

Регенерация сои в культуре *in vitro* (обзор)

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-148-155

УДК: 58.085

Поступление/Received: 01.06.2021

Принято/Accepted: 10.09.2021

*In vitro* regeneration of soybean
(a review)

Е. С. БЕСПАЛОВА, К. М. ЕРШОВА, Ю. В. УХАТОВА*

E. S. BESPALOVA, K. M. ERSHOVA, YU. V. UKHATOVA*

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44
* ✉ sci_secretary@vir.nw.ru

N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources,
42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia
* ✉ sci_secretary@vir.nw.ru

В настоящей статье представлен обзор современных работ по изучению способности образцов сои к регенерации в культуре *in vitro* и обсуждаются способы получения высоких показателей регенерации, что является необходимым условием включения генотипов сои в программы по геномному редактированию. В обзоре рассмотрены основные факторы, определяющие регенерационную способность эксплантов различных образцов сои. Наибольшее влияние на эффективность регенерации оказывают условия инициации культуры *in vitro*, тип экспланта, состав питательной среды, а также генотипические особенности образцов.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.) Merr., геномное редактирование, CRISPR/Cas, экспланты, генотип.

This is an overview of contemporary published works dedicated to the ability of soybean plants to regenerate *in vitro* and the techniques to achieve high regeneration rates, which is a necessary condition for the inclusion of soybean genotypes in genome editing programs. The main factors that determine the regenerative capacity of explants from various soybean accessions are considered. The greatest effect on the efficiency of regeneration is exerted by the conditions of *in vitro* culture initiation, type of explant, composition of the nutrient medium, shelf life of seeds, and genotypic characteristics of soybean accessions.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr., genome editing, CRISPR/Cas, explants, genotype.

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) – уникальная сельскохозяйственная культура, ценный источник растительного белка и масла (Seferova, Vishnyakova, 2018). Распространение производства сои в России и мире стремительно растет; за последние десятилетия она заняла четвертое место среди культур-лидеров (Lysenko, 2019). Однако широтный ареал ее адаптивности ограничен в связи с тем, что соя – растение короткого дня с чувствительной системой восприятия продолжительности фотопериода. Для произрастания и возделывания сои *G. max* необходимы благоприятные климатические условия, а именно: температура +18...+22°C для роста и созревания, влажность воздуха не более 80%, продолжительность светового дня 12 часов (Seferova, Novikova, 2015; Bragina, Kocheva, 2017; Novikova et al., 2018). Ключевую роль в созревании бобов играет фотопериодическая чувствительность (ФПЧ): в условиях длинного дня цветение может быть затянута или вовсе не наступает, (Tolmacheva, 2013; Seferova, Vishnyakova, 2018).

Соя хорошо изучена с точки зрения генетики. Так, геном сои расшифрован в 2009 г., статья об этом вышла в журнале Nature в 2010 г. (Schmutz et al., 2010). К настоящему времени для сои, как и для многих сельскохозяйственных культур, разработаны различные маркеры к генам (Vinichenko et al., 2020), ответственным за сроки вегетации, высоту растений, устойчивость к климатическим факторам, фотопериодическую чувствительность (ФПЧ): RAPD (Xu et al., 2002; Xu, Gai, 2003), ISSR (Glazko et al., 1999; Kozurenko et al., 2007; Abugalieva et al., 2010; Mudibu et al., 2011), AFLP (Feng et al., 2008; Abugalieva, 2013) и др.

Для расширения генетического разнообразия и получения растений с заданными свойствами используют современные методы геномного редактирования, ведущие к изменению функционирования генов, что приводит к формированию новых генотипов (Salina, 2016). Наиболее часто используют систему CRISPR/Cas, которая позволяет быстро и достаточно просто вносить изменения в генетический материал растений на основе механизма репарации, при котором происходит восстановление нативной структуры ДНК (Gasiunas, Siksnys, 2013; Chylinski et al., 2014; Nemudryi et al., 2014; Lomov et al., 2015; Makarova et al., 2015; Ceasar et al., 2016; Luo et al., 2016; Leenay, Beisel, 2017; Marchisio, Huang, 2017; Shmakov et al., 2017; etc.). Например, с помощью данной системы можно встраивать или заменять отдельные участки нуклеотидных последовательностей (Bakulina, Shirokikh, 2019). В этом случае получают нетрансгенные растения с заданными признаками и свойствами, причем одновременно можно производить мутации в нескольких генах-мишенях (Korotkova et al., 2017, 2019). Система CRISPR/Cas прошла апробацию на 25 различных культурах (ячмень, кукуруза, рис, сорго, пшеница, капуста, морковь, кассава, огурец, картофель, томат, арбуз, киви, яблоня, банан, виноград, грейпфрут, апельсин, люцерна, соя, горчица, хлопчатник, лен, рапс, кофе) (Korotkova et al., 2017; Tikhonova, Khlestkina, 2019; Strygina, Khlestkina, 2020). В течение пяти лет с помощью применения системы CRISPR/Cas на растениях различных культур было изменено более 80 генов-мишеней с улучшением свойств плодов (Korotkova et al., 2017, 2019).

Используя современные технологии геномного редактирования CRISPR/Cas, можно получить высоко-

продуктивные генотипы сои для выращивания практически во всех климатических зонах, что будет экономически выгодным и приведет к решению проблемы возделывания данной культуры в более северных широтах по сравнению с существующими зонами возделывания сои.

Основными этапами геномной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas являются: выбор целевой последовательности и определение способа редактирования; создание направляющей конструкции (вектора) для доставки генетического материала в ядро клетки; собственно редактирование и последующий анализ участка генома, подвергнутого воздействию (Vlasov et al., 2014; Korotkova et al., 2017; Strygina, Khlestkina, 2020). Большинство работ методами геномного редактирования, в том числе сои, начинаются в культуре *in vitro*. Для включения в работу по геномному редактированию отбирают генотипы с высокой регенерационной способностью и проводят подбор условий для повышения способности к регенерации остальных генотипов.

Именно уровень регенерации является фактором, лимитирующим применение геномного редактирования. Выбор оптимальных условий позволит повысить уровень регенерации различных генотипов и вовлечь боль-

шее число образцов в развивающиеся программы генетического редактирования.

В настоящей работе приводится анализ литературных данных и описаны ключевые факторы, влияющие на регенерационную способность образцов сои и других зернобобовых культур, с целью выбора наиболее эффективной методики для дальнейшего применения в практической работе с образцами из коллекции ВИР.

Влияние различных факторов на эффективность регенерации зернобобовых культур

Проведенный анализ научных работ, в которых объектом исследования служила соя (*Glycine max*), а также несколько других модельных зернобобовых культур (горох – *Pisum sativum* L., люпин – *Lupinus albus* L.), показал, что каждым коллективом авторов было исследовано относительно небольшое число образцов – от 1 до 9 генотипов, причем данные по регенерации сильно отличались (табл. 1). В разных экспериментах были использованы различные типы эксплантов (частей растений). Уровень регенерации все авторы определяли как долю регенерирующих эксплантов от их общего числа, выраженную в процентах.

Таблица 1. Уровень регенерационной способности образцов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) и гороха (*Pisum sativum* L.) в зависимости от типа экспланта и генотипа

Table 1. Regenerative capacity levels of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and pea (*Pisum sativum* L.) accessions depending on the type of the explant and the genotype

Объект исследования	Число изученных генотипов	Тип экспланта для культивирования <i>in vitro</i>	Уровень регенерации (%)		Ссылка
			min	max	
<i>Pisum sativum</i> L.	1	Семядольные узлы	25	100	Kantayos, Bae, 2019a
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.					
Incasoy-36	1	Семядольные узлы	27	96,8	Soto et al., 2013
Линия 1476 Линия 1477	2	Сегменты стебля	12,3	51,2	Varlamova et al., 2018
Peking; Dundee	2	Семядольные узлы	50	66,5	Mangena et al., 2020
Dawon; Pungsan; Daewon; Taekwang; Chongdoo 1	5	Семядоли	0	0	Kantayos Bae, 2019b
	5	Гипокотиль	0	0	Kantayos Bae, 2019b
	5	Семядольные узлы	66,7	100	Kantayos Bae, 2019b
Ходсон; Приморская-81; Приморская-4; Приморская-86; Муссон; Сфера	6	Семядольные узлы	36	56	Efremova et al., 2017
Dundee; TGx1740-2F; TGx1835-10E; LS677; LS678; Peking	6	Двойной семядольный узел	45	90	Mangena, Mokwala, 2019
Bohemians; Cardiff; Gallec; Merlin; Moravians; Naya; Silensia	7	Половинки семян	5,7	37,7	Sojková et al., 2016

Таблица 1. Окончание

Table 1. The end

Объект исследования	Число изученных генотипов	Тип экспланта для культивирования <i>in vitro</i>	Уровень регенерации (%)		Ссылка
			min	max	
Snowy; Jack; Williams; Bunya; PNR791; A6785; MoonB1; Bragg Fernside	9	Незрелые семядоли	0	85	Raza et al., 2020
Huasteca-100; Huasteca-200; Huasteca-300; Huasteca-400; Huasteca-600; Tamesí; Nainari; Suaqui-86; Jack	9	Семядольные узлы; часть гипокотилия	6	33	Mora Vasquez et al., 2020
Bunya; Fernside; Snowy; Moon B1; A6785; PNR791; Bragg; Jack; William	9	Половинки гипокотилей	60	87	Raza et al., 2017
	9	Гипокотили	50	100	Raza et al., 2017
	9	Семядольные узлы	75	100	Raza et al., 2017

Проведенный анализ литературных данных позволил выявить ряд факторов, влияющих на способность генотипов сои к регенерации. В их числе: условия инициации культуры *in vitro*, тип экспланта, состав питательной среды, срок хранения семян, а также генотипические особенности образцов (Sainger et al., 2015).

Фактор инициации культуры *in vitro*

Для инициации развития эксплантов сои в культуре *in vitro* все авторы использовали семена, которые подвергали тщательной поверхностной стерилизации для освобождения семян от патогенных микроорганизмов. Существенным фактором, оказывающим влияние на эффективность введения в условия *in vitro*, а также на дальнейшую регенерацию, является качество исходных семян, используемых в экспериментах: семена с высокими показателями всхожести, без признаков поражения болезнями и вредителями ожидаемо имеют высокую эффективность введения в культуру *in vitro*.

В большинстве работ в качестве стерилизующего агента был использован коммерческий отбеливатель с гипохлоритом натрия (типа «АСЕ», «Белизна») (Soto et al., 2013; Sojková et al., 2016; Raza et al., 2017; Varlamova et al., 2018; Kantayos, Bae, 2019b; Mangena, Mkwala, 2019; Mangena et al., 2020; Raza et al., 2020). В четырех работах (Mangena, Mkwala, 2019, 2020; Raza et al., 2017; Sojková et al., 2016) использован газообразный хлор как стерилизующий агент. Другие авторы использовали этанол: 70% (Soto et al., 2013; Kantayos, Bae, 2019b; Varlamova et al., 2018) и 75% (Aslam et al., 2020), 3-процентную перекись водорода (Zhumagulova, 2014), твин-20 (Raza et al., 2020) и концентрированную соляную кислоту (Mangena, Mkwala, 2019). Длительность стерилизации составляла от 15 минут до 20 часов, в отдельных случаях достигала 48 часов. При этом во всех работах отмечена 100-процентная эффективность стерилизации – все обработанные семена были успешно введены в культуру *in vitro*.

Таким образом, наиболее оптимальным является вариант 15-минутной стерилизации гипохлоритом натрия – как самый быстрый и при этом не менее эффективный, чем остальные более длительные варианты.

Влияние состава питательной среды: минеральная основа и регуляторы роста

Практически во всех работах по изучению регенерационной способности сои (Sojková et al., 2016; Raza et al., 2019; Aslam et al., 2020) авторы использовали питательную среду на основе среды Мурасиге–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) (табл. 2). Результаты проанализированных работ показали, что состав питательной среды, в частности степень разведения базовой среды (в 2, 3 и 4 раза), влиял на уровень регенерации всех образцов зернобобовых культур вне зависимости от типа экспланта и генотипа (см. табл. 2). Максимальная регенерация (80%) была получена на среде 1/2 МС (Aslam et al., 2020). В то же время между культивированием эксплантов на полной среде МС и 1/3 МС значительных различий в уровне регенерации не наблюдали, а разбавление МС в четыре раза привело к более низкому уровню регенерации по сравнению со всеми другими вариантами сред – всего 10% (Aslam et al., 2020). Было установлено, что 3% сахарозы в питательной среде вызывают самую высокую частоту регенерации побегов, чем все другие источники углеводов для всех эксплантов. Снижение частоты регенерации наблюдалось в следующем порядке: сахароза > фруктоза > глюкоза > мальтоза (Aslam et al., 2020). Таким образом, минеральная основа питательной среды и источники углеводов оказывают значимое влияние на способность эксплантов к регенерации.

Не менее важным фактором было содержание фитогормонов (БАП, ИМК, НУК, кинетин, зеатин, ГК) и витаминов (В8, В5) в питательной среде. Так, в работе V. Kantayos и С. Н. Бае (2019b) в зависимости от концентрации регуляторов роста в среде был получен уровень регенерации от 0 до 100%. При добавлении в среду витамина В5, БАП (0, 1, 2, 4 мг/л) и кинетина (1, 2 мг/л) регенерация достигала 75–96,7%. Однако при содержании в среде БАП и кинетина (по 2 мг/л) процент регенерации составил лишь 13,3% (Kantayos, Bae, 2019b).

Другие авторы (Sojková et al., 2016) дополняли среду комбинацией регуляторов роста: БАП (1,67 мг/л), ИУК (0,1 мг/л), ГК (0,5 мг/л), зеатина (1 мг/л) и витамина В5 (3,2 г/л); уровень регенерации составил 5,7–37,7%.

Таблица 2. Влияние состава питательной среды и регуляторов роста на эффективность регенерации
Table 2. Impacts of the composition of the nutrient medium and growth regulators on the efficiency of regeneration

Состав питательной среды и регуляторов роста	Уровень регенерации (%)		Ссылка
	min	max	
МС, витамин В5; БАП – 0, 1, 2, 4 мг/л; сахароза – 30 г/л; агар – 8 г/л; TDZ – 0–2	25	100	Kantayos, Bae, 2019a
МС, БАП – 2 мг/л; ИМК – 2,7 мг/л; НУК – 2,3 мг/л	45	90	Mangena, Mokwala, 2019
МС, БАП – 2 мг/л	50	66,5	Mangena et al., 2020
МС, витамин В5; миоинозит – 100 мг/л; сахароза – 30 г/л; 2,4-D – 20–40 мг/л; Gelrite – 2 г/л	0	85	Raza et al., 2020
МС, кинетин – 4 мг/л, НУК – 0,1 мг/л; сахароза – 30 г/л	5	20	Aslam et al., 2020
$1/2$ МС, кинетин – 4 мг/л, НУК – 0,1 мг/л; сахароза – 30 г/л	20	80	
$1/3$ МС, кинетин – 4 мг/л, НУК – 0,1 мг/л; сахароза – 30 г/л	4	20	
$1/4$ МС, кинетин – 4 мг/л, НУК – 0,1 мг/л; сахароза – 30 г/л	2	15	
МС, БАП – 0,5; 1; 1,5; 2; 3 и 6 мг/л	27	96,8	Soto et al., 2013
МС, миоинозит – 100 мг/л; MES – 585,6 мг/л; L-пироглутаминовая кислота – 100 мг/л; зеатин – 1 мг/л; ГК – 0,5 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л; БАП – 1,67 мг/л	10	100	Raza et al., 2017
МС с витамином В5; БАП и кинетин в концентрациях 0, 1, 2, 4 мг/л; сахароза – 30 г/л; агар – 8 г/л	0	100	Kantayos, Bae, 2019b
МС с витамином В5; БАП – 3 мг/л; ИМК – 0,2 мг/л; кинетин – 0,5 мг/л; сахароза – 30 г/л; агар – 8 г/л	6	33	Mora Vasquez et al., 2020
МС ₁ , 6-БАП – 1 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л	27,0	51,2	Varlamova et al., 2018
МС ₂ , 6- БАП – 1 мг/л; 2,4-D – 0,5 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л	18,5	35,1	
МС ₃ , 6-БАП – 0,5 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л	21,3	43,8	
МС ₄ , 6-БАП – 0,5 мг/л; 2,4-D – 0,5 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л	12,3	25,0	
МС, ГК – 0,5 мг/л; зеатин – 1 мг/л; ИУК – 0,1 мг/л; БАП – 1,67 мг/л; ГК – 0,5 мг/л; витамин В5 – 3,2 г/л	5,7	37,7	Sojková et al., 2016
МС, БАП – 1,13 мг/л; ГК – 0,5 мг/л	36	56	Efremova et al., 2017

Сокращения: МС – питательная среда Мурасиге–Скуга (Murashige, Skoog, 1962); TDZ – тидиазурон; БАП – 6-бензиламинопурин; ГК – гиббереллиновая кислота; ИУК – индолил-3-укусная кислота; ИМК – индолил-3-масляная кислота; НУК – α -нафтилуксусная кислота; 2,4-D – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоно-вая кислота

Abbreviations: MC – Murashige–Skoog culture medium (Murashige, Skoog, 1962); TDZ – thidiazuron; BAP – 6-benzylaminopurine; NA – gibberellic acid; IAA – indolyl-3-acetic acid; IMA – indolyl-3-butyric acid; NAA – α -naphthylacetic acid; 2,4-D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

Н. В. Варламова с коллегами (Varlamova et al., 2018) использовали в работе четыре питательные среды на основе МС с добавлениями БАП (1 мг/л), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D) (0,5 мг/л), ИУК (0,1 мг/л) в разных концентрациях. В результате была выбрана среда МС₁ с минимальным содержанием регуляторов роста: на ней наблюдали наиболее высокий уровень регенерации – 51,2%.

Выше было показано, что уровень регенерационной способности в большинстве работ зависел от добавления в питательную среду фитогормонов в различной концентрации. Однако данные разных авторов противоречивы. Так, в работе N. Soto et al. (2013) при добавлении БАП (1–2 мг/л) регенерация составила 87–97%. При добавлении в среду более высокой концентрации БАП (от 3–6 мг/л) процент регенерации снижался до низкой границы – 27 %. В то же время в статье V. Kantayos, C. H. Bae (2019b) при добавлении БАП (4 мг/л) отмечали уровень регенерации в диапазоне 87,5–98%. Те же авторы показали, что при содержании в среде только кинетина (1, 2, 4 мг/л) процент регенерации составил 76,7–100% (Kantayos, Bae, 2019b). В приведенных примерах изучены разные сорта сои, в связи с чем можно предположить, что уровень регенерации определяется не только составом среды, но и генотипом.

В работе G. Raza et al. (2017) при добавлении в питательную среду БАП (1,67 мг/л), ГК (0,5), ИУК (0,1 мг/л) и витамина В5 удалось добиться высоких показателей регенерации – от 70% до 100% (см. табл. 1).

В работе Е. С. Ефремовой с соавторами проводили оценку регенерационного потенциала при агробактериальной трансформации, использовали среду МС с добавлением 6-БАП (1,13 мг/л) и ГК (0,5 мг/л). Эффективность регенерации эксплантов составила 36–56% (Efremova et al., 2017).

Ряд авторов не добавляли витамины в состав питательных сред (Varlamova et al., 2018; Mangena, Mokwala, 2019; Mangena et al., 2020; Aslam et al., 2020), при этом уровень регенерации достоверно не отличался от данных других исследователей. Так, уровень регенерации на среде без витаминов (Aslam et al., 2020) составил 80%, с витаминами – 100% (Raza et al., 2017).

Приведенные примеры показывают, что качественный и количественный состав питательной среды и регуляторов роста в ней оказывают влияние на развитие эксплантов всех изученных разными авторами генотипов.

Влияние типа экспланта

При введении в культуру *in vitro* использовали семена сои, а для получения эмбрионного каллуса разные авторы применяли различные виды эксплантов: сегменты стебля, семядольные узлы, гипокотили и др. (Soto et al., 2013; Sojková et al., 2016; Efremova et al., 2017; Varlamova et al., 2018; Kantayos, Bae, 2019a, 2019b; Raza et al., 2017, 2020; Aslam et al., 2020; Mangena et al., 2020).

В качестве эксплантов для регенерации одного генотипа сои были использованы семядольные узлы, уровень регенерации достигал 96,8% (Soto et al., 2013). В более поздних работах других авторов, проведенных на аналогичных эксплантах одного-двух образцов сои, удалось достичь 80% регенерирующих эксплантов (Mangena, 2020). Отметим, что аппроксимировать полученные результаты на другие эксперименты с другими образцами сои не представляется возможным, поскольку вывода об

эффективности того или иного типа экспланта для расширенной выборки на основании изучения единичных генотипов сделать нельзя.

G. Raza et al. (2017) получили высокий процент регенерации (до 100% регенерирующих эксплантов) в экспериментах по генетической трансформации при использовании цельных гипокотилей и семядольных узлов. Регенерационная способность у половинок гипокотилей тех же образцов составила до 87%. В более поздней работе те же авторы для того же набора сортов сои в качестве эксплантов использовали незрелые семядоли (Raza et al., 2020); при этом был получен уровень регенерации от 0 до 85% в зависимости от генотипа. Не очень понятен авторский выбор незрелых семядолей в качестве экспланта, поскольку в более ранней работе тех же авторов с тем же набором сортов был получен более высокий процент регенерации других типов экспланта (цельные гипокотили и семядольные узлы).

В работе Н. В. Варламовой с соавторами (Varlamova et al., 2018) при использовании в качестве экспланта сегментов стебля регенерация составила 12,3–51,2%. Авторы при этом не уточняли, какие именно части стебля использовали в работе.

V. Kantayos и C. H. Bae (2019) в своем эксперименте с образцами сои использовали три типа экспланта (семядоли, семядольный узел, гипокотиль), причем только один (семядольный узел) из них показал высокую регенерационную способность: 66,7–100%. Таким образом, наиболее эффективный тип экспланта, по их данным – семядольные узлы (Kantayos, Bae, 2019b). Одновременно, в 2019 году, те же авторы проводили эксперимент с образцами гороха, в качестве экспланта были взяты семядольные узлы, которые проявили регенерацию от 25 до 100%, что, по мнению авторов, было обусловлено не только и не столько типом экспланта, а, вероятнее всего, добавлением в питательную среду БАП в различных концентрациях (0–4 мг/л).

Таким образом, эффективность регенерации зависит от экспланта: в рассмотренных работах чаще всего были использованы семядольные узлы. Экспланты показывали хороший уровень (до 100%) регенерации в культуре *in vitro*.

Влияние генотипа

Н. В. Варламова с соавторами (Varlamova et al., 2018) выявили достоверные отличия по уровню регенерации в зависимости от генотипа: у образца Линия 1476 регенерация составила 25–51,2%, у образца Линия 1477 – от 12,3 до 27%. Однако отметим, что для окончательного вывода о роли генотипа требуется большее число изученных образцов.

J. Sojková et al. (2016) утверждают, что регенерация достоверно зависела от генотипа ($p \leq 0,001$). Так, регенерация сортов составила: 'Merlin' – 36,6% и 'Gallec' – 37,7%, а самые низкие показатели были у сортов 'Naya' (5,7%) и 'Silensia' (8,0%). По данным авторов, низкий уровень регенерации может быть связан со стрессовой реакцией растений на культивирование в условиях *in vitro*.

В работе Raza et al. (2017) регенерация составила 70% у сорта 'Snowy' и 100% у сорта 'Bunya'. У других сортов процент регенерации составил: 80% – 'Bragg' и 90% – 'Moon B1'. Наиболее сильное влияние генотипа отмечено авторами при использовании бобов в качестве экспланта: в зависимости от генотипа уровень регенерации был от 0 до 85% (Raza et al., 2017, 2020).

V. Kantayos и С. Н. Bae (2019b) изучали в своей работе пять генотипов сои и получили различный уровень регенерации – от 0 до 100% (см. табл. 1). Авторы отметили, что регенерация не зависит от генотипа, а определяется типом экспланта, а самым сильнодействующим фактором, по их мнению, является состав и концентрация регуляторов роста в питательной среде. Однако результаты других авторов с данным выводом не согласуются.

Заключение

Анализ всех описанных факторов показал, что эффективность регенерации сои в культуре *in vitro* зависит от содержания в питательной среде регуляторов роста (часто встречающиеся – БАП, ИУК, кинетин) и витаминов (B5), источников углевода (мальтоза, сахароза, глюкоза, фруктоза), а также от генотипа и типа экспланта. В перспективе развития работ по геномному редактированию образцов сои наиболее целесообразно использовать в качестве экспланта семядольные узлы, семядоли и сегменты стебля проростков, полученных из семян.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 21-66-00012.

This work was supported by the Russian Science Foundation project № 21-66-00012.

References / Литература

- Abugalieva S. Genetic diversity of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Biotechnology. Theory and practice*. 2013;(4):13-19. [in Russian] (Абугалиева С. Генетическое разнообразие сои (*Glycine max* (L.) Merrill). *Биотехнология. Теория и практика*. 2013;(4):13-19). DOI: 10.11134/btp.4.2013.2
- Abugalieva S.I., Volkova L.A., Zhidovinova A.V., Ledovskoy Yu.S., Turuspekov E.K. Genotyping of soybean varieties in Kazakhstan using ISSR markers. *Bulletin of Kazakh National University. Experimental Biology*. 2010;(3)8-11. [in Russian] (Абугалиева С.И., Волкова Л.А., Жидовинова А.В., Ледовской Ю.С., Туруспеков Е.К. Генотипирование сортов сои Казахстана с использованием ISSR-маркеров. *Вестник Казахского национального университета. Серия биологическая*. 2010;(3) 8-11).
- Aslam M.M., Karanja J.K., Zhang Q., Lin H., Xia T., Akhtar K. et al. *In vitro* regeneration potential of white lupin (*Lupinus albus*) from cotyledonary nodes. *Plants*. 2020;9(3):318. DOI: 10.3390/plants9030318
- Bakulina A.V., Shirokikh I.G. Increasing of barley productivity and adaptability by using genetic modification technologies. *Agricultural Science Euro-North-East*. 2019;20(1):5-19. [in Russian] (Бакулина А.В., Широких И.Г. Подходы к повышению продуктивности и адаптивности ячменя с помощью технологической генетической модификации. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2019;20(1):5-19). DOI: 10.30766/2072-9081.20.1.05-19
- Bragina V.V., Kocheva N.S. Study of cultural practices of new soybean varieties under the conditions of the Primorsky region. *Bulletin of Altai State Agricultural University*. 2017;8(154):33-38. [in Russian] (Брагина В.В., Кочева Н.С. Изучение агротехнических приемов возделывания новых сортов сои в условиях Приморского края. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2017;8(154):33-38).
- Ceasar S.A., Rajan V., Prykhodzhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S. Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1863(9):2333-2344. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.06.009
- Chylinski K., Makarova K.S., Charpentier E., Koonin E.V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(10):6091-6105. DOI: 10.1093/nar/gku241
- Efremova O.S., Shkryl Yu.N., Veremeichik G.N. Regeneration potential *in vitro* of soybean varieties in agrobacterial transformation. *Agrarny vestnik Primorya = Agrarian Bulletin of Primorye*. 2017;4(8):21-23. [in Russian] (Ефремова О.С., Шкрыль Ю.Н., Веремеичик Г.Н. Регенерационный потенциал *in vitro* сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) при агробактериальной трансформации. *Аграрный вестник Приморья*. 2017;4(8):21-23).
- Feng C., Hou A., Chen P., Cornelious B., Shi A., Zhang B. Genetic diversity among popular historical southern U.S. soybean cultivars using AFLP markers. *Journal of Crop Improvement*. 2008;22(1):31-46. DOI: 10.1080/15427520802042879
- Gasiunas G., Siksnys V. RNA-dependent DNA endonuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing? *Trends in Microbiology*. 2013;21(11):562-567. DOI: 10.1016/j.tim.2013.09.001
- Glazko V.Yu., Dubin A.V., Calendar R.N., Glazko G.V., Sherepitko V.I., Sozinov A.A. Genetic relationships between soybean varieties assessed using ISSR markers. *Cytology and Genetics*. 1999;33(5):47-51. [in Russian] (Глазко В.Ю., Дубин А.В., Календарь Р.Н., Глазко Г.В., Шерепитко В.И., Созинов А.А. Генетические взаимоотношения между сортами сои, оцененные с использованием ISSR-маркеров. *Цитология и генетика*. 1999;33(5):47-51).
- Kantayos V., Bae C.H. Optimization of shoot Induction, Histological study and genetic stability of *in vitro* cultured *Pisum sativum* cv. 'Sparkle'. *Korean Journal of Plant Resources*. 2019a;32(1):19-28. DOI: 10.7732/kjpr.2019.32.1.019
- Kantayos V., Bae C.H. Optimized shoot induction and histological study of *in vitro* cultured Korean soybean cultivars. *Korean Journal of Plant Resources*. 2019b;32(3):237-243. DOI: 10.7732/kjpr.2019.32.3.237
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29-37. DOI: 10.18699/VJ19.458
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/CAS system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):250-258. [in Russian] (Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2):250-258). DOI: 10.18699/VJ17.244
- Kozyrenko M.M., Fisenko P.P., Artyukova E.V. Analysis of genetic diversity of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars and somaclonal lines by marking of inter-simple sequence repeats. *Biotechnology*. 2007;(1):1-15.
- Leenay R.T., Beisel C.L. Deciphering, communicating, and engineering the CRISPR PAM. *Journal of Molecular Biology*. 2017;429(2):177-191. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.11.024

- Lomov N., Borunova V., Rubtsov M.A. CRISPR/Cas9 technology for targeted genome editing. *Biopolymers and Cell*. 2015;31(4):243-248. DOI: 10.7124/bc.0008E7
- Luo M.L., Leenay R.T., Beisel C.L. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 2016;113(5):930-943. DOI: 10.1002/bit.25851
- Lysenko Y. TOP-10 soybean producers in the world in 2019 (TOP-10 proizvoditeley soyi v mire v 2019 godu. Latifundist.com. 2020). [in Russian] (Лысенко Ю. ТОП-10 производителей сои в мире в 2019 году. Latifundist.com. 2020). URL: <https://latifundist.com/rating/top-10-proizvoditelej-soi-v-mire-v-2019-godu> [дата обращения: 19.01.2021].
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems – tools of discovery. *Acta Naturae*. 2014;6(3):19-40. DOI: 10.32607/20758251-2014-6-3-19-40
- Novikova L.Yu., Seferova I.V., Nekrasov A.Yu., Perchuk I.N., Shelenga T.V., Samsonova M.G. et al. Impact of weather and climate on seed protein and oil content of soybean in the North Caucasus. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(6):708-715. [in Russian] (Новикова Л.Ю., Сеферова И.В., Некрасов А.Ю., Перчук И.Н., Шеленга Т.В., Самсонова М.Г. и др. Влияние погодноклиматических условий на содержание белка и масла в семенах сои на Северном Кавказе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(6):708-715). DOI: 10.18699/VJ18.414
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*. 2015;13(11):722-736. DOI: 10.1038/nrmicro3569
- Mangena P. Benzyl adenine in plant tissue culture-succinct analysis of the overall influence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed and shoot culture establishment. *Journal of Biotech Research*. 2020;11(1):23-34.
- Mangena P., Mokwala P.W. The influence of seed viability on the germination and *in vitro* multiple shoot regeneration of soybean (*Glycine max* L.). *Agriculture*. 2019;9(2):35. DOI: 10.3390/agriculture9020035
- Marchisio M.A., Huang Z. CRISPR-Cas type II-based synthetic biology applications in eukaryotic cells. *RNA Biology*. 2017;14(10):1286-1293. DOI: 10.1080/15476286.2017.1282024
- Mora Vasquez S., García-Lara S., Cardineau G.A. Phenotypic traits of Mexican soybean seeds and their correlation with *in vitro* shoot induction and susceptibility to *Agrobacterium* infection. *Acta Botanica Mexicana*. 2019;126:e1421:1-12. DOI: 10.21829/abm126.2019.1421
- Mudibu J., Nkongolo K.K.C., Mehes-Smith M., Kalonji-Mbuyi A. Genetic analysis of a soybean genetic pool using ISSR marker: Effect of gamma radiation on genetic variability. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*. 2011;5(3):235-245. DOI: 10.3923/ijpb.2011.235.245
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Raza G., Singh M.B., Bhalla P.L. *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International*. 2017;2017:7379693. DOI: 10.1155/2017/7379693
- Raza G., Singh M.B., Bhalla P.L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars. *Plants*. 2020;9(1):38. DOI: 10.3390/plants9010038
- Sainger M., Chaudhary D., Dahiya S., Jaiwal R., Jaiwal P.K. Development of an efficient *in vitro* plant regeneration system amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation of a recalcitrant grain legume blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2015;21(4):505-517. DOI: 10.1007/s12298-015-0315-1
- Salina E.A. Genome modeling and editing technologies for solving the breeding challenges. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2016;30(9):9-14. [in Russian] (Салина Е.А. Технологии геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции растений. *Достижения науки и техники АПК*. 2016;30(9):9-14).
- Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W. et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 2010;463(7278):178-183. DOI: 10.1038/nature08670
- Seferova I.V., Novikova L.Yu. Climatic factors affecting the development of early soybean accessions in the environments of the Russian Northwest. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2015;176(1):88-97. [in Russian] (Сеферова И.В., Новикова Л.Ю. Климатические факторы, влияющие на развитие скороспелых образцов сои в условиях Северо-Запада РФ. *Труды по прикладной ботанике генетике и селекции*. 2015;176(1):88-97). DOI: 10.30901/2227-8834-2015-1-88-97
- Seferova I.V., Vishnyakova M.A. Soybean gene pool from VIR collection for the promotion of agronomical area of the crop to the north. *Legumes and Groat Crops*. 2018;3(27):41-47. [in Russian] (Сеферова И.В., Вишнякова М.А. Генофонд сои из коллекции ВИР для продвижения агрономического ареала культуры к северу. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018;3(27):41-47). DOI: 10.24411/2309-348X-2018-11030
- Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*. 2017;15(3):169-182. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.184
- Sojková J., Žur I., Gregorová Z., Zimová M., Matusikova I., Mihálik D. et al. *In vitro* regeneration potential of seven commercial soybean cultivars (*Glycine max* L.) for use in biotechnology. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2016;15(1):1-11. DOI: 10.1515/nbec-2016-0001
- Soto N., Ferreira A., Delgado C., Enriquez G.A. *In vitro* regeneration of soybean plants of the Cuban Incasoy-36 variety. *Biotechnología Aplicada*. 2013;30(1):29-38.
- Strygina K.V., Khlestkina E.K. Wheat, barley and maize genes editing using the CRISPR/Cas system. *Biotechnology and Plant Breeding*. 2020;3(1):46-56. [in Russian] (Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Редактирование генов пшеницы, ячменя и кукурузы с использованием системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):46-56). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o2
- Tikhonova N.G., Khlestkina E.K. Genetic editing for improvement of fruit and small fruit crops. *Horticulture and viticulture*. 2019;4(4):10-15. [in Russian] (Тихонова Н.Г., Хлесткина Е.К. Генетическое редактирование для улучшения плодовых и ягодных культур. *Садоводство и виноградарство*. 2019;4(4):10-15). DOI: 10.31676/0235-2591-2019-4-10-15
- Tolmacheva A.V. Influence of agrometeorological conditions on the growth of soybean culture. *Bulletin of Odessa State Environmental University*. 2013;15(1):89-94. [in Russian] (Толмачева А.В. Влияние агрометеорологиче-

ских условий на произрастание культуры сои. *Вісник Одеського державного екологічного університету = Вестник Одесского государственного экологического университета*. 2013;(15):89-94).

- Varlamova N.V., Rodionova M.A., Efremova L.N., Kharchenko P.N., Vysotskii D.A., Khaliluev M.R. Indirect shoot organogenesis of soybean *Glycine max* (L.) Merr. from stem segments and use of the explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Agricultural Biology*. 2018;53(3):521-530. [in Russian] (Варламова Н.В., Родионова М.А., Ефремова Л.Н., Харченко П.Н., Высоцкий Д.А., Халилуев М.Р. Индукция непрямого органогенеза побегов сои *Glycine max* (L.) Merr. из сегментов стебля для применения в качестве эксплантов при агробактериальной трансформации. *Сельскохозяйственная биология*. 2018;53(3):521-530). DOI: 10.15389/agrobiology.2018.3.521rus
- Vinichenko N.A., Salina E.A., Kochetov A.V. The scope of use of molecular markers in soybean breeding. *Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(3):107-125. DOI: 10.18699/Letters2020-6-15
- Vlasov V.V., Medvedev S.P., Zakian S.M. "Editors" of genomes from "zinc fingers" to CRISPR ("Redactory" genomov ot "tsinkovykh paltsev" do CRISPR). *Science First Hand*. 2014;2(56):44-53. [in Russian] (Власов В.В., Медведев С.П., Закиан С.М. «Редакторы» геномов от «цинковых пальцев» до CRISPR. *Наука из первых рук*. 2014;2(56):44-53).
- Xu D.H., Abe J., Gai J.Y., Shimamoto Y. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: Evidence for multiple origins of cultivated soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002;105:645-653. DOI: 10.1007/s00122-002-0972-7
- Xu D.H., Gai J.Y. Genetic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis. *Plant Breeding*. 2003;122(6):503-506. DOI: 10.1046/j.0179-9541.2003.00911.x
- Zhumagulova Zh.B. Improvement of biotechnological methods for preserving the pear gene pool (Sovershenstvovaniye biotekhnologicheskikh metodov sokhraneniya genofonda grushi) [dissertation]: Almaty: Kazakh National Agrarian University; 2014. [in Russian] (Жумагулова Ж.Б. Совершенствование биотехнологических методов сохранения генофонда груши: дис. ... доктора философии. Алматы: Казахский национальный аграрный университет; 2014). URL: https://www.kaznaru.edu.kz/page/dissovet/dissovet_2014/disserzhumagulova.pdf [дата обращения: 26.02.2021].

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

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

Для цитирования / How to cite this article

Беспалова Е.С., Ершова К.М., Ухатова Ю.В. Регенерация сои в культуре *in vitro* (обзор). Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021;182(4):148-155. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-148-155

Bespalova E.S., Ershova K.M., Ukhatoeva Yu.V. *In vitro* regeneration of soybean (a review). Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding. 2021;182(4):148-155. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-4-148-155

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

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-4-148-155>

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

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Bespalova E.S. <https://orcid.org/0000-0002-7298-9212>

Ershova K.M. <https://orcid.org/0000-0002-9593-146X>

Ukhatoeva Yu.V. <https://orcid.org/0000-0001-9366-0216>