

doi 10.18699/vjgb-25-54

Особенности генетического картирования локусов, влияющих на образование эмбриогенного каллуса и регенерацию растений *in vitro* у зерновых и бобовых культур

Е.К. Потокина , А.С. Сущенко 

Сколковский институт науки и технологий (Сколтех), Москва, Россия
 e.potokina@skoltech.ru

Аннотация. Рекальцитрантность определяется как неспособность видов или отдельных генотипов растений к эффективной регенерации и/или трансформации в культуре *in vitro* и представляет собой самое существенное ограничение для геномного редактирования сельскохозяйственных культур. Для разработки протоколов генотип-независимой трансформации и регенерации культурных растений необходимы знания о генетических факторах, детерминирующих рекальцитрантность у различных видов растений в условиях *in vitro*. Поиск их путем классического картирования QTL для признаков эффективности каллусообразования, регенерации, трансформации в расщепляющихся популяциях считается сложным и трудоемким процессом из-за специфичной природы анализируемых фенотипов и сильной взаимосвязи «генотип – среда». В статье приводится обзор методологии, перспектив и наиболее ярких достижений «прямой» генетики в идентификации генетических детерминант рекальцитрантности у самых востребованных и одновременно наиболее трудных для работы *in vitro* зерновых и бобовых культур. Приведены примеры генетического картирования и успешного клонирования генов, отвечающих за разные аспекты рекальцитрантности у злаков. Так, установлено, что формирование быстро пролиферирующего эмбриогенного каллуса II типа у кукурузы определяется повышенной экспрессией гена *Wox2a*. Популярный в Японии сорт риса Koshihikari плохо регенерирует в культуре *in vitro* из-за нарушенного метаболизма нитратов, так как отличается низким уровнем экспрессии нитритредуктазы (*NiR*), преобразующей нитрит в аммиак. Побурение каллуса, встречающееся среди многих видов растений и приводящее к снижению регенерационной способности, у сортов риса (*Oryza sativa* ssp. *indica*) зависит от уровня экспрессии гена *Browning of Callus 1* (*BOC1*), который кодирует белок SRO (Similar to RCD One), регулирующий реакцию растения на окислительный стресс. Аналогичные работы по картированию локусов для признаков соматического эмбриогенеза у сои позволили обнаружить мажорные (major) QTL, объясняющие 45 и 26 % изменчивости признака. Исследования по генетическому картированию локусов, влияющих на эффективность регенерации и эмбриогенеза у рекальцитрантных видов растений, имеют очевидные перспективы в связи с появлением аннотированных референсных геномов, высокопроизводительного генотипирования и генетических карт с высоким разрешением.

Ключевые слова: растения; *in vitro*; генотип-зависимая регенерация; рекальцитрантность; генетический контроль; QTL морфогенетических признаков

Для цитирования: Потокина Е.К., Сущенко А.С. Особенности генетического картирования локусов, влияющих на образование эмбриогенного каллуса и регенерацию растений *in vitro* у зерновых и бобовых культур. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(4):508-516. doi 10.18699/vjgb-25-54

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 24-26-00073).

Genetic mapping of loci affecting embryogenic callus formation and *in vitro* regeneration in cereals and leguminous crops

Е.К. Potokina , A.S. Sushchenko 

Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech), Moscow, Russia
 e.potokina@skoltech.ru

Abstract. Recalcitrance is defined as the inability of plant species or individual genotypes to effectively regenerate and/or to be transformed in *in vitro* culture, and is the most significant limitation for genome editing of agricultural crops. To develop protocols for genotype-independent transformation and regeneration of cultivated plants, knowledge of the genetic factors that determine recalcitrance in various plant species under *in vitro* conditions is required. Their search by classical QTL mapping in populations segregating for callus formation efficiency, regeneration, and transformation is considered a complex and labor-intensive process due to a specific nature of the analyzed phenotypes and a strong genotype-environment relationship. The article provides an overview

of the methodology, prospects, and most outstanding achievements of “forward” genetics in identifying genetic determinants of recalcitrance in the most popular and at the same time most difficult to work with *in vitro* cereal and legume crops. Examples of genetic mapping and successful cloning of genes responsible for various aspects of recalcitrance in cereals are discussed. Thus, it was found that the formation of rapidly proliferating type II embryogenic callus in maize is determined by increased expression of the *Wox2a* gene. The Koshihikari rice variety, popular in Japan, poorly regenerates *in vitro* due to impaired nitrate metabolism, since it has a low expression level of nitrite reductase (*NiR*), which converts nitrite into ammonia. Callus browning, which occurs among many plant species and leads to a decrease in regenerative capacity and even to plant death, in rice varieties (*Oryza sativa* ssp. *indica*) depends on the expression level of the *Browning of Callus1* (*BOC1*) gene, which encodes the SRO protein (Similar to RCD One), regulating the plant response to oxidative stress. Similar studies on mapping loci for somatic embryogenesis traits in soybean have revealed major QTLs explaining 45 and 26 % of phenotypic variation. Studies on genetic mapping of loci affecting the efficiency of regeneration and embryogenesis in recalcitrant plant species have obvious prospects due to the emergence of annotated reference genomes, high-throughput genotyping and high-resolution genetic maps.

Key words: plants; *in vitro*; genotype-dependent regeneration; recalcitrance; genetic control; QTLs of morpho-genetic traits

For citation: Potokina E.K., Sushchenko A.S. Genetic mapping of loci affecting embryogenic callus formation and *in vitro* regeneration in cereals and leguminous crops. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):508-516. doi 10.18699/vjgb-25-54

Введение

Значительные достижения последних лет в области геномного редактирования растений способствовали росту числа новых форм, сортов и клонов с внесенными мутациями, представляющих интерес для сельскохозяйственной практики. В 2017 г. сообщалось о 20 возделываемых культурах, для совершенствования которых была использована технология CRISPR/Cas9 (Ricroch et al., 2017), к 2020 г. геномное редактирование было применено уже к 40 культурам в 25 странах с целью повышения их урожайности и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам (Menz et al., 2020). Однако если классифицировать текущее состояние проектов по геномному редактированию культурных растений как пять последовательных этапов разработки и внедрения: 1) открытие; 2) доказательство концепции; 3) ранняя разработка; 4) продвинутая разработка; 5) коммерциализация, то к 2022 г. основная часть таких разработок была на стадии «ранних», и только геномное редактирование риса отнесилось к категории «продвинутой разработки» (Pixley et al., 2022). Отсутствие новых коммерческих сортов, усовершенствованных с использованием CRISPR/Cas9, объясняется не только ограничениями со стороны законодательства, но еще и тем, что у большинства видов культурных растений только малое количество протестированных генотипов оказывается способным к регулярному и эффективному развитию эмбрионных и регенерируемых тканей в стандартных условиях культивирования *in vitro* (Nam et al., 1997; Salvo et al., 2018; Nivya, Shah, 2023; Nagle et al., 2024).

Рекальцитрантность (recalcitrance) *in vitro* определяется как неспособность клеток, тканей и органов растения реагировать на манипуляции в культуре ткани (Benson, 2000). При этом рекальцитрантность касается не только регенерации, но и эффективности трансформации: иногда успешно регенерирующие клетки не удается трансформировать с использованием *Agrobacterium*, и наоборот, успешно трансформированные клетки не регенерируют. Неспособность растений к эффективной регенерации и/или трансформации – самое существенное ограничение

для трансгенеза и геномного редактирования сельскохозяйственных культур (Altpeter et al., 2016).

Традиционный подход преодоления рекальцитрантности растений в культуре *in vitro* – работа по оптимизации внешних факторов, включая состав базовой среды, pH, условия освещения, типы эксплантов и др. В большинстве случаев программа развития клеток растений изменяется путем добавления в среду регуляторов роста – ауксинов и цитокининов. При этом выбор регуляторов роста, их последовательность и время воздействия обычно определяются эмпирически для каждого вида и часто корректируются для каждого генотипа (Altpeter et al., 2016). В то же время в результате исследований, направленных на выявление генетических и эпигенетических механизмов, контролирующих соматический эмбриогенез и формирование каллуса, стало возможно более тонко манипулировать этими процессами с использованием гормональных сигналов (Maren et al., 2022).

В технологии трансформации однодольных и рекальцитрантных видов двудольных значительным достижением стало манипулирование так называемыми морфогенами (morphogenic genes) с целью перепрограммирования соматических клеток для инициации эмбриогенеза. К таким морфогенам относят, в частности, ключевые регуляторы развития и детерминации меристематических клеток, такие как *Baby Boom* (*BBM*), *Wuschel* (*WUS*) и *Wuschel-Related Homeobox* (*WOX*) (Chen Z. et al., 2022).

Развитие методов «обратной» генетики привело к тому, что на сегодняшний день известно несколько десятков морфогенов, регулирующих рост и развитие растений в культуре *in vitro*. В англоязычной научной литературе появился термин “fine-tuning”, означающий точную настройку уровня экспрессии ключевых морфогенов, обеспечивающую успешную трансформацию и регенерацию растений в культуре *in vitro* (Maren et al., 2022). Например, с помощью такой настройки экспрессии морфогенов *BBM* и *WUS2* удалось индуцировать соматический эмбриогенез и регенерировать из каллусов незрелого зародыша фертильные трансгенные растения кукурузы, сорго и сахар-

ного тростника (Lowe K. et al., 2016). В этом исследовании низкий уровень экспрессии гена *WUS2* под низкоэффективным у однодольных промотором нопалин-синтазы (Nos:ZmWUS2) комбинировался с повышенной экспрессией гена *BBM* под «сильным» промотором убиквитина кукурузы (ZmUbi:ZmBBM). В результате такого «тюнинга» экспрессии двух морфогенов у кукурузы удалось получить трансформированные фертильные растения из 40 % каллусов инбредной линии Pioneer PHN5G, которая ранее не поддавалась трансформации с использованием биобаллистики или агробактерии. Для кукурузы на сегодняшний день описано уже 53 потенциальных морфогена, влияющих на эффективность регенерации и трансформации, причем манипулирование наиболее эффективными из них – транскрипционными факторами ZmWIND1 и ERF/AP2 – позволяет повысить частоту каллусообразования на 60.22–47.85 % и трансформацию на 16.56–37.2 % в зависимости от генотипа (Jiang et al., 2024).

Десятки подобных примеров успешного манипулирования экспрессией морфогенов для эффективной трансформации сельскохозяйственных культур (кукурузы, риса, пшеницы, тритикале, ячменя, сорго, сои, свеклы, рапса, томата, перца, картофеля, репы, винограда) (Chen Z. et al., 2022) свидетельствуют о том, что разработка протоколов генотип-независимой трансформации и регенерации культурных растений со временем может стать не столько искусством, сколько технологией. Однако для этого необходимы знания о генетических факторах, влияющих на соматический эмбриогенез, формирование эмбрионного каллуса и регенерацию различных видов культурных растений *in vitro*. Поиск их путем классического картирования QTL для признаков эффективности каллусообразования, регенерации, трансформации в расщепляющихся популяциях считается сложным и трудоемким процессом из-за специфичной природы анализируемых фенотипов и сильной взаимосвязи «генотип – среда», влияющей на отзывчивость растения к манипуляциям в культуре *in vitro* (McFarland et al., 2023).

Цель настоящей работы – обзор методологии, перспектив и наиболее впечатляющих достижений «прямой» генетики (forward genetics) в идентификации генетических детерминант рекальцитрантности у самых востребованных и одновременно наиболее трудных для работы *in vitro* зерновых и бобовых культур.

Картирование локусов, негативно влияющих на регенерацию зерновых культур

Вопросам низкой регенерационной способности эксплантов *in vitro* и генотип-зависимой трансформации злаков в литературе уделяется основное внимание, потому что именно эти культуры обеспечивают большую часть калорий, потребляемых человечеством (Chen Z. et al., 2022). У многих важных зерновых, таких как рис, пшеница, ячмень и кукуруза, на протяжении нескольких десятилетий эмбрионные, регенерирующие культуры каллусной ткани были присущи только нескольким генотипам, что ограничивало возможности селекции этих сельскохозяйственных культур с использованием биотехнологий (Kausch et al., 2021).

Показательным примером является поиск локусов, определяющих генотип-специфичную регенерационную способность инбредных линий кукурузы (McFarland et al., 2023). Несколько генотипов кукурузы, а именно H99 (Duncan et al., 1985), B104 (Frame et al., 2011) и LH244 (Altschul et al., 1990), способны в культуре *in vitro* образовывать медленно растущий, компактный, очень гетерогенный эмбрионный каллус I типа. С биотехнологической точки зрения гораздо предпочтительнее работать с эмбрионным каллусом II типа, более рыхлым, быстро пролиферирующим, с высокой эмбрионностью и способностью к регенерации. Этот тип каллуса был обнаружен у единственной инбредной линии A188 более 40 лет назад (Green, Phillips, 1975). С тех пор, несмотря на активный поиск новых подходящих для манипулирования в культуре *in vitro* линий кукурузы, высокоэмбрионный каллус II типа так и оставался особенностью единственного генотипа A188 и его производных (McFarland et al., 2023). Многочисленные попытки оптимизировать состав культуральной среды позволили несколько повысить эффективность каллусообразования и регенерацию фертильных трансгенных растений (Gordon-Kamm et al., 1990). Однако добиться эффективной регенерации трансгенных растений кукурузы удалось только для нескольких генотипов, которые не представляли интереса с агрономической точки зрения (McFarland et al., 2023).

Как ответ на вызов со стороны практической селекции уже в 1970-х годах была инициирована селекционная программа по созданию «культуральных» (culturable) линий кукурузы путем скрещивания уникальной линии A188 с инбредной линией B73, ценной с селекционной точки зрения, но рекальцитрантной в культуре *in vitro* (Russell, 1972). В результате серии рекуррентных беккроссов были получены линии с интрогрессивным фрагментом A188 на хромосоме 3, обуславливающей способность к регенерации (Armstrong et al., 1992). Еще десятилетие спустя путем дополнительных скрещиваний удалось получить «культуральные» линии, наследующие всего 15 % своего генома от A188 (Lowe B.A. et al., 2006). На этом этапе идентифицировать каузативный ген все еще не удавалось, но были обнаружены сцепленные с ним молекулярные маркеры. С опубликованием в 2009 г. референсного генома линии B73 кукурузы, а также с появлением инструментов высокопроизводительного генотипирования (Illumina 55k Maize SNP Chip) стало возможным провести более точное картирование QTL для признака «способность к образованию эмбрионного каллуса в культуре *in vitro*», при использовании все того же материала от скрещивания контрастных по признаку родителей A188 и B73, преобразованного в почти изогенные и дигаплоидные линии. В результате искомым интервалом на хромосоме 3 удалось сузить до 3035 Гб (Salvo et al., 2018).

В 2023 г. после проведенной серии дополнительных беккроссов с использованием аннотированного референсного генома родительской линии B73 выявлено 93 потенциальных гена-кандидата. По результатам анализа их транскрипции методом RNAseq было идентифицировано три наиболее вероятных кандидата, повышенная экспрессия которых в эксплантах была достигнута с применением

векторов с «сильным» промотором убиквитина кукурузы (ZmUbi1). Это позволило оценить влияние уровня экспрессии потенциальных генов-кандидатов на развитие эмбрионного каллуса. Как итог впервые был идентифицирован ген *Wox2a*, детерминирующий QTL способности к образованию эмбрионного каллуса, который был картирован в популяции потомков от скрещивания инбредных линий кукурузы A188 и B73. Различия в структурной части гена *Wox2a* у контрастных родительских генотипов оказались минимальными, но промоторная область совпала только на 69 %. Был сделан вывод, что именно повышенная экспрессия гена *Wox2a*, вероятно, и стала причиной образования эмбрионного каллуса II типа у линии A188 (McFarland et al., 2023).

Пример успешного клонирования гена, влияющего на регенерацию и эмбриогенез, описан у риса, для которого эффективная система культуры *in vitro* ранее была разработана на модельных сортах, таких как Nipponbare (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) и Kasalath (*O. sativa* ssp. *indica*). При этом многие ведущие сорта, используемые для производства продуктов питания в Японии, такие как, например, сорт Koshihikari, имели низкую способность к регенерации в культуре зрелых зародышей, что было серьезным препятствием для эффективного производства трансгенных растений (Nishimura et al., 2005). Рекальцитрантный генотип Koshihikari формировал каллусы, которые в культуре ткани неизменно приобретали коричневый оттенок и никогда не давали начало зеленым побегам. Контрастный генотип Kasalath, использованный для скрещивания с Koshihikari, наоборот отличался способностью формировать жизнеспособные каллусы, из которых успешно регенерировали новые побеги.

Признак «способность к регенерации» (число регенерировавших из каллуса побегов) был картирован в популяции 99 потомков поколения BC1F1 с применением 262 ПЦР-маркеров, равномерно распределенных по 12 хромосомам риса. Четыре достоверных QTL были картированы на хромосомах 1, 2, 3 и 6, и во всех этих локусах аллели Kasalath оказывали позитивный эффект на способность растений к регенерации. QTL на хромосоме 1 показал максимальный эффект, он был обозначен как *PSR1* (Promoter of Shoot Regeneration 1) и подвергнут более детальному генетическому картированию (fine map-based cloning) с использованием 3800 рекомбинантов поколения BC3F2. Искомый хромосомный интервал удалось сузить до 50.8 кб, но для идентификации гена *PSR1* потребовалось сконструировать ВАС (Bacterial Artificial Chromosome) библиотеку из геномной ДНК сорта Kasalath, в которой был найден клон BHAL15, покрывающий искомый участок генома. Далее несколько последовательностей, покрывающих возможные гены-кандидаты, были субклонированы из BHAL15 и использованы для трансформации каллусов рекальцитрантного генотипа Koshihikari. Один из таких фрагментов, размером 12.2 кб, перекрывающий последовательность гена-кандидата *NiR*, кодирующего ферредоксин-нитритредуктазу, восстанавливал регенерационную способность каллусов Koshihikari и на этом основании был идентифицирован как каузативный ген для рассматриваемого признака.

Сравнение последовательностей гена *NiR* у сортов Koshihikari и Kasalath выявило несколько SNP и вставок-делетий, особенно в промоторной области гена. Обнаруженные мутации в структурной части гена вели всего к двум консервативным аминокислотным заменам в кодируемом белке, с другой стороны, уровень экспрессии этого гена у рекальцитрантного сорта Koshihikari был в 2.5 раза ниже, чем у сорта Kasalath. Интересен также факт, что у сорта Koshihikari, помимо полноразмерного транскрипта *NiR*, был найден также транскрипт с удержанным (третьим) интроном. Пониженная экспрессия *NiR* у Koshihikari, по-видимому, приводила к нарушению метаболизма нитратов у этого сорта риса, так как в этом метаболическом пути нитратредуктаза катализирует восстановление нитратов до нитритов, а нитритредуктаза (NirBD) преобразует нитрит в аммиак. Нарушенный метаболизм нитратов, вероятно, послужил причиной низкой эмбриогенности каллусов сорта риса Koshihikari.

Еще один пример позиционного картирования (positional mapping) локусов рекальцитрантности у риса касается эффекта побурения каллуса в культуре *in vitro*, характерного для сортов широко распространенного подвида *O. sativa* ssp. *indica* (Zhang K. et al., 2020). Побурение каллуса встречается среди многих видов растений и приводит к снижению регенерационной способности, плохому росту *in vitro* и гибели растений (He et al., 2009). Использование антиоксидантов, адсорбирующих агентов, низких концентраций солей и регуляторов роста может в определенной степени уменьшить последствия побурения каллуса, но универсального решения этой проблемы не существует (Zhang K. et al., 2020).

Для поиска локусов, ответственных за побурение каллуса у риса, была создана популяция потомков от скрещивания генотипа YJCWR дикорастущего вида *O. rufipogon* Griff., относительно устойчивого к побурению каллуса (донор), и элитного сорта Teqing (*O. sativa* ssp. *indica*) (реципиент). В популяции гибридов была выделена линия YIL25, у которой показатели частоты и степени побурения каллусов были значительно ниже, чем у Teqing, при этом у линии YIL25 обнаружены интрогрессии от родителя-донора YJCWR на хромосомах 2, 3 и 5.

От беккроссирования линии YIL25 с родителем-реципиентом Teqing была получена популяция из 198 линий BC1F2, которая была генотипирована с помощью микросателлитных маркеров и использована для картирования QTL признака «степень побурения каллуса». QTL на хромосоме 3 объяснял 14 % наблюдаемой изменчивости. Для картирования этого QTL с более высоким разрешением фракция BC1F2 линий, гетерозиготных в интервале QTL, была подвергнута самоопылению, в результате чего получено 6377 рекомбинантов. Генотипирование этих рекомбинантов с применением SNP-маркеров позволило сузить интервал QTL до 18.6 кб, в котором была идентифицирована только одна кодирующая последовательность, LOC_Os03g12820, аннотированная с помощью референсного генома (The Rice Genome Annotation Project Database). Сравнение последовательности этого гена у контрастных по анализируемому признаку родительских линий Teqing и YIL25 не выявило полиморфизма в структурной части,

но в промоторной зоне у сорта Teqing были обнаружены делеция в 337 п. н., 1 п. н. и 3 SNP. Последовательность LOC_Os03g12820, таким образом, идентифицирована как ген-кандидат *Browning of Callus1 (BOC1)*, влияющий на побурение каллуса.

Сравнительный анализ уровня экспрессии *BOC1* у родительских генотипов YIL25 и Teqing показал различие почти в 2 раза, причем максимальных значений эта разница достигала, начиная с 21-го дня культивирования каллуса, а на более ранних стадиях не проявлялась. Дополнительные эксперименты на протопластах с конструкциями, представляющими собой различные варианты мутаций в промоторе *BOC1*, интегрированные в вектор pGreenII 0800-LUC, позволили оценить влияние этих мутаций на уровень экспрессии репортерного гена люциферазы (*LUC*) и установить, что именно инсерция 337 нуклеотидов в промоторе *BOC1* у генотипа YIL25, устойчивого к побурению каллуса, значительно повышает уровень экспрессии этого гена в каллусной культуре. Выяснилось также, что вставка 337 п. н. в промоторе гена *BOC1* является транспозоном (Tourist MITE), и присутствие этой вставки не только уменьшает побурение каллуса у сортов риса, но и повышает в 2.5 раза эффективность трансформации. *BOC1* кодирует белок SRO (Similar to RCD One), который регулирует ответную реакцию растения на окислительный стресс.

В период 2000–2020 гг. опубликовано как минимум 16 работ, посвященных генетическому картированию QTL признаков рекальцитрантности у злаков, но только шесть из них сообщают в виде конечного результата идентифицированные гены-кандидаты (QTG) (Lardon, Geelen, 2020). Для обнаружения последних не всегда использовался долгий кропотливый путь позиционного картирования генетических локусов с несколькими скрещиваниями и получением тысяч рекомбинантов. Например, у ячменя единственный поддающийся агробактериальной трансформации сорт – это Golden Promise (Hisano, Sato, 2016).

Для выявления локусов, обеспечивающих «культурабельность» данного сорта, проведено скрещивание Golden Promise и рекальцитрантного генотипа Haruna Nijo. Было выделено 3013 незрелых зародышей из зерновок F₂, которые были инокулированы *Agrobacterium tumefaciens* с плазмидой, несущей репортерный ген устойчивости к гидромидину *HPT (hygromycin phosphotransferase)*. Из 3013 инокулированных эксплантов 293 образовали каллусы на селективной среде, из 60 таких каллусов регенерировали полноценные растения (Hisano, Sato, 2016). Анализ ДНК этих 60 растений показал наличие трансгена *HPT*, а сам факт регенерации данных растений из каллуса свидетельствовал о том, что они унаследовали от Golden Promise аллели в локусах, критичных для процессов трансформации и регенерации, которыми не обладал родитель Haruna Nijo. Такие локусы *TFA* (transformation amenability) были идентифицированы на хромосоме 2 (*TFA2*, *TFA3*) и хромосоме 3 (*TFA1*), и доверительный интервал каждого из этих QTL в среднем составлял 40 сМ.

На следующем этапе был получен ответ на вопрос, не локализованы ли в этих обширных хромосомных интервалах уже известные для злаков гены транскрипционных

факторов *BBM* и *WUS2*. Для этого последовательности данных генов у кукурузы были использованы для поиска гомологичных последовательностей в геноме ячменя, и оказалось, что гомолог *BBM* ячменя попадает в интервал *TFA2*, а гомолог *WUS2* – в интервал *TFA1* (Hisano et al., 2017). Хотя в исследовании не приводилось прямых доказательств о влиянии морфогенов *BBM* и *WUS2* на эффективность трансформации ячменя, было показано, что интрогрессии участков хромосом 2 и 3, где локализованы эти гены, от сорта Golden Promise в желательный генотип ячменя помогают достичь трансформации уровня 15.5–23.7 %, что можно считать высоким результатом, так как для самого сорта Golden Promise эффективность трансформации составляет примерно 30 % (Hisano et al., 2017).

При использовании расщепляющихся популяций от скрещивания двух родителей удается картировать локусы, отличающиеся аллелями у конкретной родительской пары. С появлением высокопроизводительного генотипирования стало возможным проанализировать изменчивость признаков, связанных с образованием каллуса, регенерацией и соматическим эмбриогенезом, на больших выборках неродственных генотипов, с помощью анализа ассоциаций (genome wide association mapping, GWAS). Так, 510 генотипов риса было генотипировано с помощью нескольких тысяч SNP, найденных путем секвенирования этой глобальной выборки на Illumina HiSeq 2000 (Zhang Z. et al., 2019).

Был выполнен анализ ассоциаций локусов (SNP) и изменчивости трех признаков образования каллуса: частоты индукции каллуса (callus induction rate, CIR), скорости индукции каллуса (callus induction speed, CIS) и времени первого появления каллуса (time of the first callus appearance, T0). Первые два признака, CIR и CIS, коррелировали между собой ($r^2 = 0.881$), корреляция между T0 и двумя другими признаками была низкой (–0.337 и 0.286). В результате идентифицировано 88 достоверно сцепленных локусов: 33 локуса для CIR, 31 для CIS, и 24 для T0, причем выявленные локусы для трех признаков не перекрывались. Из 88 обнаруженных локусов 21 был идентифицирован в пределах интервалов QTL, ранее картированных для риса в других исследованиях. Среди прочих для частоты индукции каллуса были предложены гены-кандидаты *CRL1*, *OsBMM1* и *OsSET1*, являющиеся ортологами генов *LBD17/LBD29*, *BBM* и *SWN* у арабидопсиса, у которого роль этих генов в формировании каллуса была доказана ранее (Boutillier et al., 2002; Chanvivattana et al., 2004; Fan et al., 2012).

Аналогичное исследование полногеномных ассоциаций проведено для признака «частота индукции каллуса» на 110 образцах риса (ssp. *indica*), генотипированных с 2385475 SNP-маркерами (Kamolsukyeunyoung et al., 2024). Особенностью этого исследования было то, что признак тестировался на трех культуральных средах: B5 (Гамборга), MS (Мурасиге–Скуга) и N6 (CHU). Примечательно, что на разных средах на индукцию каллуса влияли различные локусы: для среды B5 такой QTL был картирован на хромосоме 6, для среды MS – на хромосомах 2 и 6, на среде N6 на индукцию каллуса влияли четыре QTL, два на хромосоме 6, еще два QTL – на хромосомах 7 и 11. Как и

в предыдущем исследовании, интервалы картированных QTL не перекрывались. Это означало, что на разных культуральных средах на успешную индукцию каллуса влияют разные гены. Этот яркий пример отчасти объясняет, почему картирование QTL для признаков, связанных с индукцией каллусов и последующим получением фертильных трансгенных растений, не является сегодня популярным направлением исследований, – слишком много факторов, которые могут повлиять на воспроизводимость результатов.

Еще одна сложность анализа ассоциаций состоит в том, что GWAS позволяет найти интересные закономерности, касающиеся физиологических механизмов изучаемых признаков, однако редко заканчивается идентификацией каузативных генов. Чаще для последующего детального исследования предлагаются гены в непосредственной близости с достоверно ассоциированным SNP или гаплотипы в обнаруженном участке хромосомы, различающиеся по проявлению признака.

Картирование локусов эффективности трансформации и способности к каллусогенезу у зернобобовых культур

Широко распространенные зернобобовые культуры трибы Phaseoleae (соя, фасоль, вигна), а также горох и новая культура – гуар, относятся к рекальцитрантным в культуре *in vitro* растениям, в отличие от представителей некоторых других бобовых – люцерны и лядвенца (Nivya, Shah, 2023). У наиболее популярной культуры – сои – эффективность регенерации и трансформации зависит от конкретного генотипа и приемлема для немногих сортов, таких как, например, Jack (Yang et al., 2009) или Williams, Williams79 и Williams82 (Xu et al., 2022).

Сообщается о двух особенностях поведения бобовых культур в условиях *in vitro* (Nivya, Shah, 2023). Во-первых, эффективность регенерации может быть достаточно высокой, но при условии отсутствия каких-либо попыток трансформации, подразумевающей селективный прессинг. Причины этого явления неизвестны, хотя оптимизация протоколов трансформации может улучшить ситуацию (Bekalu et al., 2023). Во-вторых, в большинстве опубликованных экспериментов по бобовым не удалось показать наследование трансгенов или отредактированных генов в поколении T1 (Nivya, Shah, 2023). Причина этой низкой наследуемости трансгенов, скорее всего, – химерность регенерантов, у которых остаются нетрансформированными клетки меристемы цветка, дающие начало гаметам, что в конечном итоге также объясняется низкой эффективностью трансформации.

Несмотря на очевидные трудности с преодолением рекальцитрантности бобовых *in vitro*, работы по картированию морфогенов для этой группы культурных растений весьма редки и не сопоставимы по масштабам с аналогичными исследованиями у злаков.

Так, например, соя является популярным объектом «обратной» генетики морфогенов (Chen F. et al., 2019; Nao et al., 2019), однако известно всего два исследования по картированию QTL в двуродительских (biparental) популяциях – для признаков эффективности соматического эмбриогенеза (Song et al., 2010) и индукции каллуса (Yang

et al., 2011). В первом исследовании была создана популяция из 126 рекомбинантных инбредных линий (RIL) от скрещивания сорта Peking (более высокая способность к соматическому эмбриогенезу) и сорта Keburi (низкая способность). Популяция была генотипирована микросателлитными маркерами, и для признака «частота соматического эмбриогенеза» на хромосоме C2(6) были картированы весьма достоверные QTL, объясняющие очень высокий процент наблюдаемой изменчивости – 45.2 % (Satt307) и 25.97 % (Satt286). Такой значимый эффект может указывать на присутствие так называемых мажорных генов (major loci) в этих интервалах хромосомы 6 у сои. Дополнительные QTL с менее выраженным эффектом (6–7 %) были идентифицированы на хромосомах “H” и “G”, что соответствует хромосомам 12 и 18, согласно современной номенклатуре (https://www.soybase.org/about/lgs_and_chromosomes/). Второе исследование по картированию QTL для признака «частота индукции каллуса, CIF» было выполнено на популяции RIL от скрещивания сортов Kefeng (CIF = 0.69) и Nannong (CIF = 0.86). Самый значимый QTL для этого признака был картирован на хромосоме 14 (B2) и объяснял 16.6 % наблюдаемой изменчивости (Song et al., 2010).

Пример поиска ассоциаций (GWAS) для признаков, связанных с культурой *in vitro* у бобовых, показан для арахиса (Luo et al., 2024). Для того чтобы выявить образцы, потенциально способные к регенерации, D. Luo с коллегами сравнили результаты генотипирования 353 образцов арахиса из 26 стран с их способностью образовывать в культуре *in vitro* эмбриогенный каллус. Зародыши, изолированные из стерилизованных семян, были помещены на MS-среду с витаминами; субкультивирование эксплантов на свежую среду производилось каждые 4 недели. Сообщается, что после шестого пассажа физиологическое состояние каллуса начало стабилизироваться, и количество каллусов регистрировалось в каждой из седьмой, восьмой и девятой субкультур (T7, T8 и T9 соответственно).

Картируемый признак «частота каллусообразования» вычислялся как отношение количества образовавшихся каллусов к исходному количеству эксплантов для каждого пассажа отдельно. Для генотипирования популяции были использованы 864 179 SNP и 71 052 InDel. Коэффициент корреляции между частотой каллусообразования в субкультурах T7, T8 и T9 варьировал от 0.56 до 0.61. В результате проведения GWAS обнаружено 23 достоверно ассоциированных SNP для субкультуры T7, 30 SNP – для T8 и 8 SNP – для T9. Важный факт – в этом исследовании для всех трех пассажей идентифицирован один и тот же интервал на хромосоме 13, содержащий несколько SNP, ассоциированных с признаком. Этот факт может свидетельствовать о присутствии локуса со значимым эффектом (major QTL) на хромосоме 13 у арахиса. Самый достоверный SNP в этом участке хромосомы обнаружен в гене, кодирующем пероксисомальный ABC-транспортер 1, влияющий на процессы роста и развития растений (Baker et al., 2015).

Еще один SNP из того же интервала вносил аминокислотную замену в ген *Arahy.MLX90M*, кодирующий фактор ответа на ауксин (auxin response factor 19). В доверительный интервал на хромосоме 13 попали также

SNP в непосредственной близости от гена, кодирующего MYB транскрипционный фактор. У кукурузы гены этого семейства задействованы в формировании эмбрионного каллуса посредством передачи сигнала гиббереллина (Ge et al., 2016).

Проблемы и перспективы поиска генетических детерминант рекальцитрантности у растений с использованием генетического картирования

Картирование QTL, контролирующее способность к регенерации и трансформации, на сегодняшний день трудно назвать широко распространенным исследовательским подходом для преодоления рекальцитрантности *in vitro* у растений. Основная причина заключается в том, что картированные QTL часто специфичны для конкретных условий эксперимента, – результаты зависят от конкретной культуральной среды, на которой выращиваются экспланты, или от конкретной стадии развития экспланта, на которой начинает проявляться изменчивость признака. Часто обнаруженные QTL отражают полиморфизм, присущий только конкретной родительской паре, и не всегда картирование QTL заканчивается идентификацией гена-кандидата.

Тем не менее очевидно, что низкая эффективность регенерации и трансформации многих видов культурных растений сильно ограничивает возможности, которые предоставляет технология CRISPR-Cas для улучшения агрономических показателей сельскохозяйственных культур. Опыт показывает, что знания о ключевых генах «глобальных» транскрипционных факторов, экспрессия которых способна стимулировать пролиферацию клеток, позволяют решить эту проблему биотехнологическими методами. Примером такого подхода служит работа J.M. Debernardi с коллегами (2020), в которой создана конструкция, экспрессирующая химерный белок, сочетающий транскрипционный фактор Growth-Regulating Factor 4 (GRF4) пшеницы и его кофактор GRF-Interacting Factor 1 (GIF1). Факторы GRF опосредуют взаимодействие между белками, между белками и ДНК, а гены *GRF* высококонсервативны у покрытосеменных, голосеменных и мхов, что свидетельствует об их фундаментальном значении для процессов роста и развития (Omidbakhshfar et al., 2015).

Экспрессия химерного белка GRF4–GIF1 в каллусах тетраплоидной пшеницы позволила повысить регенерацию в 7.8 раза и существенно сокращала сроки получения регенерантов. Такой же эффект наблюдался при трансформации той же конструкцией *GRF4–GIF1* каллусов тритикале и риса (Debernardi et al., 2020), а также в экспериментах с ячменем (Timonova et al., 2023). J.M. Debernardi с коллегами выявили, что гомологи пшеничных генов *GRF4–GIF1*, экспрессируемые в эпикотиле цитруса Carrizo (гибрид *Citrus triptera* × *C. sinensis*), также повышали регенерацию в 4.7 раза по сравнению с эксплантами, трансформированными с вектором без вставки *GRF–GIF* (Debernardi et al., 2020). Это показывает, что такой подход может быть использован и для преодоления рекальцитрантности у видов двудольных, в частности у бобовых.

У сои, например, на сегодняшний день идентифицировано 22 гена семейства *GmGRFs* (*Glycine max* GRFs), локализованных на 14 хромосомах (Chen F. et al., 2019). Еще одно семейство транскрипционных факторов, WUSCHEL-related homeobox (WOX), представлено у сои 33 генами, причем из 19 хромосом сои эти гены отсутствуют только на одной хромосоме 16 (Hao et al., 2019). В связи с этим эксперименты по картированию QTL эффективности регенерации и трансформации помогли бы выяснить, экспрессия каких именно генов этих семейств «глобальных» транскрипционных факторов обладает наибольшим эффектом на регенерацию растений в культуре. Так, например, приведенное выше исследование по картированию у сои QTL, объясняющего 26 % изменчивости частоты соматического эмбриогенеза (Song et al., 2010), указывает на присутствие возможных генов-кандидатов на хромосоме 6 в районе расположения микросателлитного маркера Satt286 (физическая позиция ~16171913 п.н.). Один из генов семейства *GRF* – *GmGRF5* (Glyma.06G134600) – расположен на физическом расстоянии ~5 Мб от маркера Satt286, в позиции ~11067587 п.н. Учитывая, что среднее генетическое расстояние между маркерами на использованной карте составляло 28.4 сМ, можно предположить сцепление между маркером Satt286 и геном *GmGRF5*.

Генетическое картирование – далеко не единственный способ идентификации морфогенетических регуляторов. Для их поиска также используются мультиомиксные подходы. Например, X. Liu с коллегами (2023) идентифицировали 446 ключевых транскрипционных факторов, регулирующих индукцию каллуса у пшеницы, комбинируя сразу три омиксных подхода: RNA-seq, ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) и CUT&Tag (Cleavage Under Targets and Tagmentation). По результатам профилирования транскриптома и анализа динамики эпигенетических изменений, сопровождающих процесс регенерации из ткани незрелых зародышей пшеницы сорта Fielder, X. Liu с коллегами выявили два новых гена, *TaDOF5.6* и *TaDOF3.4*, сверхэкспрессия которых достоверно повышала индукцию каллусогенеза и эффективность трансформации у сортов пшеницы Fielder, JM22 и Kenong 199.

В настоящее время исследователи, исходя из имеющихся ресурсов, имеют возможность выбирать между мультиомиксным подходом для поиска факторов, влияющих на эффективность регенерации и трансформации растений, с которыми они работают, и классическим методом картирования этих факторов в расщепляющихся популяциях. Последний все еще представляется менее затратным, поэтому исследования по генетическому картированию локусов эффективности регенерации и эмбриогенеза у рекальцитрантных видов имеют очевидную перспективу.

Заключение

Аннотированные референсные геномы, доступные для многих видов культурных растений, а также современные возможности генотипирования и построения генетических карт высокого разрешения могут существенно упростить поиск генов, уровень экспрессии или аллельный полиморфизм которых влияет на поведение растений в культуре *in vitro*.

Список литературы / References

- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 2016;28(7):1510-1520. doi 10.1105/tpc.16.00196
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-410. doi 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Armstrong C.L., Romero-Severson J., Hodges T.K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor Appl Genet*. 1992;84(5-6):755-762. doi 10.1007/BF00224181
- Baker A., Carrier D.J., Schaedler T., Waterham H.R., van Roermund C.W., Theodoulou F.L. Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(5):959-965. doi 10.1042/BST20150127
- Bekalu Z.E., Panting M., Bæksted Holme I., Brinch-Pedersen H. Opportunities and challenges of *in vitro* tissue culture systems in the era of crop genome editing. *Int J Mol Sci*. 2023;24(15):11920. doi 10.3390/ijms241511920
- Benson E.E. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2000;36:141-148. doi 10.1007/s11627-000-0029-z
- Boutillier K., Offringa R., Sharma V.K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C.M., van Lammeren A.A., Miki B.L., Custers J.B., van Lookeren Campagne M.M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*. 2002;14:1737-1749. doi 10.1105/tpc.001941
- Chanvivattana Y., Bishopp A., Schubert D., Stock C., Moon Y.H., Sung Z.R., Goodrich J. Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*. 2004;131(21):5263-5276. doi 10.1242/dev.01400
- Chen F., Yang Y., Luo X., Zhou W., Dai Y., Zheng C., Liu W., Yang W., Shu K. Genome-wide identification of GRF transcription factors in soybean and expression analysis of *GmGRF* family under shade stress. *BMC Plant Biol*. 2019;19(1):269. doi 10.1186/s12870-019-1861-4
- Chen Z., Debernardi J.M., Dubcovsky J., Gallavotti A. Recent advances in crop transformation technologies. *Nat Plants*. 2022;8(12):1343-1351. doi 10.1038/s41477-022-01295-8
- Debernardi J.M., Tricoli D.M., Ercoli M.F., Hayta S., Ronald P., Palatnik J.F., Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnol*. 2020;38(11):1274-1279. doi 10.1038/s41587-020-0703-0
- Duncan D.R., Williams M.E., Zehr B.E., Widholm J.M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*. 1985;165(3):322-332. doi 10.1007/BF00392228
- Fan M., Xu C., Xu K., Hu Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*. 2012;22(7):1169-1180. doi 10.1038/cr.2012.63
- Frame B., Main M., Schick R., Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. In: Thorpe T., Yeung E. (Eds) Plant Embryo Culture. Methods in Molecular Biology. Vol. 710. Humana Press, 2011;327-341. https://doi 10.1007/978-1-61737-988-8_22
- Ge F., Luo X., Huang X., Zhang Y., He X., Liu M., Lin H., Peng H., Li L., Zhang Z., Pan G., Shen Y. Genome-wide analysis of transcription factors involved in maize embryonic callus formation. *Physiol Plant*. 2016;158(4):452-462. doi 10.1111/ppl.12470
- Gordon-Kamm W., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R. Jr., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P., Lemaux P.G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*. 1990;2(7):603-618. doi 10.1105/tpc.2.7.603
- Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Sci*. 1975;15(3):417-421. doi 10.2135/cropsci1975.0011183X001500030040x
- Hao Q., Zhang L., Yang Y., Shan Z., Zhou X.A. Genome-wide analysis of the WOX gene family and function exploration of GmWOX18 in soybean. *Plants*. 2019;8(7):215. doi 10.3390/plants8070215
- He Y., Guo X., Lu R., Niu B., Pasapula V., Hou P., Cai F., Xu Y., Chen F. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2009;98:11-17. doi 10.1007/s11240-009-9533-y
- Hisano H., Sato K. Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. *Sci Rep*. 2016;6(1):37505. doi 10.1038/srep37505
- Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on *TFA* (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the *TFA* loci. *Plant Cell Rep*. 2017;36(4):611-620. doi 10.1007/s00299-017-2107-2
- Jiang Y., Wei X., Zhu M., Zhang X., Jiang Q., Wang Z., Cao Y., An X., Wan X. Developmental regulators in promoting genetic transformation efficiency in maize and other plants. *Curr Plant Biol*. 2024;40:100383. doi 10.1016/j.cpb.2024.100383
- Kamolsukyeunyoung W., Dabbhadatta Y., Jaiprasert A., Thunnom B., Poncheewin W., Wanchana S., Ruanjaichon V., Toojinda T., Burns P. Genome-wide association analysis identifies candidate loci for callus induction in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*. 2024;13(15):2112. doi 10.3390/plants13152112
- Kausch A.P., Wang K., Kaeppler H.F., Gordon-Kamm W. Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Mol Breed*. 2021;41(6):38. doi 10.1007/s11032-021-01225-0
- Lardon R., Geelen D. Natural variation in plant pluripotency and regeneration. *Plants*. 2020;9(10):1261. doi 10.3390/plants9101261
- Lowe B.A., Way M.M., Kumpf J.M., Rout J., Warner D., Johnson R., Armstrong C.L., Spencer M.T., Chomet P.S. Marker assisted breeding for transformability in maize. *Mol Breed*. 2006;18:229-239. doi 10.1007/s11032-006-9031-4
- Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.J., Scelonge C., Lenderts B., Chamberlin M., Cushatt J., Wang L., Ryan L., Khan T., Chow-Yiu J., Hua W., Yu M., Banh J., Bao Z., Brink K., Igo E., Rudrappa B., Shamseer P.M., Bruce W., Newman L., Shen B., Zheng P., Bidney D., Falco C., Register J., Zhao Z.Y., Xu D., Jones T., Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*. 2016;28(9):1998-2015. doi 10.1105/tpc.16.00124
- Liu X., Bie X.M., Lin X., Li M., Wang H., Zhang X., Yang Y., Zhang C., Zhang X.S., Xiao J. Uncovering the transcriptional regulatory network involved in boosting wheat regeneration and transformation. *Nat Plants*. 2023;9(6):908-925. doi 10.1038/s41477-023-01406-z
- Luo D., Shi L., Sun Z., Qi F., Liu H., Xue L., Li X., Liu H., Qu P., Zhao H., Dai X., Dong W., Zheng Z., Huang B., Fu L., Zhang X. Genome-wide association studies of embryogenic callus induction rate in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Genes*. 2024;15(2):160. doi 10.3390/genes15020160
- Maren N.A., Duan H., Da K., Yencho G.C., Ranney T.G., Liu W. Genotype-independent plant transformation. *Hortic Res*. 2022;9:uhac047. doi 10.1093/hr/uhac047
- McFarland F.L., Collier R., Walter N., Martinell B., Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. A key to totipotency: *Wuschel*-like *homeobox 2a* unlocks embryogenic culture response in maize (*Zea mays* L.). *Plant Biotechnol J*. 2023;21(9):1860-1872. doi 10.1111/pbi.14098
- Menz J., Modrzejewski D., Hartung F., Wilhelm R., Sprink T. Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment. *Front Plant Sci*. 2020;11:586027. doi 10.3389/fpls.2020.586027

- Nagle M.F., Yuan J., Kaur D., Ma C., Peremyslova E., Jiang Y., Niño de Rivera A., Jawdy S., Chen J.G., Feng K., Yates T.B., Tuskan G.A., Muchero W., Fuxin L., Strauss S.H. GWAS supported by computer vision identifies large numbers of candidate regulators of *in planta* regeneration in *Populus trichocarpa*. *G3*. 2024;14(4):jkae026. doi 10.1093/g3journal/jkae026
- Nam J., Matthyse A.G., Gelvin S.B. Differences in susceptibility of Arabidopsis ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*. 1997;9:317-333. doi 10.1105/tpc.9.3.317
- Nishimura A., Ashikari M., Lin S., Takashi T., Angeles E.R., Yamamoto T., Matsuoka M., Khush G.S. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(33):11940-11944. doi 10.1073/pnas.0504220102
- Nivya V.M., Shah J.M. Recalcitrance to transformation, a hindrance for genome editing of legumes. *Front Genome Ed*. 2023;5:1247815. doi 10.3389/fgeed.2023.1247815
- Omidbakhshfard M.A., Proost S., Fujikura U., Mueller-Roeber B. Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Mol Plant*. 2015;8(7):998-1010. doi 10.1016/j.molp.2015.01.013
- Pixley K.V., Falck-Zepeda J.B., Paarlberg R.L., Phillips P.W., Slamet-Loedin I.H., Dhugga K.S., Campos H., Gutterson N. Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. *Nat Genet*. 2022;54(4):364-367. doi 10.1038/s41588-022-01046-7
- Ricroch A., Clairand P., Harwood W. Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg Top Life Sci*. 2017;1(2):169-182. doi 10.1042/etls20170085
- Russell W.A. Registration of B70 and B73 parental lines of maize (Reg. Nos. PL16 and PL17). *Crop Sci*. 1972;12:721. doi 10.2135/cropsci1972.0011183X001200050085x
- Salvo S., Cook J., Carlson A.R., Hirsch C.N., Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. Genetic fine-mapping of a quantitative trait locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize (*Zea mays* L.). *Plant Genome*. 2018;11(2):170111. doi 10.3835/plantgenome2017.12.0111
- Song X., Han Y., Teng W., Sun G., Li W. Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Rep*. 2010;29(2):125-131. doi 10.1007/s00299-009-0804-1
- Timonova E.M., Kiseleva A.A., Bereznaia A.A., Nesterov M.A., Adonina I.G., Kochetov A.V., Salina E.A. Modification of agricultural traits in cultivated varieties of barley and wheat. *Ecol Genet*. 2023;21:24-25. doi 10.17816/ecogen568184
- Xu H., Guo Y., Qiu L., Ran Y. Progress in soybean genetic transformation over the last decade. *Front Plant Sci*. 2022;13:900318. doi 10.3389/fpls.2022.900318
- Yang C., Zhao T., Yu D., Gai J. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) – impacts of mannitol, abscisic acid, and explant age. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2009;45:180-188. doi 10.1007/s11627-009-9205-y
- Yang C., Zhao T., Yu D., Gai J. Mapping QTLs for tissue culture response in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Mol Cells*. 2011;32(4):337-342. doi 10.1007/s10059-011-0063-1
- Zhang K., Su J., Xu M., Zhou Z., Zhu X., Ma X., Hou J., Tan L., Zhu Z., Cai H., Liu F., Sun H., Gu P., Li C., Liang Y., Zhao W., Sun C., Fu Y. A common wild rice-derived BOC1 allele reduces callus browning in indica rice transformation. *Nat Commun*. 2020;11(1):443. doi 10.1038/s41467-019-14265-0
- Zhang Z., Zhao H., Li W., Wu J., Zhou Z., Zhou F., Chen H., Lin Y. Genome-wide association study of callus induction variation to explore the callus formation mechanism of rice. *J Integr Plant Biol*. 2019;61(11):1134-1150. doi 10.1111/jipb.12759

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.10.2024. После доработки 26.11.2024. Принята к публикации 05.12.2024.