

УДК 58.036.5:581.143.6:633.111.1

О.О. Авксентьева*, В.В. Жмурко, В.В. Чумакова

Морфогенетичні реакції калюсної культури *Triticum aestivum* L. за тривалої дії низьких позитивних температур

UDC 58.036.5:581.143.6:633.111.1

О.О. Avksentieva*, V.V. Zhmurko, V.V. Chumakova

Morphogenetic Responses of *Triticum aestivum* L. Callus Culture During Long-Term Effect of Low Positive Temperatures

Реферат: У роботі представлено результати дослідження впливу холодової експозиції при 4°C на хлорофіло-, гемо- та ризо-генез у калюсній культурі сортів пшениці м'якої озимої. Було встановлено закономірності процесів морфогенезу у культурі *in vitro* пшениці м'якої озимої за різної тривалості дії (15, 30 та 45 діб) позитивної пониженої температури. Використовували калюсну культуру 2–3-го пасажів сортів — Дорідна, Статна та Астет. Результати експериментів показали, що за попередньої яровизації калюсів протягом 30 та 45 діб значною мірою стимулюються хлорофіло- та гемогенез, під час подальшого культивування це підвищує частоту отримання рослин-регенерантів. Ефективність даних процесів залежить від генотипу вихідного сорту та тривалості дії холодової обробки. Припускається, що у калюсній культурі пшениці м'якої озимої може відбуватися яровизація, пов'язана з експресією генів *VRN*, яка проявляється у зміні процесів морфогенезу.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., калюсна культура *in vitro*, гени *VRN*, яровизація, морфогенетичні реакції, хлорофілогенез, гемогенез, ризогенез.

Abstract: The paper presents the findings on the impact of cold exposure at 4°C on chlorophylogenesis, hemogenesis and rhizogenesis in callus culture of winter wheat cultivars. The patterns of morphogenesis in the soft winter wheat *in vitro* culture during exposure to positive low temperature of various durations (15, 30 and 45 days) have been established. The callus culture of 2–3 passages of cv. Doridna, Statna and Astet was used. The results of experiments showed the preliminary vernalization of calluses for 30 and 45 days to strongly stimulate the chlorophylogenesis and hemogenesis, thereby increasing the frequency of obtaining the regenerant plants during further cultivation. The efficiency of these processes depended on the original cultivar genotype and cold treatment duration. The vernalization, associated with the *VRN* genes expression, manifested in morphogenesis change, was assumed to occur in the soft winter wheat *in vitro* culture.

Key words: *Triticum aestivum* L., *in vitro* callus culture, *VRN* genes, vernalization, morphogenetic responses, chlorophylogenesis, hemogenesis, rhizogenesis.

Пшениця м'яка озима — основна продовольча культура в світовому землеробстві та Україні [7], тому дослідження закономірностей її росту і розвитку на різних рівнях організації має вирішальне значення для стабільності врожаїв [8].

Для створення нових та більш досконалих сортів пшениці м'якої озимої широко використовуються методи фітобіотехнології — культивування рослин в умовах *in vitro* [5]. На даний час розробляються різні підходи до дослідження морфогенетичних процесів у калюсних культурах, вивчається вплив зовнішніх факторів з метою розробки технології створення стійких до несприятливих умов середовища сортів [7, 14, 21]. Знижену температуру застосовують як фактор підвищення ефективності андрогенезу. Показано, що витримування колосся пшениці та ячменю, бутонів картоплі та тютюну за 7–14°C сприяє збільшен-

Soft winter wheat is a major food crop in the world and Ukrainian agriculture [16], therefore to study the patterns of its growth and development at different organization levels is of crucial importance for crop stability [17].

The phytobiotechnology tools *i. e. in vitro* plant culture have been widely used to create the novel and more advanced soft winter wheat cultivars [11]. Currently, various approaches to investigate the morphogenesis in callus cultures are developed, and the impact of external factors is under study to design the technology for creating the cultivars resistant to adverse environmental conditions [2, 15, 16]. The low positive temperature is used as a factor of increasing the androgenesis efficiency. The exposure of wheat and barley ears, potato and tobacco buds at 7–14°C was shown to augment the embryoid number [8]. The impact of low

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

майдан Свободи, 4, м. Харків, Україна 61022;
тел.: (+38 057) 707-54-82
електронна пошта: avksentyeva@karazin.ua

*To whom correspondence should be addressed:

4, Svobody Sq., Kharkiv, Ukraine 61022;
tel.: +380 57 707 5482
e-mail: avksentyeva@karazin.ua

Надійшла 06.10. 2021

Прийнята до друку 07.09.2022

Received 06, October, 2021

Accepted 07, September, 2022

© 2022 O.O. Avksentieva, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ню кількості ембріодів [4]. Вплив зниженої температури на процеси морфогенезу в калюсних культурах досліджено недостатньо. Наразі даний фактор використовують тільки для виявлення стресових реакцій у калюсах, зокрема, холодо- і морозостійкості, накопичення природних кріопротекторів (білків, вуглеводів) [16, 20]. Такі роботи набувають важливого значення для розширення наявних уявлень про закономірності перебігу процесів морфогенезу в культурі *in vitro* пшениці м'якої озимої. Проте не визначена роль генів *VRN* у регуляції морфогенезу. Відомо, що ці гени детермінують потребу в яровизації, необхідній для переходу рослин пшениці озимої в генеративний стан [10, 18, 19]. На даний час досить глибоко досліджені фенотипові ефекти генів *VRN* на темпи розвитку пшениці озимої [11, 22], а також молекулярно-біологічні механізми їхньої експресії [12, 13]. Слід зазначити, що вплив генів *VRN* на морфогенетичні процеси в культурі *in vitro* практично не вивчений, хоча роботи у цьому напрямі важливі для розуміння механізмів стабільності генетичних систем регуляції розвитку пшениці озимої в умовах порушення цілісності рослинного організму. Відомо, що у даній культурі гени *VRN* знаходяться в рецесивному стані, але під впливом яровизації відбувається їх експресія, що необхідно для переходу рослин до колосіння та плодоношення [10, 18]. Ймовірно, вплив пониженої температури на калюсну культуру може зумовити експресію генів *VRN*, що подібно до процесів у рослинах або проростках пшениці озимої в умовах *in vivo*.

Мета роботи — встановлення характеру та інтенсивності морфогенетичних процесів у культурі *in vitro* пшениці м'якої озимої за різної тривалості дії зниженої температури.

Матеріали і методи

У дослідженні були використані три сорти пшениці м'якої озимої *Triticum aestivum* L. — Дорідна, Статна і Астет (створені в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України), які є високопродуктивними, стійкими до абіотичних та біотичних чинників, мають підвищену морозостійкість. Досліджувані сорти внесені до Державного реєстру сортів рослин України.

Для виконання експерименту проводили температуральну яровизацію озимої пшениці: калюси первинної культури витримували в умовах зниженої температури (4°C) протягом 15, 30 і 45 діб за умов культивування на живильному середовищі Мурасиге і Скуга (МС) із додаванням 2 мг/л 2,4 дихлорфеноксиоцтової кислоти. Після тер-

positive temperature on morphogenesis in callus cultures has remained poorly studied. Currently, this factor is only used to detect the stress responses in calluses, in particular, cold and frost resistance, accumulation of natural cryoprotectants (proteins, carbohydrates) [7, 14]. These reports are of great importance to expand the existing ideas about the morphogenesis course regularities in the soft winter wheat *in vitro* culture. However, the role of *VRN* genes in morphogenesis regulation has not been defined yet. These genes are known to determine the need for vernalization, being necessary for winter wheat plant transition to generative state [10, 13, 23]. At present, the phenotypic effects of *VRN* genes on development rates of winter wheat [12, 18], as well as molecular and biological mechanisms of their expression [1, 22] have been studied quite thoroughly. Notably, that the impact of *VRN* genes on morphogenesis in the *in vitro* culture has remained virtually unstudied, although the research in this direction is important to understand the mechanisms of genetic system stability for regulating the winter wheat development when the plant organism's integrity is compromised. In this culture, the *VRN* genes are known to be in a recessive state, but under vernalization impact their expression occurs, that is necessary for plant transition to earing and fruiting [10, 23]. The impact of positive low temperature on callus culture likely stipulates the *VRN* genes expression, being similar to the *in vivo* processes in the winter wheat plants or seedlings.

The research aim was to explore the nature and intensity of morphogenetic processes in the soft winter wheat *in vitro* culture under exposure to low positive temperature of different duration.

Materials and methods

Here, we have used three cultivars of soft winter wheat *Triticum aestivum* L.: Doridna, Statna and Astet (created at the Plant Production Institute named after V.Ya. Yuryev of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine), being highly productive, resistant to abiotic and biotic factors, and having increased frost resistance. The studied cultivars are included in the State Register of Plant Varieties of Ukraine.

To perform the experiment, the winter wheat was temporarily vernalized, *i. e.* the calluses of the primary culture were exposed to low positive temperature (4°C) for 15, 30 and 45 days, when cultured with Murashige and Skoog (MS) nutrient medium, supplemented with 2 mg/l of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. After thermal induc-



моіндукції калюси пасивували на регенераційне середовище (РС), до складу якого входили середовище МС доповнене фітогормонами: 3 мг/л 6-бензиламінопурину і 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти. Культивували в люмінестаті (інтенсивність освітлення — 2 клк, фотоперіод — 16/8 годин (день/ніч), температура — $(19 \pm 3)^\circ\text{C}$).

Контрольним варіантом були калюси пересадкової культури, які культивували в термостаті при 26°C протягом 15, 30 і 45 діб та одночасно з дослідними зразками пасивували на РС і переносили у люмінестат. Після 4–6 тижнів культивування в контрольних та дослідних калюсах аналізували ефективність хлорофілогенезу (біосинтез хлорофілу), гемогенезу (розвиток надземної частини рослинного організму) та ризогенезу (розвиток кореневої системи).

Для отримання первинної калюсної культури використовували зрілі зародки пшениці, які виділяли із зернівок в асептичних умовах [2, 23]. Далі їх стерилізували 20 хв 15%-м розчином гіпохлориту натрію, тричі промивали (по 10 хв) дистильованою водою, поміщали в стерильні чашки Петрі на вологий фільтрувальний папір і пророщували 36–48 годин до накльовування у термостаті при 26°C . Потім у стерильних умовах ламінар-боксу із зернівок виділяли зародки, які по 7–10 штук поміщали в стерильні чашки Петрі на середовище МС + 2 мг/л 2,4 дихлорфеноксиоцтової кислоти для індукції калюсогенезу. Ізольовані зародки культивували у термостаті в темряві при 26°C . Усі процедури здійснювали за розробленими нами протоколами [2].

У калюсній культурі визначали ефективність калюсогенезу за відсотком зародків, які сформува-ли калюсну тканину (загальна кількість калюсів/загальне число зародків), та ефективність морфогенезу (у відсотках) за показниками хлорофіло-, гемо- та ризогенезу (загальне число морфогенних калюсів/загальна кількість калюсів).

У роботі було проведено три незалежні серії експериментів для кожного сорту пшениці.

Отримані дані статистично обробляли з використанням методу парного порівняння середніх за t-критерієм Стьюдента при $p \leq 0,05$ [3].

Результати та обговорення

Для одержання пересадкової культури (нарощування калюсної тканини) зародки культивували на середовищі МС протягом 25–28 діб. У первинній культурі визначали ефективність калюсогенезу досліджуваних сортів. Результати показали, що за цим показником сорти відрізнялися тільки протягом 7 діб від початку культивування. У сортів Статна і Астет ефективність калюсо-

tion, the calluses were passaged onto regeneration medium (RM), included MS medium supplemented with phytohormones: 3 mg/l of 6-benzylaminopurine and 0.5 mg/l of naphthylacetic acid. Cultivation was carried out in a luminesstat (2 klx illumination intensity, 16/8 hours (day/night) photoperiod, $(19 \pm 3)^\circ\text{C}$ temperature).

The control variants were the calluses of replanting culture, which were cultivated in a thermostat at 26°C for 15, 30 and 45 days, passaged with RM and transferred to a luminesstat simultaneously with the experimental specimens. After 4–6 weeks of cultivation, the control and experimental calluses were analyzed for the efficiency of chlorophyllogenesis (chlorophyll biosynthesis), hemogenesis (development of aerial plant part) and rhizogenesis (root development).

To obtain the primary callus culture, there were used the mature wheat germs, isolated from the caryopses in aseptic conditions [5, 19]. Next, they were sterilized for 20 min with a 15% sodium hypochlorite solution, washed thrice (10 min each) with distilled water, placed in sterile Petri dishes on moist filter paper and germinated for 36–48 hrs in a thermostat at 26°C until swelling. Then, under sterile conditions of laminar box, the germs were isolated from caryopses, and 7–10 of them were placed in sterile Petri dishes on MS medium + 2 mg/l of 2.4 dichlorophenoxyacetic acid for callusogenesis induction. The isolated germs were cultured in a thermostat at dark at 26°C . All the procedures were carried out according to the protocols we developed [5].

In the callus culture, the efficiency of callusogenesis was calculated by the percentage of germs that formed callus tissue (total number of calluses/total number of germs) and that of morphogenesis (in percentage) was done by chlorophyll-, hemo-, and rhizogenesis indices (total number of morphogenic calluses/total number of calluses).

Here, three independent series of experiments were carried out for each wheat cultivar.

The obtained data were statistically processed using the method of pairwise comparison of the means by the Student's t-test at $p \leq 0.05$ [3].

Results and discussion

To obtain a replanting culture (growth of callus tissue), the germs were cultivated with the MS medium for 25–28 days. In the primary culture, the callusogenesis efficiency of the studied cultivars was determined. The findings showed that the cultivars differed by this index within



Ефективність первинного калюсогенезу сортів пшениці м'якої озимої
Efficiency of primary callusogenesis of soft winter wheat cultivars

Сорт пшениці Wheat cultivar	Ефективність калюсогенезу за культивування, % Callusogenesis efficiency under cultivation, %	
	7 діб 7 days	14 діб 14 days
Дорідна Doridna	56,7 ± 2,8	100,0 ± 4,3
Статна Statna	75,0 ± 3,8	100,0 ± 4,5
Астет Astet	75,0 ± 3,8	100,0 ± 4,3

генезу була значно вища у порівнянні з сортом Дорідна. Вірогідно, це пов'язано з генотиповими особливостями досліджуваних сортів, оскільки введення зародків в культуру і морфогенетичні процеси залежать від генотипу донора [16, 17, 24]. На 14-ту добу інкубації у всіх сортів цей показник був однаковим (таблиця).

Одержану пересадкову калюсну культуру використовували для визначення дії зниженої температури на характер та інтенсивність морфогенетичних процесів (рис. 1, А).

Результати показали, що після 15-добової дії зниженої температури у калюсах усіх досліджуваних сортів стимулювався процес хлорофілогенезу, найбільш інтенсивно — у сорту Астет, найменш інтенсивно — у сорту Дорідна (рис. 2, А).

Вірогідно, що різниця сортів пшениці за процесом хлорофілогенезу пов'язана з їхніми генотиповими відмінностями — здатністю утворювати хлорофіл у системі *in vitro* та реакцією на умови культивування калюсів.

Аналіз гомогенезу показав (рис. 2, В), що дія зниженої температури викликала його істотну стимуляцію. При цьому максимальна інтенсивність гомогенезу була у сорту Астет, а мінімальна — у сорту Дорідна. Сорт Астет проявляв тенденцію до зростання інтенсивності гомогенезу за пониженої температури. Відомо, що гомогенез — це утворення у калюсах меристемних осередків, у яких відбувається диференціація морфологічних структур (утворення зачатків стебла, листків та коренів або квіткових генеративних бруньок) [6]. При цьому вони формуються по краях калюсів або можуть заглиблюватися

7 days only from the beginning of cultivation. In cv. Statna and Astet, the callusogenesis efficiency was significantly higher vs. Doridna. This was likely due to genotypic features of the studied cultivars, since the introduction of germs into the culture and morphogenetic processes depended on donor genotype [7, 9, 20]. To day 14 of incubation, this index was the same in all the cultivars (Table).

The obtained replanting callus culture was used to determine the effect of low positive temperature on the nature and intensity of morphogenetic processes (Fig. 1 A).

A 15-day exposure to low positive temperature showed the chlorophyllogenesis stimulation in calluses to occur in all the studied cultivars, it did most intensively in cv. Astet, and least intensively in cv. Doridna (Fig. 2A).

Differences between the wheat cultivars by chlorophyllogenesis are likely related to their genotypic distinctions, *i. e.* the ability to form chlorophyll *in vitro* and the response to callus cultivation conditions.

The hemogenesis analysis revealed (Fig. 2B) the effect of low positive temperature to induce its significant stimulation. Herewith, cv. Astet had the maximum intensity of hemogenesis, and the minimum one was in cv. Doridna. The cv. Astet showed a tendency to increase the hemogenesis intensity at low positive temperature. It is known that the hemogenesis is formation of meristem foci in calluses, where the differentiation of morphological structures (formation of primordia of stem, leaves and roots or flower generative buds) occurs [24]. At the same time, they are formed on the edges of calluses or they can penetrate into their tissue [21]. Therefore, more intensive hemogenesis in calluses of all the wheat cultivars under the impact of low positive temperature as compared with the control testified to its favorable effect on differentiation processes. The difference in hemogenesis frequency in calluses indicated the genotype dependence of cultivars on this factor.

The rhizogenesis frequency after 15-day temperature exposure approached the control (Fig. 2C). An increased rhizogenesis was observed in calluses of cv. Statna and Astet as compared with



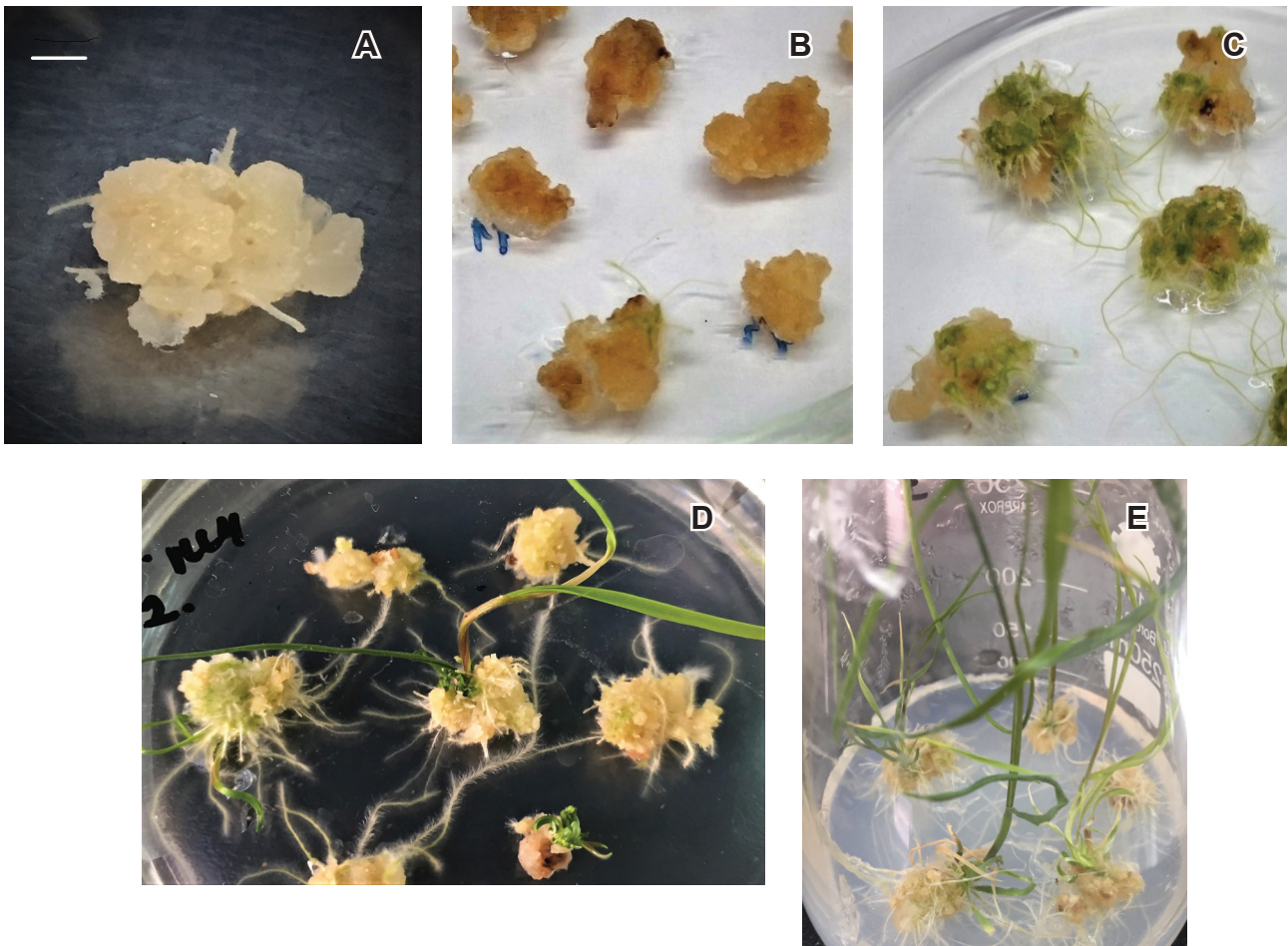


Рис. 1. Морфогенетичні реакції калюсної культури пшениці м'якої озимої: **A** — пересадкова калюсна культура; **B** — контрольний варіант після 45 діб за 26°C; **C** — хлорофілогенез та ризогенез після 30 діб за 4°C; **D** — геморизогенез на РС; **E** — рослини-регенеранти сорту Астет.

Fig. 1. Morphogenetic responses of soft winter wheat callus culture: **A** – replanting callus culture; **B** – control variant after 45 days at 26°C; **C** – chlorophyllogenesis and rhizogenesis after 30 days at 4°C; **D** – hemorhizogenesis on RM; **E** – regenerant plants of cv. Astet.

у їхню тканину [9]. Отже, більш інтенсивний гемогенез у калюсах усіх сортів пшениці за дії зниженої температури у порівнянні з контролем свідчить про її сприятливу дію на процеси диференціації. Різниця частоти гемогенезу у калюсах вказує на генотипову залежність сортів від цього фактора.

Частота ризогенезу після 15-добової температурної експозиції наближалася до контролю (рис. 2, С). У калюсах сортів Статна і Астет спостерігали підвищений ризогенез порівняно з сортом Дорідна. Отже, 15-добова обробка зниженою температурою не впливала на цей процес, але він істотно залежав від генотипу.

Результати визначення морфогенетичних процесів у калюсах досліджуваних сортів пшениці після 30-добової дії зниженої температури наведено на рис. 3. Відзначали початок диференціації калюсної культури з утворенням меристемних зародків з наявним хлорофілом та корінців

Doridna. So, a 15-day exposure to low positive temperature did not affect this process, but it was highly genotype-dependent.

The Fig. 3 presents the results of determining the morphogenetic processes in calluses of the studied wheat cultivars after a 30-day exposure to low positive temperature. The beginning of callus culture differentiation with forming meristem germs with the present chlorophyll and roots was noted (see Fig. 1C). The calluses of cv. Statna and Astet showed more intense chlorophyllogenesis in contrast to Doridna (Fig. 3A). Hemogenesis was significantly increased in germs of all the cultivars under low positive temperature impact (Fig. 3B). This effect was likely related to the manifestation of morphogenetic processes that reflected certain stages of *VRN* gene expression. The rhizogenesis occurred quite intensively in all the wheat cultivars (Fig. 3C), but its frequency in calluses of control and studied



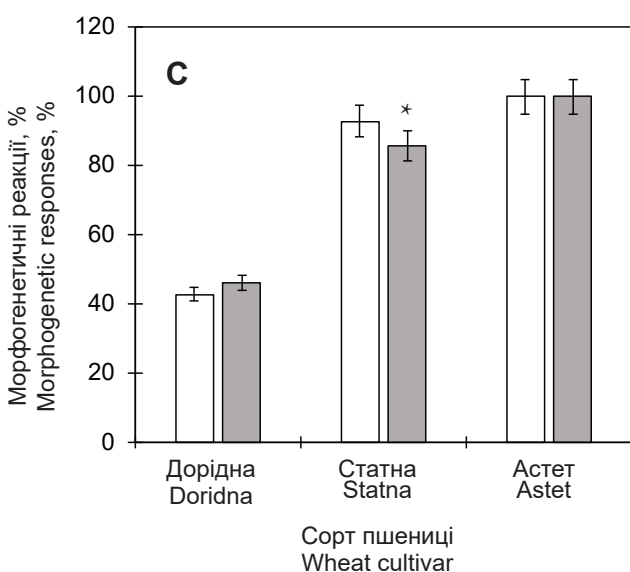
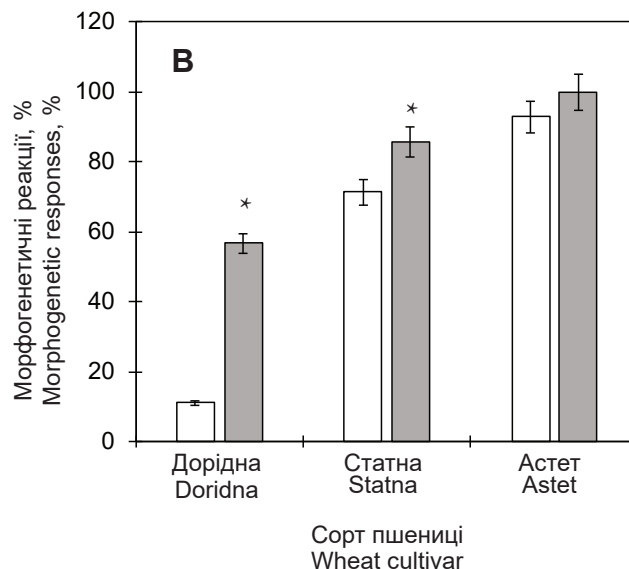
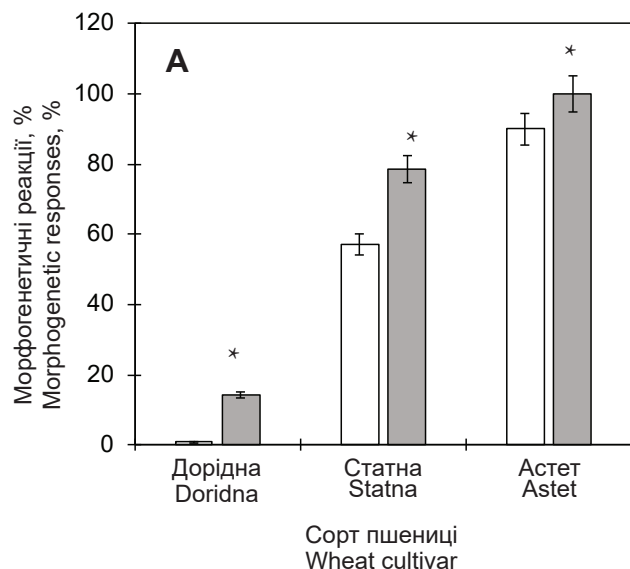


Рис. 2. Морфогенетичні реакції (хлорофілогенез (А), гемогенез (В) та ризогенез (С)) після 15-добової холодової експозиції (4°C) пересадкової калюсної культури сортів пшениці озимої за культивування на РС: ■ — експозиція при 4°C; □ — експозиція при 26°C; * — різниця значуща відносно контролю, $p \leq 0,05$.

Fig. 2. Morphogenetic responses (chlorophyllogenesis (A), hemogenesis (B) and rhizogenesis (C)) after 15-day cold exposure (4°C) of replanting callus culture of winter wheat cultivars when cultivated with RM: ■ — exposure at 4°C, □ — exposure at 26°C; * — difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$.

(див. рис. 1, С). У калюсах сортів Статна і Астет спостерігали більш інтенсивний хлорофілогенез на відміну від сорту Дорідна (рис. 3, А). Під впливом зниженої температури у зародках усіх сортів істотно зростає гемогенез (рис. 3, В). Вірогідно, такий ефект пов'язаний з проявом морфогенетичних процесів, які відображують певні етапи експресії генів *VRN*. Процес ризогенезу відбувався достатньо інтенсивно у всіх сортів пшениці (рис. 3, С), однак у калюсах сортів Дорідна і Астет він був однаковим за частотою у контрольному і дослідному варіантах. У сорту ж Статна знижена температура істотно гальмувала утворення корінців у калюсах. Одержані дані вказують на те, що морфогенетичні процеси у калюсній культурі залежать як від дії пониженої температури, так і від генотипу сорту [6, 21].

Результати визначення морфогенетичних реакцій у калюсах досліджуваних сортів після дії пониженої температури протягом 45 діб на-

variants of cv. Doridna and Statna was the same. In calluses of cv. Astet, the low positive temperature significantly stimulated the root formation. These findings showed the morphogenetic processes in callus culture as dependent on both the effect of low temperature and cultivar genotype as well [15, 24].

The Fig. 4. demonstrates the results of determining the morphogenetic responses in calluses of the studied cultivars after exposure to low temperature for 45 days. A quite developed root system and formation of green leaves were noted (see Fig. 1D). A cold exposure of this duration was shown to promote an intensive chlorophyllogenesis in calluses of all the wheat cultivars (Fig. 4A). Herewith, in calluses of cv. Doridna it was the highest, in those of Statna and Astet it was equal, but lower than in Doridna calluses. Thus, the cultivars were different in chlorophyll synthesis, which was likely due to their genotypic characteristics. The results of hemogenesis determining showed it as nearly absent in the control variant of wheat calluses of all the cultivars, *i. e.* the rates of meristem primordia formation were 1–2% (Fig. 4B, see Fig. 1B). However, in the studied variant, these foci in calluses of cv.



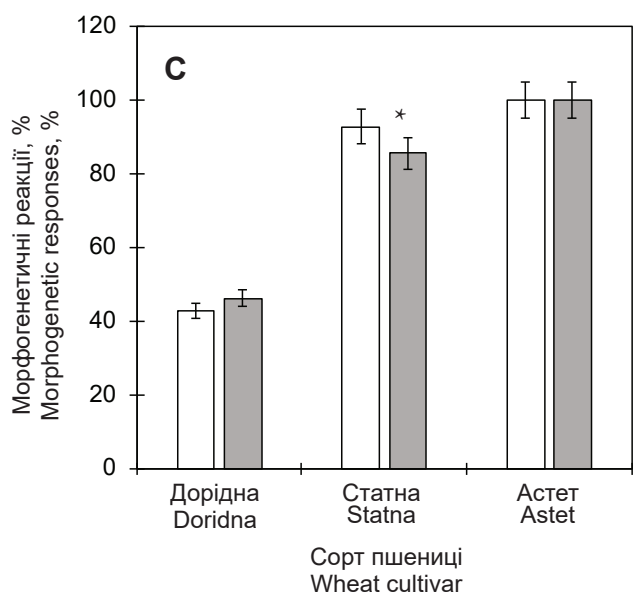
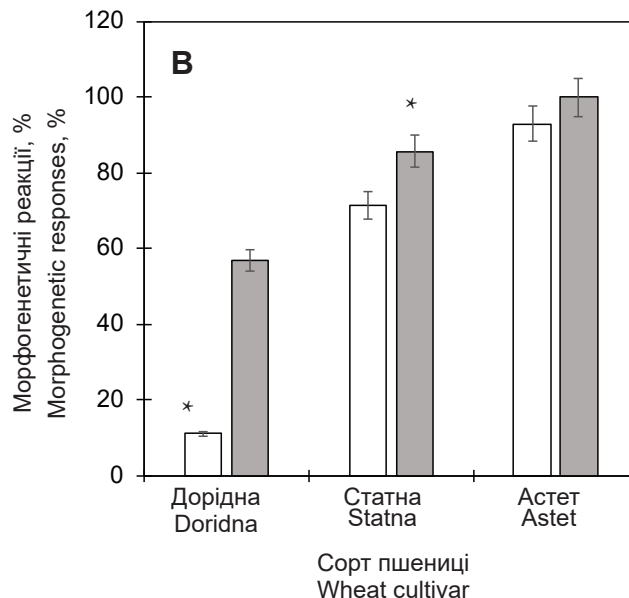
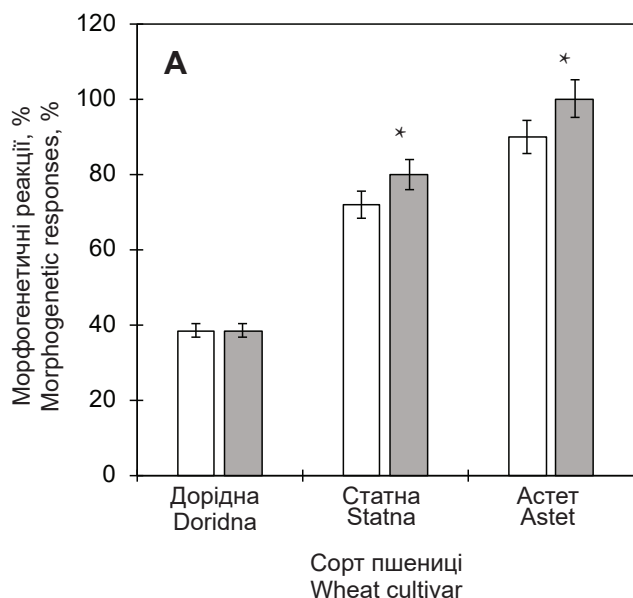


Рис. 3. Морфогенетичні реакції (хлорофілогенез (А), гомогенез (В) та ризогенез (С)) після 30-добової холодової експозиції (4°C) калюсної культури сортів пшениці озимої за культивування на РС: ■ — експозиція при 4°C; □ — експозиція при 26°C; * — різниця значуща відносно контролю, $p \leq 0,05$.

Fig. 3. Morphogenetic responses (chlorophyllogenesis (A), hemogenesis (B) and rhizogenesis (C)) after 30-day cold exposure (4°C) of callus culture of winter wheat cultivars when cultured with RM: ■ – exposure at 4°C, □ – exposure at 26°C; * – difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$.

ведено на рис. 4. Відзначали досить розвинену кореневу систему та утворення зелених листків (див. рис. 1, D). Показано, що холодова експозиція такої тривалості сприяла інтенсивному хлорофілогенезу у калюсах усіх сортів пшениці (рис. 4, А). При цьому у калюсах сорту Дорідна він був найбільший, у калюсах сортів Статна і Астет — однаковим, але нижчим ніж у калюсів сорту Дорідна. Отже, за синтезом хлорофілу сорти відрізнялися, що, вірогідно, зумовлено їхніми генотиповими особливостями. Результати визначення процесу гомогенезу показали, що у контрольному варіанті калюсів пшениці всіх сортів він практично не відбувався: показники утворення меристемних зачатків були 1–2% (рис. 4, В, див. рис. 1, В). Проте у дослідному варіанті такі осередки у калюсах сортів Дорідна, Статна і Астет становили 35, 30 і 12,5%

Doridna, Statna, and Astet were 35, 30, and 12.5%, respectively. This fact might prove that the low positive temperature stimulated the processes associated with morphogenetic development, that subsequently ensured the regenerant plant formation. To day 45 of low positive temperature effect, the vernalization, and hence the *VRN* gene expression were likely completed. It is known that in the *in vivo* system, the effect of low positive temperature for 45 days is enough to complete vernalization in most soft winter wheat cultivars [10, 12].

The results of study of a 45-day effect of low temperature on rhizogenesis in callus culture of all the studied wheat cultivars showed the root formation to proceed much more intensively than in the control variant (Fig. 4C). Notably, that the wheat cultivars did not differ by this index, since 100% of calluses formed the roots. At the same time, in the control variant of cv. Doridna and Astet the rhizogenesis was different, as about 80% of calluses formed the roots, and in cv. Statna it was 60%, thus testified to the dependence of this process on cultivar genotype.



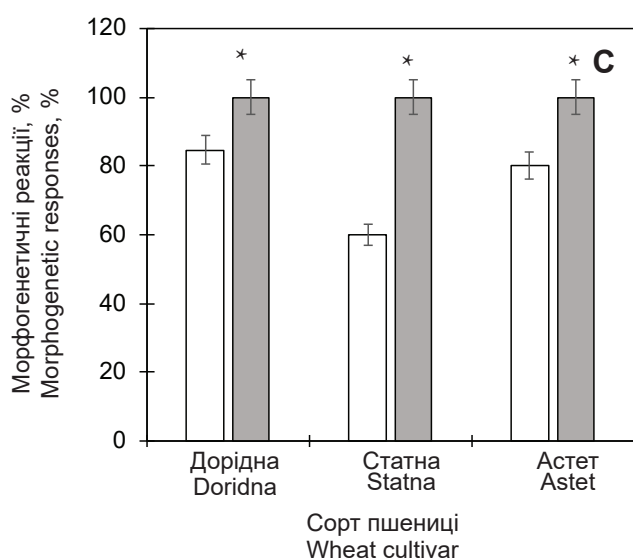
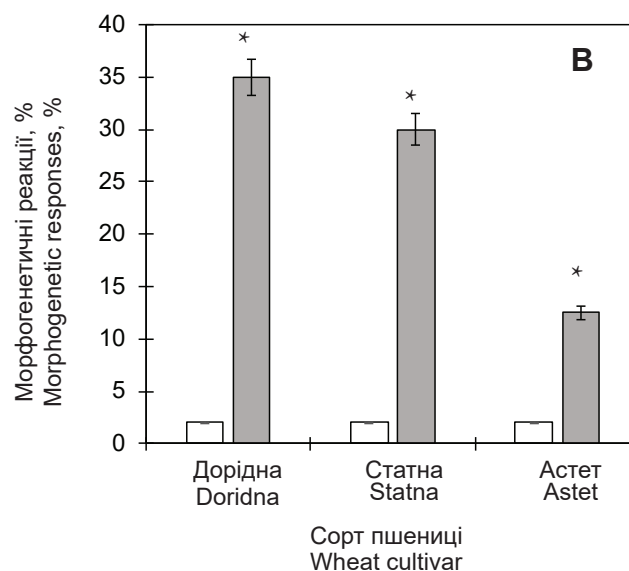
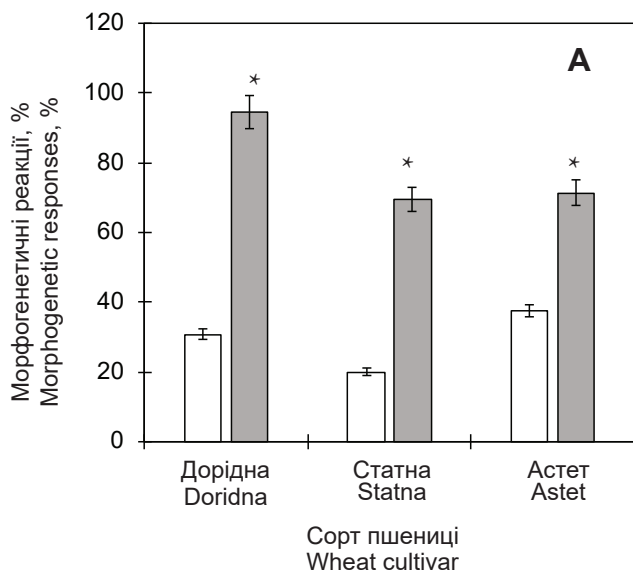


Рис. 4. Морфогенетичні реакції (хлорофілогенез (А), гемогенез (В) та ризогенез (С)) після 45-добової холодової експозиції (4°C) калюсної культури сортів пшениці озимої за культивування на РС: ■ — експозиція при 4°C; □ — експозиція при 26°C; * — різниця значуща відносно контролю, $p \leq 0,05$.

Fig. 4. Morphogenetic responses (chlorophyllogenesis (A), hemogenesis (B) and rhizogenesis (C)) after 45-day cold exposure (4°C) of callus culture of winter wheat cultivars when cultured with RM: ■ – exposure at 4°C, □ – exposure at 26°C; * – difference is significant as compared with the control, $p \leq 0.05$.

відповідно. Цей факт може свідчити про стимулювання пониженою температурою процесів, пов'язаних із морфогенетичним розвитком, що в подальшому забезпечує процес утворення рослин-регенерантів. Вірогідно, що на 45-ту добу дії пониженої температури завершується процес верналізації, а отже і експресії генів *VRN*. Відомо, що у системі *in vivo* для завершення яровізації у більшості сортів пшениці озимої м'якої достатньо дії пониженої позитивної температури протягом 45 діб [11, 18].

Результати вивчення 45-добової дії пониженої температури на процес ризогенезу у калюсній культурі всіх досліджуваних сортів пшениці показали, що утворення корінців відбувалося значно інтенсивніше, ніж у контрольному варіанті (рис. 4, С). Зазначимо, що сорти пшениці не відрізнялися за цим показником, оскільки 100% калюсів утворили корінці. Водночас у контрольному варіанті сортів Дорідна і Астет ризогенез

Observations showed the effect of low positive temperature within 45 days to induce formation of developed roots and leaves (see Fig. 1D, E). Assuming in our research the effect of low positive temperatures on calluses of soft winter wheat cultivars to be an analogue of vernalization, during which the morphogenetic processes, associated with the *VRN* gene expression might change, it was expedient to analyze their dynamics. It is known that during *in vivo* vernalization, the gradual changes in physiological and biochemical processes, as well as *VRN* gene expression, occur within a certain time. Herewith, the impact of vernalization on the soft winter wheat plant development is only implemented when the expression is completed [18].

The performed analysis showed the frequency of morphogenetic processes after exposure to low positive temperature to be higher in the calluses of all the wheat cultivars, with except of the temperature, which was optimal for cultivation, but could not be the vernalization factor. This may testify to the morphogenesis stimulation in the *in vitro* culture by low positive temperatures, similar to the way this process occurs *in vivo*.

був різним, оскільки корінці утворили близько 80% калюсів, а у сорту Статна — 60%, що свідчить про залежність цього процесу від генотипу сорту.

Спостереження показали, що дія пониженої температури протягом 45 діб викликала формування розвинених коренів та листя (див. рис. 1, D, E). У нашому досліді ми припускали, що вплив понижених температур на калюси сортів пшениці озимої м'якої є аналогом яровизації, протягом якої можливі зміни морфогенетичних процесів, пов'язаних із експресією генів *VRN*, тому було доцільним проаналізувати їхню динаміку. Відомо, що під час яровизації *in vivo* протягом певного часу відбуваються поступові зміни фізіолого-біохімічних процесів, а також експресії генів *VRN*. При цьому вплив яровизації на розвиток рослин пшениці м'якої озимої реалізується тільки після завершення експресії [22].

Проведений аналіз показав, що після дії пониженої температури у калюсах усіх сортів пшениці частота морфогенетичних процесів, за окремими винятками, була вищою, ніж після впливу температури, яка є оптимальною для культивування, але не може бути фактором яровизації. Це може свідчити про стимулювання пониженими температурами морфогенезу у культурі *in vitro*, подібно до того, як цей процес відбувається в умовах *in vivo*. Дане припущення підтверджується результатами аналізу динаміки досліджуваних процесів.

Рівень синтезу хлорофілу у калюсах сорту Дорідна максимально підвищувався після 45-добової холодової експозиції, а у калюсах сортів Статна і Астет така тенденція зберігалася протягом усього періоду термоіндукції порівняно з контролем.

Частота гомогенезу у калюсах усіх сортів пшениці в умовах холодового впливу була вищою за контроль. Значуща різниця виявлена у контрольному і дослідному варіантах сорту Дорідна. У сортів Статна і Астет динаміка гомогенезу була однаковою: на 15 та 30 доби — підвищувалася, а на 45 добу — знижувалася, при цьому значно перевищувала показники контрольного варіанта.

Процес ризогенезу, на відміну від хлорофілої гомогенезу, менш залежав від дії пониженої температури. Так, у калюсах сортів Дорідна і Астет протягом 15 та 30 діб частота ризогенезу була практично однаковою як у контрольному, так і у дослідному варіанті. У калюсах сорту Статна даний показник істотно знижувався на 15 та 30 доби холодової експозиції. У калюсах до-

This assumption is supported by the results of analysis of dynamics in the studied processes.

The level of chlorophyll synthesis in calluses of cv. Doridna was maximum increased after 45-day cold exposure, but in those of cv. Statna and Astet, this tendency was maintained during the entire period of thermoinduction as compared with the control.

The hemogenesis frequency in calluses of all the wheat cultivars under cold exposure was higher vs. the control. A significant difference was found in the control and experimental variants of cv. Doridnar. In cv. Statna and Astet, the dynamics of hemogenesis was the same, *i. e.* it increased to days 15 and 30, but decreased to day 45, while significantly exceeded the indices of control variant.

The rhizogenesis, in contrast to chlorophyll- and hemogenesis, was less dependent on low temperature impact. For example, in calluses of cv. Doridna and Astet, the rhizogenesis frequency was virtually the same within 15 and 30 days both in the control and experimental variants. In those of cv. Statna, this index was significantly decreased to days 15 and 30 of cold exposure. In calluses of the studied cultivars, the rhizogenesis occurred more intensively to day 45 only, as compared with the control.

These findings showed all the wheat cultivars to have differences by morphogenesis dynamics, which might be due to the response of their genotype to duration of low temperature effect. It is known that various winter wheat cultivars need different duration of vernalization (from 30 to 60 days) for transition to the generative state [12, 18].

Thus, our findings demonstrated a stimulating effect of low positive temperature on morphogenetic processes in the winter wheat *in vitro* culture, which might testify to the 'switching' of the plant development program from the vegetative to generative one as the main criterion for implementing vernalization [10]. We believe that it may be due to the vernalization processes associated with the *VRN* genes expression, that occur in calluses. If the integrity of plant organism is likely compromised, the functional stability of *VRN* gene system, *i. e.* the need for vernalization, is kept. This statement is confirmed by our previously findings [4] and the reported data [22], according to which the winter wheat cultivars showed the change of recessive state to dominant *VRN-B1* gene (the main repressor of its transition to generative development) as occurred during vernalization. In addition, we have shown that under *in vitro* conditions in the wheat isogenic



сліджуваних сортів порівняно з контролем ризогенез відбувався більш інтенсивно тільки на 45 добу.

Результати показали, що всі сорти пшениці мали відмінності за динамікою морфогенезу, що може бути пов'язано з реакцією їхнього генотипу на тривалість дії пониженої температури. Відомо, що для переходу різних сортів озимої пшениці до генеративного стану необхідна різна тривалість яровизації (від 30 до 60 діб) [11, 22].

Отже, одержані результати вказують на стимулюючу дію пониженої температури на морфогенетичні процеси у культурі *in vitro* пшениці озимої, що може свідчити про «переключення» програми розвитку рослини з вегетативної на генеративну як основного критерію здійснення яровизації [18]. На нашу думку, причина полягає у тому, що у калюсах можуть відбуватися яровизаційні процеси, пов'язані з експресією генів *VRN*. Вірогідно, що за умов порушення цілісності рослинного організму зберігається функціональна стабільність системи генів *VRN*, тобто потреба у яровизації. Це положення підтверджується одержаними нами раніше результатами [1] та літературними даними [12], згідно з якими у сортів пшениці озимої зміна рецесивного стану на домінуючий ген *VRN-B1* (головний репресор її переходу до генеративного розвитку) відбувається під час яровизації. Крім того нами показано, що у ізогенних за генами *VRN*-ліній пшениці в умовах *in vitro* алельний стан їхніх локусів зберігається таким, як і в умовах *in vivo* [1, 15].

Отримані результати у подальшому можуть використовуватися для обґрунтування нових методів регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої.

Висновки

За результатами експериментів встановлено, що дія позитивних низьких температур на пересадкову калюсну культуру сортів пшениці м'якої озимої приводить до стимулювання морфогенетичних процесів у культурі *in vitro* — хлорофіло-, гемо- та ризогенезу.

1. Активация хлорофіло- та гемогенезу відбувається у всіх досліджуваних сортів озимої пшениці після 15-, 30- та 45-добової (максимально) холодової експозиції.

2. Процес ризогенезу не залежить від термоіндукції протягом 15 та 30 діб. Істотно стимулюється після 45 діб дії понижених температур (4°C) у всіх досліджуваних сортів озимої пшениці — Дорідна, Статна та Астет.

VRN lines, the allelic state of their loci remains the same as *in vivo* [4, 6].

These findings may be further used to substantiate the novel techniques for regulating the rates of winter wheat plant development.

Conclusions

The results of the experiments revealed the effect of low positive temperatures on the replanting callus culture of soft winter wheat cultivars to stimulate the morphogenetic processes in the *in vitro* culture, *i. e.* chlorophyll-, hemo- and rhizogenesis.

1. Activation of chlorophyll- and hemogenesis occurred in all the studied winter wheat cultivars after 15-, 30-, and 45-day (maximum) cold exposure.

2. Rhizogenesis did not depend on thermoinduction for 15 and 30 days. It was significantly stimulated after 45 days of exposure to low temperatures (4°C) in all the studied winter wheat cultivars: Doridna, Statna and Astet.

3. The efficiency of morphogenetic processes in callus culture *in vitro* depended on the genotype of the original cultivar and cold exposure duration. The cv. Doridna was the most sensitive to vernalization pretreatment of calluses among the studied winter wheat cultivars, in the calluses of which under low temperature impact the hemogenesis was activated within 33–46% vs. the control variant.

4. It was established that under the activating effect of low temperature (4°C) the vernalization processes, associated with the *VRN* genes expression occurred in the soft winter wheat *in vitro* culture. This effect was manifested in a changed frequency of morphogenetic processes similar to the 'switching' of the development program of winter wheat under *in vivo* conditions during vernalization.

References

1. Achrem M, Skuza L, Kalinka A, et al. Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta Biol Crac Ser Bot.* 2012; 54 (1): 7–15.
2. Adamczuk A, Siegien I, Ciereszko I. Morphogenesis of plants *in vitro* under stress conditions. In: Łaska G. editor. *Biological diversity – from cell to ecosystem.* Białystok: Polish Botanical Society – Branch in Białystok; 2012. P. 25–40.
3. Atramentova LO, Utevska OM. [Statistical methods in biology]. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University; 2007. 288 p. Ukrainian.



3. Ефективність морфогенетичних процесів у калюсній культурі *in vitro* залежить від генотипу вихідного сорту та тривалості дії холодової обробки. Найбільш чутливим до попередньої яровизації калюсів серед досліджуваних сортів озимої пшениці є Дорідна, в калюсах якої за низькотемпературного впливу гомогенез активується в межах 33–46% порівняно з контрольним варіантом.

4. Встановлено що у культурі *in vitro* пшениці озимої м'якої відбуваються яровизаційні процеси за активуючої дії позитивної низької температури (4°C), які пов'язані з експресією генів *VRN*. Даний ефект проявляється у зміні частоти морфогенетичних процесів аналогічно «переключенню» програми розвитку озимої пшениці в умовах *in vivo* під час яровизації.

Література

1. Авксентьева ОО, Шулік ВВ. Апелельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*. *Biosystems Diversity*. 2016; 24(1): 222–30.
2. Авксентьева ОО, Шулік ВВ. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*. Харків: ХНУ імені В.Н. Каразіна; 2017. 96 с.
3. Атраментова ЛО, Утевська ОМ. Статистичні методи в біології. Харків: ХНУ імені В.Н. Каразіна; 2007. 288 с.
4. Білинська О.В. Вплив попередньої обробки колосся за низької температури на ефективність отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro*. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2020; 30(1): 68–76.
5. Дубровна ОВ, Моргун ВВ, Бавол АВ. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос; 2014. 375 с.
6. Журавлев ЮН, Омелько АМ. Морфогенез у рослин *in vitro*. *Фізіологія рослин*. 2008; 55(5): 579–96.
7. Моргун ВВ, Дубровна ОВ, Моргун ВВ. Отримання стійких до стресів рослин пшениці біотехнологічними методами. В: Моргун ВВ, редактор. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрями розвитку*. Київ: Логос; 2017. С. 393–413.
8. Моргун ВВ, Киризий ДА, Шадчина ТК. Экофизиологические и генетические аспекты адаптации культурных растений к глобальным изменениям климата. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2010; 42(1): 3–23.
9. Сельдиминова ОА, Круглова НН, Зинатуллина АЕ. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro*: обзор проблемы. *Научный результат. Физиология*. 2017; 3 (1): 8–13.
10. Стельмах АФ, Файт ВИ, Мартынюк ВР. Генетические системы типа и контроля скорости развития мягкой пшеницы. *Цитология и генетика*. 2000; 34 (2): 39–45.
11. Файт ВИ. Генетическая система контроля различий по продолжительности яровизации у озимой пшеницы. *Цитология и генетика*. 2003; 37(5): 69–76.
12. Щербань АБ, Салина ЕА. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов яровизации. *Цитология*. 2013; 55(4): 234–7.
13. Achrem M, Skuza L, Kalinka A, et al. Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta Biol Crac Ser Bot*. 2012; 54 (1): 7–15.
4. Avksentieva OO, Shulik VV. [Allelic state and effects of soft wheat *VRN* genes *in vivo* and *in vitro*]. *Biosystems Diversity*. 2016; 24(1): 222–30. Ukrainian.
5. Avksentieva OO, Shulik VV. [Biotechnology of higher plants: *in vitro* culture]. Kharkiv: V.N. Karazin Kharkiv National University; 2017. 96 p. Ukrainian.
6. Avksentieva OO, Shulik VV, Taran NY. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of *VRN* genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018; 64 (1): 73–81.
7. Benderradji L, Brini F, Kellou K. et al. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *Int Sch Res*. [Internet] 2011 15 Dec [Cited 11.09.2021]; 2012: 367851. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/367851/>
8. Bilynska OV. Influence of spike pretreatment at low temperatures on efficiency of spring barley haploid production in anther culture *in vitro*. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30 (1): 68–76.
9. Delporte F, Pretova A, Jardin P, Watillon B. Morphohistology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*. 2014; 251: 1455–70.
10. Dennis ES, Peacock WJ. Vernalization in cereals. *J Biol*. 2009; 8(6): 57–67.
11. Dubrovna OV, Morhun BV, Baval AV. [Wheat biotechnology: selection and genetic engineering]. Kyiv: Lohos, 2014. 375 p. Ukrainian.
12. Fait VI. [Genetic control system for differences in the duration of vernalization in winter wheat]. *Tsitol Genet*. 2003; 37(5): 69–76. Russian
13. Henderson IR, Shindo C, Dean C. The need for winter in the switch to flowering. *Annu Rev Genet*. 2003; 37: 371–92.
14. Karimzadeh G, Francis D, Davies MS. Low temperature-induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat. *Ann Bot*. 2000; 85: 769–77.
15. Kondic-Sipka A, Hristov N, Kobiwski B. *In vitro* screening for low temperature tolerance of wheat genotypes. *Genetika*. 2006; 38(2): 137–44.
16. Morgun VV, Dubrovna OV, Morgun BV. [Obtaining stress-resistant wheat plants by biotechnological methods]. [Plant physiology: achievements and new directions of development]. Kyiv: Lohos; 2017. p. 393–413. Ukrainian
17. Morgun VV, Kyrzyi DA, Shadchyna TK. [Ecophysiological and genetic aspects of adaptation of cultivated plants to global climate change]. *Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy*. 2010; 42(1): 3–23. Russian.
18. Muterko AF, Balashova IA, Fayt VI, Sivolap YuM. Molecular genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. *Cytol Genet*. 2015; 49(1): 58–71.
19. Parmar S, Sainger M, Chaudhary D, et al. Plant regeneration from embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiol Mol Biol Plants*. 2012; 18: 177–83.
20. Roesler EA, Manfroi E, Morás A, et al. Adaptation of *in vitro* regeneration protocol for Brazilian wheat genotypes. *Ciência Rural*. [Internet] 2018 [cited 11.09. 2021]; 48(11): e20170806. Available from: <https://www.scielo.br/j/cr/a/Z9v5wHVqCg3gzGwG4mwdCmw/?lang=en>
21. Seldymyrova OA, Kruhlova NN, Zynatullyna AE. [The role of phytohormones in the induction of callusogenesis and the regulation of morphogenesis pathways of cereal calli *in vitro*: a review of the problem]. *Nauchnyj rezultat. Ser. Fiziologiya*. 2017; 3 (1): 8–13. Russian.
22. Shcherban' AB, Salina EA. [Epigenetic regulation of vernalization gene expression]. *Tsitologiya*. 2013; 55(4): 234–7. Russian.



14. Adamczuk A, Siegien I, Ciereszko I. Morphogenesis of plants *in vitro* under stress conditions. In: Łaska G. editor. Biological diversity – from cell to ecosystem. Białystok: Polish Botanical Society – Branch in Białystok; 2012. P. 25–40.
15. Avksentieva OO, Shulik VV, Taran NY. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of *VRN* genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018; 64(1): 73–81.
16. Benderradji L, Brini F, Kellou K. et al. Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions. *Int Sch Res*. [Internet] 2011 15 Dec [Cited 11.09.2021]; 2012: 367851. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/367851/>
17. Delporte F, Pretova A, Jardin P, Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*. 2014; 251: 1455–70.
18. Dennis ES, Peacock WJ. Vernalization in cereals. *J Biol*. 2009; 8(6): 57–67.
19. Henderson IR, Shindo C, Dean C. The need for winter in the switch to flowering. *Annu Rev Genet*. 2003; 37: 371–92.
20. Karimzadeh G, Francis D, Davies MS. Low temperature-induced accumulation of protein is sustained both in root meristems and in callus in winter wheat but not in spring wheat. *Ann Bot*. 2000; 85: 769–77.
21. Kondic-Sipka A, Hristov N, Kobiwski B. *In vitro* screening for low temperature tolerance of wheat genotypes. *Genetika*. 2006; 38(2): 137–44.
22. Muterko AF, Balashova IA, Fayt VI, Sivolap YuM. Molecular genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. *Cytol Genet*. 2015; 49(1): 58–71.
23. Parmar S, Sainger M, Chaudhary D, et al. Plant regeneration from embryo of commercial Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Physiol Mol Biol Plants*. 2012; 18: 177–83.
24. Roesler EA, Manfroi E, Morás A, et al. Adaptation of *in vitro* regeneration protocol for Brazilian wheat genotypes. *Ciência Rural*. [Internet] 2018 [cited 11.09. 2021]; 48(11): e20170806. Available from: <https://www.scielo.br/jj/cr/a/Z9v5wHVqCg3gzGwG4mwdCmw/?lang=en>
23. Stelmakh AF, Fait VI, Martyniuk VR. [Genetic systems of the type and control of the rate of development of common wheat]. *Tsitol Genet*. 2000; 34(2): 39–45. Russian.
24. Zhuravlev YN, Omelko AM. Plant morphogenesis *in vitro*. *Russ J Plant Physiol* 2008; 55(5): 579–96.