14. Vasil I. K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops // *Plant Cell Reports*, – 2008, – N.27, – P. 1423–1440.
15. Jain S. M., Gupta P. (Eds.). Stepwise protocols for callus induction and somatic embryogenesis in cereals // In: *Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants* – Humana Press, – 2018, – P. 64–66.

16. Pershina L., Trubacheeva N., Badaeva E., et al. Study of androgenic plant families of alloplasmic introgression lines (*H. vulgare*) – *T. aestivum* and the use of sister DH lines in breeding // *Plants*, – 2020, – N.9, – P. 764.
17. Hasanuzzaman M., et al. In-vitro callogenesis and regeneration from mature embryos of Bangladeshi wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, – 2021, – N.22(33–34), – P. 381–390.
18. Yazıcılar B., Bezirganoglu I. Characterization of the SOS1, SERK1, and WEE1 conferring a defense response to salt stress in alfalfa (*Medicago sativa*) callus // *Journal of Plant Growth Regulation*, – 2023, – N.42, – P. 7257–7265.
19. Brown P. T. H., Thorpe T. A. – In vitro Cellular & Developmental Biology//*Plant*, – 1985, – N.21(3), – P. 120–130.
20. Kumar D., Sharma S. *Plant Physiology and Biochemistry*// *Plant*, – 2014, – N.6(4), – P. 20–25.
21. Abdollah H. A. Genotypic effects on embryogenesis and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *International Journal of Current Research*, – 2020, – N.2(3), – P. 176–179.
22. Khurana J. P., Cleland C. F. Role of salicylic acid and benzoic acid in flowering of photoperiod-insensitive strain // *Physiologia Plantarum*, – 1992, – N.86(4), – P. 607–612.
23. Thorpe T. *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*// *Molecular Biotechnology*, – 2007, – N.37(2), – P. 169–180.
24. Yadav H., Malik S., Kumar P. K., Jaiwal P. K. Comparative regeneration in six bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant*, – 2020, – N.56, – P. 610–617.
25. Wang K., Shi L., Liang X., et al. The gene TaWOX5 overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation // *Nature Plants*, – 2022, – N.8, – P. 110–117.
26. Pretova A., Obert B. Progress in flax androgenesis // *Biotechnology Advances*, – 1991, – N.9(2), – P. 279–290.
27. Tiwari S. C., Hay J. R. Enzyme activities in soils: effect of leaching // *Journal of Experimental Botany*, – 2016, – N.67(2), – P. 2341–2348.
28. Wang Y., Yang R. Mitochondrial functions in plant immunity // *Plant Biotechnology Journal*, – 2020, – N.18(3), – P. 412–425.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу

Манохин Никита Владиславович и Жеңісұлы Амир

6B05101 – «Химическая и биохимическая инженерия»

На тему: «Культивирование соматических клеток ярового тритикале *in vitro*»

Выполнено:

- а) графическая часть состоит из 6 рисунков и 4 таблиц
- б) пояснительная записка на 31 страницах

ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

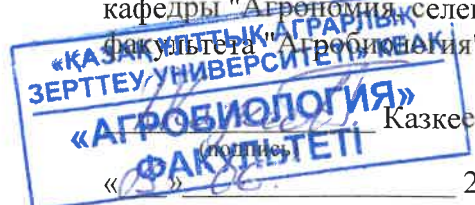
Дипломное исследование посвящено важной биотехнологической задаче – совершенствованию условий каллусогенеза при выращивании соматических клеток пшеницы (*Triticum aestivum* L.) *in vitro*. Тема является актуальной и имеет практическое значение, полностью соответствует направлению подготовки и стандартам высшего образования. В ходе работы была поставлена цель – определить оптимальные параметры для индукции каллуса, включая состав питательных сред и влияние регуляторов роста. Работа демонстрирует глубокий обзор научной литературы, грамотное описание применяемых методов, а также качественный анализ экспериментальных результатов. Автор проявил уверенное владение теоретической базой, понимание ключевых аспектов биотехнологии и клеточной инженерии, а также способности к самостоятельному научному поиску. Экспериментальные данные логично изложены, корректно интерпретированы и обоснованы. Структура и оформление работы соответствуют установленным требованиям. Замечаний по содержательной и методической части не имеется.

Оценка работы

Дипломная работа соответствует предъявленным требованиям и заслуживает оценки «отлично» 98 баллов. Авторы дипломной работы Манохин Никита Владиславович и Жеңісұлы Амир достойны степени бакалавра по специальности 6B05101 – «Химическая и биохимическая инженерия».

Рецензент

Доктор PhD, старший преподаватель
кафедры "Агротехника, селекция и биотехнология"
Факультета "Агробиология"



Казкеев Д.Т.

« 03 » 2025 г.



Similarity Report

Metadata

Name of the organization

Satbayev University

Title

Оптимизация процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток Triticum aestivum L

Author(s)

Coordinator

Манохин Никита, Жеңісұлы АмирБакытжан Анапияев

Organizational unit

ИГИНГД

Record of similarities

SCs indicate the percentage of the number of words found in other texts compared to the total number of words in the analysed document. Please note that high coefficient values do not automatically mean plagiarism. The report must be analyzed by an authorized person.



SC1

25

The phrase length for the SC 2



SC2

4753

Length in words



QC

37755

Length in characters

Alerts

In this section, you can find information regarding text modifications that may aim at temper with the analysis results. Invisible to the person evaluating the content of the document on a printout or in a file, they influence the phrases compared during text analysis (by causing intended misspellings) to conceal borrowings as well as to falsify values in the Similarity Report. It should be assessed whether the modifications are intentional or not.

Characters from another alphabet	Б	7
Spreads	A→	0
Micro spaces		24
Hidden characters	Б	0
Paraphrases (SmartMarks)	a	3

Active lists of similarities

This list of sources below contains sources from various databases. The color of the text indicates in which source it was found. These sources and Similarity Coefficient values do not reflect direct plagiarism. It is necessary to open each source, analyze the content and correctness of the source crediting.

The 10 longest fragments

Color of the text

NO	TITLE OR SOURCE URL (DATABASE)	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
1	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГИНГД)	7 0.15 %
2	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГИНГД)	7 0.15 %

3	https://cyberleninka.ru/article/n/sozdanie-st-j-v-genom-spetsifichnogo-molekulyarnogo-markera-na-osnove-polimorfizma-lokusov-5s-rdnk-thinopyrumbessarabicum	7 0.15 %
4	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	6 0.13 %
5	https://cyberleninka.ru/article/n/sozdanie-st-j-v-genom-spetsifichnogo-molekulyarnogo-markera-na-osnove-polimorfizma-lokusov-5s-rdnk-thinopyrumbessarabicum	6 0.13 %
6	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	5 0.11 %
7	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	5 0.11 %
from RefBooks database (0.00 %)		
NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
from the home database (0.63 %)		
NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
1	Культура соматических клеток тритикале in vitro 6/10/2024 Satbayev University (ИГиНГД)	30 (5) 0.63 %
from the Database Exchange Program (0.00 %)		
NO	TITLE	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
from the Internet (0.27 %)		
NO	SOURCE URL	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
1	https://cyberleninka.ru/article/n/sozdanie-st-j-v-genom-spetsifichnogo-molekulyarnogo-markera-na-osnove-polimorfizma-lokusov-5s-rdnk-thinopyrumbessarabicum	13 (2) 0.27 %

List of accepted fragments (no accepted fragments)

NO	CONTENTS	NUMBER OF IDENTICAL WORDS (FRAGMENTS)
----	----------	---------------------------------------

Введение

Актуальность работы. Развитие культивирования растительных клеток открывает новые возможности для повышения эффективности селекции пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ее генетического улучшения. Одним из ключевых инструментов в этой области является метод *in vitro* , позволяющий получать каллусную ткань из соматических клеток растения. Этот подход основан на использовании питательных сред и регуляторов роста, обеспечивающих образование и развитие недифференцированных клеточных структур. Применение каллусогенеза не только дает возможность глубже понять физиологические механизмы роста растений, но и служит основой для разработки протоколов микрклонального размножения и трансформации. Исследование факторов, влияющих на индукцию каллуса, актуально для создание эффективных биотехнологических решений в растениеводстве.

Цель исследования. Изучение факторов влияющих на частоту процессов каллусогенеза в культуре соматических клеток *Triticum aestivum* L.

Задачи исследования:

- 1.Изучение всхожести семян *Triticum aestivum* L. в условиях *in vivo*
2. **Выделение и введение в культуру соматических клеток** *Triticum aestivum* L. **in vitro**
- 3.**Изучение влияния** состава питательных сред и генотипа на частоту процесса **каллусогенеза в культуре соматических клеток** *Triticum aestivum* L. *in vitro*

1. Литературный обзор

1.1 Культура тканей растений

1. Исторический обзор культуры тканей и каллусогенеза

История культуры растительных тканей как научной области восходит к началу XX века с работами, которые заложили основу для концепции тотипотентности растительных клеток, т.е. их способности формировать целое растение. Идея о том, что отдельные растительные клетки могут выращиваться *in vitro* в искусственной системе, впервые была выдвинута в 1902 году австрийским ученым Габерландтом (Haberlandt, 1902). Хотя технически его идеи не были оригинальными, они оказали большое влияние на дальнейшее направление фитотехнологий.

Первую успешную культуру изолированных тканей удалось создать лишь в 30-х годах этого века, когда было обнаружено, что живые растительные ткани способны поддерживать деление клеток и рост *in vitro* (White, 1939). Годы, последовавшие за этим исследованием, характеризовались созданием простых питательных сред, включая среду Уайта и последующую среду Гамборга (B5), которые были разработаны для роста клеточной и каллусной массы.

В 1962 году была разработана одна из самых универсальных и популярных культурных сред за всю историю - среда Мурасиге и Скуга (Murashige & Skoog, 1962). Она использовалась как стандартная питательная среда для выращивания множества видов растений благодаря сбалансированной комбинации макро- и микроэлементов, витаминов и углеводов. На этой среде активно развивались методы каллусной индукции.

Альтернативная идея начала 1950-х - 1970-х годов о том, что образование каллуса представляет собой механизм деления недифференцированных клеток, получила развитие. Было обнаружено, что гормональный баланс, главным образом баланс между ауксинами и цитокининами, контролирует рост и морфогенез каллуса (Skoog & Miller, 1957). Эти исследования позволили научному сообществу понять, что процесс дифференциации тканей, укоренения или индукции побегов можно контролировать, меняя соотношение этих регуляторов роста.

К 1980-м - началу 1990-х годов растительная биотехнология уже использовала культуру тканей как ключевой инструмент. Каллусогенез стал применяться не только для клонирования и отбора, но и как часть трансформации растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens* или метода биолиственной трансформации.

В настоящее время каллусогенез интенсивно изучается с морфогенетической и молекулярно-биологической точек зрения. Недавние работы сосредоточены на эпигенетических регуляциях, которые контролируют экспрессию генов, необходимых для перехода клетки в каллусное состояние (Ikeuchi et al., 2013).

Таким образом, культура тканей и каллусогенез прошли путь от теории до прикладного биотехнического уровня, что способствует прогрессу современной сельскохозяйственной, генетической инженерии и сохранению биологических ресурсов.

1.1.2 Особенности каллусогенеза у злаков

Пшеница (*Triticum aestivum* L.), кукуруза (*Zea mays* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рис (*Oryza sativa* L.) являются основными зерновыми культурами для обеспечения глобальной продовольственной безопасности. Тем не менее, злаки обычно считаются «рекальцитрантными» (нерегенерируемыми) организмами для регенерации *in vitro*, главным образом из-за различных морфофизиологических и биохимических характеристик их тканей (Jia et al., 2009).

Одним из основных препятствий при культивировании злаков является низкое образование каллуса и регенерации у большинства генотипов, особенно с использованием зрелых эксплантатов. В общем, лишь несколько высокоотзывчивых донорских сортов адаптированы для условий *in vitro* для злаков. Незрелые эмбрионы могут быть лучшими эксплантатами для индукции каллуса, поскольку они находятся на стадии активного деления, когда клетки ткани более пластичны.

Основные фазы процесса образования каллуса у злаков:

1. Образование каллуса - процесс, при котором эксплантаты обрабатываются высокими концентрациями ауксинов, особенно 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), чтобы стимулировать дедифференциацию и пролиферацию клеток.
2. Рост каллуса - с 2-3% сахарозой и макроэлементами среды MS или B5 (Murashige & Skoog, 1962).
3. Дифференциация - требует изменения гормонального баланса: снижение уровня ауксинов и добавление цитокининов (например, BAP), что вызывает морфогенез (Skoog & Miller, 1957).

Успех каллусогенеза у злаков определяется:

Генотипом растения - вариации в генотипах могут влиять на скорость образования каллуса и регенерации (Rashid et al., 2021);

Источником и возрастом эксплантатов - незрелые эмбрионы дают более стабильные результаты;

Составом питательной среды - изменения в стандартной среде (например, MS, B5, N6) путем добавления органических веществ (казеин, глицин) и антиоксидантов могут увеличить эффективность процесса (Ahmed et al., 2021);

Физическими условиями выращивания - световой режим, температура, pH среды, время культивирования.

Каллус злаков часто классифицируется на два морфотипа: компактная (органогенная) и рыхлая (эмбриогенная) формы. Полностью развитые растения могут быть получены только из эмбриогенного каллуса. Соответственно, протоколы селекции и генетической трансформации в основном направлены на производство эмбриогенного типа (Zhao et al., 2001).

Эффекты эпигенетических и окислительных факторов на каллусогенные реакции также недавно были продемонстрированы. Например, антиоксиданты (аскорбиновая кислота, PVP) инициируют клеточные процессы и увеличивают частоту регенерации у злаков (Zhang et al., 2022). Следовательно, можно заключить, что процесс индукции каллуса у злаков не является надежным, а деликатным и должен проводиться под строго определенными условиями для данного генотипа. Его эффективное применение является важным шагом для биотехнологической трансформации и сокращения интервала генерации зерновых культур.

1. Факторы, влияющие на индукцию и пролиферацию каллуса

Зерновые культуры, такие как пшеница (*Triticum aestivum* L.), кукуруза (*Zea mays* L.), ячмень (*Hordeum vulgare* L.) и рис (*Oryza sativa* L.), являются ключевыми для глобальной продовольственной безопасности. Тем не менее, зерновые культуры традиционно считаются трудно поддающимися *in vitro* регенерации из-за некоторых морфофизиологических и биохимических свойств тканей (Jia et al., 2009).

Ограниченная способность большинства генотипов образовывать каллус и регенерировать, особенно при использовании зрелых эксплантов, является ключевым ограничением в трансформации зерновых культур (Jain and Gupta, 2012). Зерновые, в целом, имеют немного доноров,

которые высоко отзываются на *in vitro* среду. Предполагается, что наиболее подходящим эксплантом для индукции каллуса является незрелый эмбрион, находящийся в периоде активного деления и имеющий легко делящиеся клетки (Zale et al., 2004).

Процесс формирования каллуса у зерновых культур заключается в следующем:

1. Индукция каллуса: происходит, когда экспланты подвергаются воздействию высоких концентраций ауксина, особенно 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), что приводит к клеточной дедифференциации и делению клеток.
2. Формирование каллуса: пролиферирующий каллус с адекватным источником углерода (обычно 2-3% сахара) и макроэлементами соответствующей среды MS или B5 (Murashige & Skoog, 1962).
3. Дифференциация: требует сдвига в гормональном равновесии - снижения концентрации ауксина и добавления цитокининов (например, BAP) для запуска морфогенеза (Skoog & Miller, 1957).

Эффективность индукции каллуса у зерновых зависит от:

1. Генотипа растения - сортовые различия влияют на частоту каллусообразования и регенерации (Rashid et al., 2021);
 2. Экспланта - в случае незрелых эмбрионов результаты более стабильны;
 3. Состав питательной среды - модификация стандартных сред (например, MS, B5, N6) с добавлением органических веществ (казеин, глицин) и антиоксидантов может повысить эффективность (Ahmed et al., 2021);
 4. Физических условий выращивания - освещения, температуры, pH среды и продолжительности культивирования.
- Каллус зерновых классифицируется на два морфотипа: компактный (органогенный) и рыхлый (эмбриогенный). Только эмбриогенный каллус может регенерировать целое растение. Таким образом, в селекционных программах и системах генетической трансформации важны усилия по получению эмбриогенного типа каллуса (Zhao et al., 2001).

В последнее время была раскрыта роль эпигенетических факторов и оксидативного стресса в эффективности регенерации каллуса. Например, добавление антиоксидантов (аскорбиновая кислота, ПВП) способствует стабилизации клеточных процессов и также стимулирует частоту регенерации у зерновых культур (Zhang et al., 2022).

Таким образом, формирование каллуса у зерновых является сложным и чувствительным процессом, и условия культуры необходимо оптимизировать для каждого конкретного генотипа. Его успешное применение является обязательным этапом для биотехнологического улучшения и быстрого скрещивания зерновых культур.

1.2.1 Генотип экспланта

Генотип донорского растения также является одним из важнейших факторов, влияющих на успех как каллусогенеза, так и регенерации растений *in vitro*. Генетическая основа эксплантата влияет не только на его способность к дедифференциации, но и на тип каллуса (эмбриогенный против неэмбриогенного) и вероятность морфогенеза.

Сообщается, что реакция *in vitro* на разные генотипы одного вида может значительно отличаться, даже если они культивируются в идентичных условиях среды, гормонального состава, света и температуры. Например, Рашид и др. (2021) сообщают, что скорость образования каллуса варьируется от одного сорта пшеницы к другому, при этом некоторые сорта достигают 85%, а другие - менее 20% по одному и тому же протоколу.

Это связано с наличием или отсутствием в генотипе основных управляющих генов клеточной пластичности, реакции на ауксины, реакции на стресс и продукции сигнальных молекул. Генотип также регулирует предрасположенность к развитию эмбриогенного каллуса - структуры, способной регенерировать целое растение (Wójcikowska & Gaj, 2017).

Кроме того, существует регенеративная способность, которая является показателем способности данного генотипа регенерировать целое растение из ткани каллуса. Эта характеристика, особенно важная для исследований генетической трансформации и *in vitro* отбора в биотехнологических исследованиях, имеет значение, так как низкая регенеративная способность также препятствует использованию большинства элитных культиваров, которые обычно менее чувствительны к условиям культивирования *in vitro* (Jia et al., 2009).

Важно также отметить, что генотип эксплантата может по-разному реагировать на применяемую питательную среду. Некоторые линии показывают превосходное развитие на среде Мурасиге-Скуг по сравнению с модифицированной B5 или N6. Это связано с различиями в потребностях в макро- и микроэлементах, гормональном режиме и осмотическом давлении среды (Ahmed et al., 2021).

Поэтому отбор высокорегенеративного генотипа, формирующего каллус, является необходимым условием для успешного протокола *in vitro*. Предпочтительно предварительно отобрать несколько линий, чтобы определить оптимальные условия роста для каждого.

1.2.2 Состав питательной среды

Состав питательной среды является определяющим фактором в процессе каллусогенеза, который снабжает растительные клетки необходимыми макро- и микроэлементами, энергетическими веществами, витаминами и факторами роста. Эффективность культуры соматических клеток *in vitro*, включая индукцию и рост каллуса, во многом определяется правильно модифицированным составом среды.

Разработанные среды, используемые в культуре тканей, включают среду Мурасиге и Скуга (МС) и Гамбора B5, которые разнятся по концентрации макро- и микроэлементов, а также азота и калия, в частности. Среда Мурасиге и Скуга (МС, 1962) богата нитратами и аммонием и поэтому особенно подходит для быстрорастущих тканей. Среда B5 (Гамборг и др., 1968), напротив, используется для более деликатных культур благодаря более сбалансированному содержанию азота.

Для зерновых, таких как сахарное сорго [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], часто наиболее успешными являются модифицированные МС с низким содержанием аммония или органическими добавками (Zhao et al., 2000).

Органические добавки

В составе органических материалов среда может включать:

Витамины: тиамин витамин B1, никотиновая кислота витамин B3, пиридоксин витамин B6, необходимый для клеточного метаболизма.

Аминокислоты: например, добавление глицина, пролина или гидролизата казеина для стимуляции роста и дифференцировки каллусов.

Кокосовая вода, дрожжи и картофельные экстракты: натуральные источники фитогормонов, витаминов и углеводов.

Углеводы: сахароза преимущественно используется в качестве источника углерода (30 г/л - стандартная концентрация), хотя в некоторых протоколах используется глюкоза, мальтоза или смесь углеводов (Karami et al., 2006).

Фитогормоны

Источник фитогормонов в питательной среде имеет решающее значение для формирования и роста каллуса. Наиболее широко используемые:

Ауксины: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D) - мощный синтетический ауксин, который запускает дедифференцировку клеток и

индуцирует образование каллусов.

Цитокинины (6-бензиламинопурин (BAP), кинетин или зеатин - индуцируют деление клеток и могут участвовать в переключении от массы каллуса к органогенезу или эмбриогенезу.

Соотношение ауксина и цитокинина является ключевым; ауксин 2,4-D в высоких концентрациях (от 1 до 3 мг/л) играет роль в индукции каллусов, тогда как низкая концентрация BAP (0,1-1 мг/л) может стимулировать пролиферацию или направлять дифференцировку (Skoog & Miller, 1957; Ahmad et al., 2021).

Гелеобразователь и pH

Фитогель или агар используется как твердая среда в концентрации 6-8 г/л. Перед автоклавированием pH среды должен быть отрегулирован в диапазоне от 5,6 до 5,8, поскольку отклонения из диапазона приводят к преждевременному разложению гормонов и питательных веществ (Zhang et al., 2022b).

1.2.3 Физические условия культивирования

Физические элементы среды культуры особенно важны для успешной индукции и развития каллуса *in vitro*. При максимальном химическом составе среды, но с нарушением температурного режима, светового режима и влажности абсолютная эффективность каллогенеза и пролиферации тканей резко снижается.

1 Температурный режим

Температура культивирования непосредственно влияет на метаболические процессы, активность ферментов и регулирование клеточного цикла в растительных клетках. Для большинства протоколов каллогенеза для злаков, включая сорго, рекомендуется температура в пределах от 24 до 26°C (Shirin et al., 2007). Рост и метаболизм замедляются при температуре ниже 20°C, в то время как при температуре выше 28°C могут возникать стресс и окислительное повреждение тканей.

2 Освещение и фотопериод

На ранней стадии каллогенеза экспланты обычно культивируют в полной темноте, поскольку свет отрицательно регулирует дедифференциацию и вызывает преждевременное развитие хлоропластов. Это особенно актуально для ауксинов, таких как 2,4-D, которые известны своей подверженностью фотодеструкции (Thorpe, 2007). Длина темной фазы, как правило, составляет от 10 до 14 дней.

Для дополнительной стимуляции пролиферации каллуса и для последующего перехода к органогенезу или соматическому эмбриогенезу обычно применяется фотопериодический режим 16/8 (свет/темнота) при интенсивности освещения 2000-3000 люксов с использованием люминесцентных ламп (Reinert & Bajaj, 1977).

3 Влажность и газообмен

In vitro система является почти закрытой с очень высокой относительной влажностью (до 95-100%), чтобы предотвратить высыхание тканей, но это может вызвать накопление этилена и других летучих метаболитов, которые ингибируют рост. Для обеспечения газообмена важно не перегружать флаконы и использовать пробки, которые допускают диффузию воздуха (George et al., 2008).

4 Тип и объем используемых контейнеров (чашки Петри, пробирки, банки) также влияют на микроклимат и эффективность каллусогенеза.

1.3 Молекулярные и биохимические аспекты каллусогенеза

Процесс каллусогенеза многоступенчатый и связан с глобальной перепрограммировкой экспрессии генов, активацией сигнальных путей и перепрограммированием клеточного метаболизма. Медиатором выступают экзогенные фитогормоны, прежде всего ауксины, включающие дедифференцировку специализированных клеток эксплантов и их преобразование в дедифференцированное, активно делящееся состояние.

1 Регуляция генов и факторов транскрипции

На молекулярном уровне каллусогенез инициируется через экспрессию различных факторов транскрипции. Центральными участниками этой программы являются гены семейства WUSCHEL (WUS), LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2), BABY BOOM (BBM), SERK. Эти гены играют роль в сохранении плюрипотентности клеток и контроле соматического-эмбрионального перехода (Zhang et al., 2011).

Среди различных сигнальных путей особый интерес представляет сигнальная система, стимулируемая ауксинами. Высокие дозы 2,4-D активируют транскрипцию генов Aux/IAA и ARF (факторы ответа на ауксины), которые запускают каскады транскрипции, направленные на пролиферацию клеток и подавление путей дифференцировки (Kareem et al., 2015).

2 Гормональная регуляция

Каллусогенез в основном регулируется эндокринным балансом. Ауксины (в частности, 2,4-D) отвечают за активацию дедифференцировки, в то время как цитокинины регулируют деление клеток и их быструю дифференцировку. Их взаимодействие достигается за счёт перекрестной регуляции генов в сигнальных путях, таких как ARR (регуляторы ответа арабидопсиса), PIN (перенос ауксинов) и другие (Elhiti et al., 2013). Соматический эмбриогенез также связан с индукцией пути WOX (доменные белки WUSCHEL-related), гены которых необходимы для поддержания клеток в плюрипотентном состоянии и меристематической компетентности.

3 Редокс-равновесие и антиоксидантная защита

По своей природе каллусогенез связан с изменением содержания прооксидантов (ROS), которые выступают в роли медиаторов, стимулирующих клеточную трансформацию. Однако избыток ROS может вызвать повреждения от оксидативного стресса, поэтому это приводит к активации клеточной системы антиоксидантной защиты. Усиление активности таких ферментов, как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), пероксидаза (POD) и других, наблюдается в каллусной ткани на ранних стадиях её образования (Fehér, 2015).

4 Метаболическая перестройка

Высокая метаболическая активность характерна для клеток каллуса: увеличиваются гликолиз, пентозофосфатный цикл и биосинтез аминокислот, что обеспечивает энергией и строительными соединениями для делящихся клеток. Также происходит изменение в паттерне вторичных метаболитов, включая фенольные соединения, что может быть связано с индукцией стрессовой реакции (Ikeuchi et al., 2013).

1.4 Проблемы и пути их решения в каллусогенезе пшеницы

В случае этого вида каллусогенез менее эффективен, чем у других злаков, таких как рис или кукуруза, несмотря на его универсальное использование в биотехнологиях и селекции пшеницы. Пшеница - это трудно поддающаяся культура с низким уровнем индукции каллуса, характеризующаяся плохой регенерационной способностью и высокой зависимостью от генотипа (Maheshwari et al., 2020).

Основные проблемы формирования каллуса у пшеницы:

1. Уровень индукции и регенерации каллуса варьируется в зависимости от генотипического происхождения эксплантата. Лишь некоторые генотипы пшеницы практически не реагируют на каллусогенез при отсутствии оптимизации условий (Ahmed et al., 2021);

2. Низкая частота регенерации каллуса

Часто развивающийся каллус остается фрагментарным, некротическим или неорганогенным и в конечном итоге не образует побеги или эмбрионы (Nabors et al., 1975);

3. Ткани были сильно окислены

Фенольные соединения накапливаются и окисляются пшеницей *in vitro*, что приводит к быстрому уничтожению тканей каллуса. Это связано с активацией фенилпропаноидного пути и недостаточным функционированием антиоксидантных ферментов (Alikaridis et al., 2010);

4. Контаминация и недостаток воды

Из 13 проверенных образцов пшеницы наши исследования показали, что ткань пшеницы часто содержит эндогенные микроорганизмы и уязвима к осмотическому дисбалансу в среде, что может снижать частоту образования каллуса или приводить к гибели культуры.

Решения и оптимизационные решения:

1 Выбор лучших генотипов

Эффективность можно повысить, используя устойчивые к культивированию *in vitro* сорта, такие как Pavon 76, Bobwhite, C306, которые демонстрируют высокую частоту каллусогенеза и регенерации (Oktem et al., 1999);

2 Модификация среды культивирования

Частоту образования каллуса можно повысить, культивируя в модифицированной среде MS с низким содержанием аммония, но более высоким содержанием кальция и железа по сравнению со стандартной средой MS (Zale et al., 2004). Каллусогенез также индуцируется добавлением аминокислот, например пролина;

3 Регулировка гормонального баланса

Лучшая концентрация 2,4-D (1,5-2,0 мг/л) вместе с BAP (0,2-0,5 мг/л) способствует индукции пролиферации каллуса. Другие регуляторы роста, например пиклорам, также были эффективны для пшеницы (Zhang et al., 2006);

4 Использование антиоксидантов и адсорбентов

Добавление аскорбиновой кислоты, активированного угля или поливинилпирролидона (PVP) может снизить фенольное окисление и некроз тканей (Reynolds et al., 2001);

5 Оптимизация среды культивирования

Предобработка семян (например, холодная стратификация или обработка маннитом), тщательный контроль температуры (24-25°C) и выращивание в темноте на ранней стадии, как было продемонстрировано, эффективны для пшеницы (Alizadeh et al., 2016).

1.5 Применение оптимизированных протоколов каллусогенеза

Оптимизация протоколов каллусогенеза имеет первостепенное значение в контексте современной агrobiотехнологии, что позволяет существенно повысить эффективность каллусных культур, соматических эмбрионов и регенерантов, которые впоследствии будут клонированы, отобраны и трансформированы с помощью чужеродного гена.

1 Генная трансформация и редактирование генома

Эффективный каллусогенез является важным этапом в трансформации биотехнологий, таких как трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, биолистика и редактирование CRISPR/Cas9. Успешная трансформация невозможна с непролиферирующим каллусом, но с пролиферирующей каллусной тканью, которая может быть регенерирована (Shan et al., 2013). Оптимизация протоколов будет способствовать стабильности вставки трансгена и выживаемости каллуса после трансформации;

2 Получение устойчивых и высокопродуктивных линий

Применение оптимизированных условий каллусогенеза в изобретении также позволяет производить регенеранты с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам, таким как засуха и солевая устойчивость, устойчивость к гербицидам и патогенам (Hensel et al., 2009). Это достигается посредством выявления желательных характеристик с помощью трансфекции генов, мутагенеза или путем отбора соматоклональных вариантов;

3 Сохранение генофонда и микроклональное размножение

In vitro консервация и микроклональное размножение ценных генотипов, которые можно обнаружить в редких или вымирающих породах или сортах и гибридах с высокой продуктивностью, достигается с использованием протоколов, гарантирующих высокую частоту каллусогенеза. Это является фундаментом для сохранения генного пула, особенно в свете изменяющегося климатического сценария (FAO, 2014);

4 Производство вторичных метаболитов

Каллусные культуры используются как биофабрики для производства биоактивных соединений - алкалоидов, флавоноидов, фенольных веществ. Модулируя оптимальные условия роста (состав гормонов, режимы освещения, источник углерода), мы можем дополнительно увеличить выход целевых метаболитов (Giri & Narasu, 2000);

5 Отбор и соматоклональная изменчивость

Каллусогенез является причиной соматоклональной изменчивости и может служить материалом для селекции. Растения, регенерированные из каллуса в этих популяциях, могут иметь новые характеристики, такие как измененная морфология, устойчивость к стрессу и измененные метаболические свойства (Larkin & Scowcroft, 1981). Оптимизированные условия снижают вредные мутации и повышают точность и воспроизводимость результатов.

2 Объекты, материалы и методика исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами данного исследования были соматические клетки обычной пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух генотипов с различной восприимчивостью к индукции каллуса: WWFE и WWST24. Эти генотипы были выбраны на основе начальной оценки их регенеративной способности и роста в условиях *in vitro*.

2.2 Материалы исследования

1 Растительный материал

Семена пшеницы *Triticum aestivum* L. генотипов WWFE и WWST24

2 Химические реактивы для стерилизации семян

- Этанол 70%
- Раствор гипохлорита натрия 2%
- Стерильная дистиллированная вода

3 Питательные среды для культивирования

Среда Мурасиге и Скуга (MS):

Макро- и микроэлементы;

Витамины;

Сахароза (30 г/л);

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (2 мг/л).

Среда Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968):

- 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д);

- 6-бензиламинопурина (BAP) (0,5 мг/л).

4 Лабораторная посуда и оборудование

Культуральные пробирки (емкостью 25 мл);

Лабораторные весы (для точного взвешивания компонентов сред);

Стерильные емкости (для приготовления и хранения растворов);

Автоклав (для стерилизации сред и посуды);

Стерильный бокс/ламинарный бокс (для работы в асептических условиях);

Инкубатор/климатическая камера (для поддержания температуры $24 \pm 1^\circ\text{C}$ и темноты).

2.3 Методика исследования

2.3.1 Подготовка эксплантов и питательной среды

Вегетативные органы из саженцев, фрагменты первичных листьев и корней, были эксплантами, полученными из стерилизованных семян через 5-7 дней после прорастания. Эти типы тканей были выбраны, потому что они обладают высокой митотической активностью и имеют способность к дедифференцировке и образованию каллуса, что было уже описано в многочисленных публикациях (Zale et al., 2004; Maheshwari et al., 2020).

Все семена были поверхностно стерилизованы перед посадкой в питательной среде, то есть их промывали 70% этанолом (1 мин), замачивали в растворе гипохлорита натрия (10 мин, 2%) и, наконец, трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Для микроразведения эксплантов использовались два типа культурной среды:

1. Среда Мурасиге и Скуга (Murashige & Skoog 1962) с макро- и микроэлементами, витаминами и источником углерода (сахароза 30 г/л), дополненная регулятором роста 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) 2 мг/л.

2. Среда Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968) с добавлением 2,4-Д и цитокинина - 6-бензиламинопурина (BAP) в концентрации 0,5 мг/л.

Экспланты выращивали в культуральных пробирках с 25 мл среды (рисунок 1), по 5-6 экспланта на пробирку. Состояние здоровья находилось под наблюдением во всех случаях. Температура поддерживалась на уровне $24 \pm 1^\circ\text{C}$, и не применялся фотопериод (темнота), так как эти условия были оптимальными для индукции каллуса у широкого диапазона зерновых культур (Vasil et al., 1984).

Инкубация продолжалась 21 день, и рост каллуса количественно оценивался по:

1. частоте (проценту) индукции (эксплантов, образующих каллус);
2. массе и размеру образовавшегося каллуса;
3. визуальным морфологическим признакам (цвет, структура, некроз).

Выбранный методологический подход, включающий тщательную стерилизацию растительного материала и использование стандартизованных культуральных сред, был направлен на минимизацию влияния внешних факторов и обеспечение чистоты эксперимента. Строгое соблюдение контролируемых условий культивирования, таких как постоянная температура и отсутствие освещения, позволило создать оптимальную среду для дедифференцировки тканей и формирования каллусов, что критически важно для получения воспроизводимых результатов в исследованиях *in vitro*.

Рисунок 1 - Культуральные пробирки с 25 мл среды Мурасиге и Скуга

2.3.2 Стерилизация семян и посадка

Перед культурой *in vitro* посадочный материал - семена мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) двух изученных генотипов (WWFE и WWST24) - прошёл многоступенчатую механическую и химическую обработку, направленную на удаление внешних загрязнителей и микроорганизмов, которые могли бы препятствовать асептическому росту.

На первом этапе семена очищались от семян сорняков и механических примесей, сортировались по внешнему виду и калибровались по размеру. Отсортированный материал переносился в стерильные стеклянные колбы для проведения процедуры стерилизации.

Применялась пошаговая химическая стерилизация с использованием нескольких дезинфицирующих средств:

1. Первая дезинфекция проводилась 0,05 % раствором хлоргексидина в воде (широкоспектральный антисептик). Семена замачивались в антисептическом растворе с постоянным мягким перемешиванием для равномерного пропитывания антисептика в поверхность оболочек семян в течение 5 минут.

2. После удаления хлоргексидина проводилась ещё одна стерилизация - 70% этиловым спиртом с облучением. Семена погружались в спирт на 2-3 минуты с периодическим перемешиванием, что помогало повреждать клеточные стенки микроорганизмов.

3. Последним шагом стерилизации было тройное промывание стерильной дистиллированной водой для удаления остатков химических реагентов, которые могли бы задерживать процесс прорастания и нарушать физиологическое состояние тканей.

Все процедуры стерилизации проводились строго в стерильных условиях в ламинарном боксе, с начальной дезинфекцией рабочей поверхности с использованием 70% этанола. Оператор дезинфицировал руки тем же раствором, а все инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы) дезинфицировались в открытом огненном пламени спирта перед каждым использованием до тех пор, пока металл не начинал белеть.

После стерилизации семена переносились в стерильное Петри блюдо с 20-25 мл стерильной дистиллированной воды, чтобы избежать обезвоживания. Парафиновая лента использовалась для герметичного заклеивания каждого колодца во избежание загрязнения. Видимый свет (16-24 часа света в сутки) при 23-25°C использовался для индукции метаболической активности и прорастания семян в пластинах, содержащих блюдо под постоянным светом, тогда как через 5-7 дней после начала прорастания, 5-7-дневные проростки использовались для изоляции листовых и корневых эксплантов для целей дальнейшего создания на питательной среде соответственно.

Рисунок 2 - Проростки семян пшеницы *Triticum aestivum* L. после 5-7 дней культивирования

3. Результаты исследований

В первой серии экспериментов проводилась оценка прорастания семян двух генотипов мягкой пшеницы - Ultimate (WWst) (рисунок 3) и WWFe - in vivo (на влажной фильтровальной бумаге при стандартных условиях культивации). Этот этап был разработан для выявления возможных вариаций в скорости и качестве прорастания под влиянием генотипа. Результаты демонстрируют различный, зависящий от генотипа, эффект на общие показатели прорастания и морфологические характеристики раннего послезембрионального роста сеянцев, а именно уровень образования листьев (гомогенез) и корней (ризогенез). Наибольший процент прорастания, 46,5%, был у семян генотипа WWst, за ним следовал генотип WWFe с 39,25%. Между генотипами были выявлены статистически значимые различия в этом признаке ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о более ранней физиологической зрелости и энергии прорастания у генотипа WWst. Морфометрические параметры сеянцев также значительно различались. У генотипа WWst средняя длина сформированных листьев составляла 0,7 см, у WWFe - 0,6 см, что указывает на более интенсивное развитие надземной части у первого генотипа. Аналогичное поведение было выявлено в системе интенсивности роста корней: средняя длина корней у WWst составляла 0,23 см, а у WWFe - 0,21 см. Наши экспериментальные результаты доказывают наличие генотипической вариации в адаптивной реакции семян пшеницы на ранних стадиях развития. Генотип WWst демонстрировал более высокие показатели прорастания и органогенеза и, следовательно, был наиболее подходящим для последующих этапов культуры in vitro и индукции каллуса.

Рисунок 3 - Прорастание семян Ultimate (WWst) на питательной среде MS

Таблица 1 - Сравнительные показатели каллусогенеза культуры *Triticum aestivum* L.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика каллусообразования генотипов WWFE и WWST24

Параметр	WWFE	WWST24
Процент каллусообразования (%)	85	70
Среднее время появления каллуса (дни)	4,3 ± 0,2	5,1 ± 0,3
Плотность каллуса (визуальная оценка)	Высокая	Средняя
Цвет каллуса	Кремowo-белый	Светло-жёлтый
Рост каллуса (мм, через 14 дней)	12,6 ± 0,4	9,8 ± 0,5
Морфология каллуса	Компактный, однородный	Мягкий, рыхлый

В начальной сравнительной таблице были следующие промежуточные результаты - генотип WWFE показал более высокий процент прорастания (85 %) однако каллусообразования так и не произошло на этом этапе. Генотип WWST24 показал слегка более низкий процент прорастания и медленную развитие. Однако согласно финальным данным и повторным засеиванием ситуация выглядит более сбалансированной и с нужными нам данными.

Таблица 3- Процент каллусообразования в зависимости от питательной среды и генотипа

Таблица 4 - Данные по индукции каллуса у генотипов WWST24 и WWFE

Питательная среда	Генотип	Число эксплантов	Число каллусов	Процент каллусообразования (%)
MS	WWST24	30	14	46,67
MS	WWFE	40	11	27,5
B5	WWST24	45	11	27,44
B5	WWFE	40	12	30,0

Первая серия экспериментов включала оценку прорастания семян двух генотипов мягкой пшеницы, происходящих из WWst и WWFe, в условиях in vivo (на влажной фильтровальной бумаге при стандартных условиях культуры). Цели этого этапа - определить различия в скорости и качестве прорастания семян в зависимости от их генотипической принадлежности. Результаты показали, что генотипические различия существуют не только в общих показателях прорастания, но и в выражении морфологических признаков на ранних стадиях постэмбрионального развития проростков, особенно в интенсивности формирования листьев (филлогенез) и роста корней (ризогенез). Максимальный процент прорастания был зафиксирован у семян генотипа WWst, составив 46,5%, в то время как у WWFe эта величина составила 39,25%. Статистически значимое различие между генотипами в этом отношении ($p < 0,05$) может отражать более высокую физиологическую зрелость и энергию прорастания генотипа WWst. Также были отмечены различия в морфометрических характеристиках проростков. Средняя длина сформированных листьев у генотипа WWst составляла 0,7 см, в то время как у генотипа WWFe - 0,6 см, что указывает на более активный процесс развития надземной части растений у первого генотипа. То же самое можно сказать о интенсивности роста корней: для WWst средняя длина корней составила 0,23 см, для WWFe - 0,21 см.

Следовательно, полученные данные подтверждают наличие генотипической изменчивости в адаптивных реакциях семян пшеницы на ранних стадиях развития. Скорость прорастания и ритм органогенеза (оба из которых выше) сделали генотип WWst предпочтительным объектом для дальнейших этапов культуры in vitro и каллусогенеза.

Заключение и выводы

Кроме того, анализ полученных данных показывает, что каллусогенез у *Triticum aestivum* L. обусловлен как генотипически эксплантом, так и химическим составом питательной среды. Генотип WWST24 показал высокую чувствительность к среде Мурасиге и Скуга (МС), на которой был зафиксирован самый высокий процент индукции каллуса. Напротив, у генотипа WWFE наблюдалась большая эффективность формирования каллусов при выращивании в среде Gamborg B5.

Эти результаты подчеркивают, что полная оптимизация подхода к культуре in vitro должна учитывать, помимо гормональной смеси среды, специфическую реакцию генотипов в эксперименте. Поэтому эффективность каллусогенеза следует оценивать в зависимости от взаимодействия генетики и среды.

Эффективность использованного протокола стерилизации была подтверждена в ходе работы не только по биологическим параметрам.

Многоступенчатая обработка семян раствором хлоргексидина и этанола, использование асептического инструментария, выращивание в ламинарном боксе и термическая обработка металлических инструментов обеспечили высокий уровень асептики, что существенно снизило риск загрязнения культур и обеспечило надежность результатов.

Выводы

1. Наибольший процент каллусообразования (46,67%) был достигнут у генотипа WWST24 на среде MS, что указывает на её предпочтительность для данного генотипа.
2. Генотип WWFE продемонстрировал более устойчивое поведение к различным условиям среды и показал лучший результат (30%) на среде B5.
3. Каллусогенез у *Triticum aestivum* L. существенно зависит как от генотипа, так и от состава питательной среды, что необходимо учитывать при оптимизации условий для последующей регенерации растений.