

ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА СОРТОВ ПРОСА ОБЫКНОВЕННОГО (*PANICUM MILIACEUM* L.) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*Жұмабек А.Т.^{1,2} , Сутула М.Ю.¹ , Манабаева Ш.А.^{1,2,*} ¹Национальный центр биотехнологии, Астана, 010000, Казахстан, Кургальжинское шоссе, 13/5²Евразийский Национальный университет им. Л.Н.Гумилева, Астана, 010000, Казахстан, ул. Мунайтпасова, 13

*Автор-корреспондент: manabayeva@biocenter.kz

АННОТАЦИЯ

В Казахстане просо обыкновенное (*Panicum miliaceum* L.) является важной сельскохозяйственной культурой и ежегодно выращиваемой на площади около 17,5 тыс. га. В данном исследовании был разработан и оптимизирован простой и эффективный метод индукции каллусообразования и регенерации растений проса. Целью исследования являлось изучение регенерационного потенциала казахстанских сортов проса Кормовое-14 и Яркое-6. Для индукции каллусогенеза семена проса культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением витаминов Гамборга В5, а также регуляторов роста 2 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л 6 БАП. Для обеспечения дополнительного источника азота в среду добавляли аминокислоты, такие как 500 мг/л L-пролин и 300 мг/л гидролизат казеина. Частота индукции каллусогенеза в среднем достигла 95% для обеих селекционных линий Кормового-14 и Яркого-6. Все исследуемые сорта проявили 100% индукцию эмбрионного каллуса при применении среды МС с добавлением 2 г/л L-пролина, 30 г/л мальтозы, 5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП. Морфогенные, рыхлые и компактные каллусы типа II с хлорофилл-содержащими зонами были пересажены на питательную среду МС для регенерации, содержащей 4 мг/л БАП и 500 мг/л L-пролина. Максимальное количество проростков для обоих сортов было получено на безауксиновой среде МС, содержащей 4 мг/л БАП, частота регенерации составила 47.5% (сорт Кормовое-14) и 37.5% (Яркое-6). Растения-регенеранты были перенесены на полноценную среду МС с добавлением 0.2 мг/л ИМК и 0.1 мг/л БАП, 2% сахарозы, для ризогенеза. Укоренившиеся саженцы были успешно адаптированы и перенесены в почву. Полученные результаты закладывают базу для разработки эффективных методов генетической трансформации и создания трансгенных растений проса обыкновенного.

Ключевые слова: просо обыкновенное, *Panicum miliaceum*, индукция морфогенеза, регенерация *in vitro*

ВВЕДЕНИЕ

Просо обыкновенное (*Panicum miliaceum* L.) – одолетнее травянистое растение, произрастающее в Юго-Восточной и Центральной Азии. По данным FAO, общая посевная площадь проса в мире составляет – 36,3 млн га, а в Казахстане площади посевов проса составляет – 1,7 млн. га., и возделываются в Акмолинской, Костанайской, Павлодарской, Актюбинской и Западно-Казахстанской областях.

Культура просо обыкновенное имеет ряд ценных агрономических и биологических свойств. Например, в США просо выращивается преимущественно в качестве корма для птиц или продаётся как экзотическая крупа для здорового питания [1]. Поскольку просо практически не содержит глютен, поэтому может быть рекомендован для питания людям, страдающих непереносимостью белка некоторых злаковых культур.

Глютен, основной запасной белок, содержащийся во многих зерновых культурах, таких как пшеница, ячмень рожь и овес. Он представляет собой сложную смесь сотен родственных, но различных белков, включая глиадин и глютеин. Подобные запасные белки присутствуют во ржи в виде секалина, в ячмене в виде гордеина и в овсе в виде авенинов. Совокупность всех этих белков называется «глютенном». Глиадин, основной белок пшеницы, содержит пептидные последовательности, которые обладают высокой устойчивостью к желудочному, панкреатическому и кишечному сокам (в частности, к содержащимся в них протеолитическим ферментам). Белки глютена очень устойчивы к ферментам протеазам, которые расщепляют

белки в пищеварительном тракте. Неполное переваривание белков глютена может привести к прохождению крупных пептидов через стенку тонкого кишечника, что может вызвать иммунные реакции и привести к развитию аутоиммунного заболевания, такого как целиакия [2]. Для пациентов с целиакией строгая безглютеновая диета является основным методом лечения и контроля симптомов заболевания.

Пищевая ценность проса составляет – 12% белка, 3.5% жира, 81% крахмала и благодаря значительному содержанию крахмала в зерне, просо также используется в спиртовом производстве.

В связи с этим актуальным становится поиск и разработка эффективных методов получения стерильной культуры проса, определение видов эксплантов с высоким морфогенетическим потенциалом, а также получение растений регенерантов в культуре *in vitro* для улучшения качественных и количественных признаков методом генной инженерии.

Одним из известных способов получения растений-регенерантов проса *P. miliaceum* является воздействие тепла на изолированные пыльники. Этот метод позволяет значительно повысить эффективность получения растений-регенерантов. Например, в вариантах с тепловым стрессом на 30 высаженных пыльников получено 61.3% зеленых растений-регенерантов, в то время как после обработки холодом 46%, а в контроле 19%. Однако, недостатком данного способа является низкий выход эмбрионных каллусов, частота образования которых составила 28.3% [3].

Известна работа Santha B. и Seetharama N. [4], в ко-

торой описана дифференциация неморфогенных первичных каллусов проса, индуцированных из соцветий, в бледно-желтые эмбрионные каллусы в течении двух недель. Авторы отмечают повышение частоты образования эмбрионных структур при последующих субкультивированиях. При переносе эмбрионных структур на среду для регенерации Мурасиге и Скуга (МС), обогащенную экзогенными гормонами БАП и ИМК в концентрациях 2.0 и 0.5 мг/л, соответственно, достигнута регенерация 5-6 побегов.

В работе Maheswari с соавт., [5] также описываются методы введения апикальных меристем в культуру, режимы культивирования и манипуляции с регуляторами роста. Установлено, что эмбрионные каллусы сорта Leeke, индуцированные при низких концентрациях 2,4-Д и кинетина (Кн), обладают высоким регенерационным потенциалом (40 побегов на каллус). Недостатком данных работ является обусловленность выхода растений-регенерантов генотипическими особенностями донорного растения. Для повышения морфогенетической активности каллуса необходимо подбирать оптимальное соотношение фитогормонов практически для каждого генотипа (сорта), что делает процесс чрезмерно трудоемким и мало-предсказуемым.

В исследовании Kothari S.L. [6] использовались различные типы эксплантов проса для культивирования на средах МС с различными комбинациями гормонов. Незрелые зародыши и соцветия культивировались на среде МС с добавлением 2,4-Д и Кн. Зрелые зародыши культивировались на среде МС с 2,4-Д и БАП. Регенерация растений наблюдалась при переносе каллусов на безгормональную среду МС. Исследование отмечает, что незрелые экспланты являются отличным источником для регенерации растений, однако использование зрелых эксплантов остается хорошей альтернативой из-за их недоступности в течение года.

Изучение регенерационного потенциала и разработка методов внедрения в культуру *in vitro*, путем анализа или улучшения существующих протоколов, является важным для биотехнологии проса обыкновенного. В этой связи целью данного исследования являлось изучение регенерационного потенциала проса обыкновенного у казахстанских сортов Кормовое-14 и Яркое-6. Рассмотрение возможностей повышения регенерационного потенциала и улучшения генома проса обыкновенного в условиях Казахстана
Таблица 1 – Состав питательных сред для каллусогенеза

Фитогормоны, мг/л:	Варианты питательных сред			
	МС1	МС2	МС3	МС4
2,4-Д	2	3	2	4
БАП	0.5	0.2	-	-

Таблица 2 – Состав питательных сред для регенерации

Фитогормоны, мг/л:	Варианты питательных сред			
	РЕГ1	РЕГ2	РЕГ3	РЕГ4
2,4-Д	2	-	-	-
Кн	-	4	-	1
БАП	-	-	4	2
ГА ₃	-	-	-	1

захстана, как ценную агрономическую культуру, является актуальным для страны. Выполненная работа позволит создать платформу для создания улучшенных линий растений методами генной инженерии, что способствует разработке технологий для пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности, а также для производства биоэтанола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовались семена двух казахстанских сортов проса обыкновенного: сорт Кормовое-2014, предоставленный ТОО «НПЦЗХ им. А.И. Бараева» и сорт Яркое-6, предоставленный Актюбинской сельскохозяйственной опытной станцией.

Для получения асептического растительного материала семена проса обеззараживали по протоколу, отработанному нами ранее [7].

Для индукции каллусов в культуре клеток, стерильные семена проса культивировали на модифицированной питательной среде с составом макро и микросолей по протоколу среды МС [8], рН 5.8, дополненной витаминами по прописи среды Гамборга В5. Для приготовления твердых питательных сред использовали 0.3% фитогель и 30 г/л мальтозы в качестве источника углерода, с добавлением регуляторов роста – 0.5 мг/л бензиламинопурина (БАП) и искусственный аналог ауксина – 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) (Таблица 1).

Для обеспечения дополнительного источника азота в среду были добавлены аминокислоты: 500 мг/л L-пролин и 300 мг/л гидролизат казеина. Экспланты инкубировали в темноте при 26 °С.

Частоту индукции каллусообразования определяли путем отношения количества эксплантов, продуцирующих каллус, к общему количеству высаженных эксплантов.

Через 35-40 суток культивирования на среде для каллусообразования, морфогенные каллусы переносили на питательную среду МС, рН 5.8, содержащую 2 г/л L-пролина, 30 г/л мальтозы, 5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП для эмбриогенеза.

Морфогенные, компактные каллусы типа II переносили через 35-40 суток культивирования на 4 различных варианта питательных сред МС, рН 5.8, содержащих 500 мг/л L-пролина, и отличающихся гормональным составом для регенерации растений (Таблица 2).

Пассаж каллусных культур проводили каждые 3-4 не-

Таблица 3 – Состав питательных сред для ризогенеза

Фитогормоны, мг/л:	Варианты питательных сред		
	P1	P2	P3
ИМК	0.2	-	0.1
БАП	0.1	-	1.0

дели до начала индукции регенерации растений, которая наблюдалась на 50-60 день культивирования каллуса. Частоту регенерации побегов определяли, как отношение количества регенерировавших побегов без корней к общему количеству высаженных эксплантов проса.

После того как растения-регенеранты достигали размеров 0.5-1 см в длину, их переносили на среду ½МС для укоренения, содержащую 0.2 мг/л индолил-масляной кислоты (ИМК) и 0.1 мг/л БАП, с добавлением 2% сахарозы (Таблица 3). Затем растения-регенеранты длиной 7-8 см и с хорошо сформировавшейся корневой системой переносили в стерильную почву.

В каждом эксперименте было использовано по 100 семян каждого сорта проса. Полученные данные были статистически обработаны с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа, с применением программного обеспечения Prism 10 (GraphPad Software Inc., Boston, MA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стерилизация семян сортов проса обыкновенного

Получение асептического растительного материала, путем стерилизации семян сортов проса обыкновенного является важным этапом в культуре *in vitro*. Оптимальные параметры стерилизации семян являются ключевыми для обеспечения высокого уровня выхода стерильных эксплантов с сохранением их жизнеспособности.

В ходе ранних исследований проводились эксперименты по определению оптимальных методов стерилизации семян, используемых в качестве эксплантов для каллусной культуры проса [7]. Наиболее эффективным оказалось обеззараживание с помощью 5% гипохлорита натрия в течение 45 минут, что обеспечило 100% выход стерильных эксплантов с сохранением высокой жизнеспособности семян.

Для получения асептического растительного материала были изучены различные методы стерилизации семян [9-13]. В качестве стерилизующих агентов для проса использовались химические реагенты, такие как раствор хлорида ртути (HgCl₂), этанол (C₂H₅OH), газообразный хлор (Cl₂), раствор коммерческой белизны (Clorox) и серная кислота (H₂SO₄) [14-18].

Результаты исследования, проведенного Bankar A. и Gadakh S., показали, что наиболее эффективной комбинацией для стерилизации семян проса была обработка 70% этанолом в течение 1 минуты, с последующей 10 минутной обработкой в 1.0% растворе хлорида ртути. Этот метод продемонстрировал максимальную эффективность в достижении асептического растительного материала у генотипа Гавхе, достигнув 94.16% успешной стерилизации. Однако стоит отметить, что для генотипа семян проса Сукдхар этот метод показал себя менее эффектив-

ным на уровне 87.50% [9]. Подобные результаты были подтверждены исследованиями, проведенными Gupta и соавторами в 2001 году [10].

Известно, что использование газообразного хлора для стерилизации семян демонстрировало наиболее высокую эффективность по сравнению с применением раствора 5% гипохлорита натрия. После стерилизации газообразным хлором наблюдалось последующее прорастание семян в условиях темноты. Таким образом, использование газообразного хлора для стерилизации семян является не только эффективным, но и предпочтительным методом, обеспечивающим сохранение желаемой стерильности без значительного воздействия на всхожесть [11].

В ряде исследований применяют серную кислоту для стерилизации семян [14-18]. Однако, в настоящем исследовании предпочтение было отдано коммерческому раствору 5% гипохлорита натрия, учитывая риски, связанные с использованием концентрированной H₂SO₄.

Индукция каллусогенеза из семян проса обыкновенного

Каллусообразующая способность и интенсивность развития каллуса играют важную роль в дальнейшей успешной работе по культуре тканей и органов. Добавление аминокислот в питательную среду, наряду с нитратами, оказывают стимулирующее действие на рост культуры тканей [19].

Формирование первичной каллусной ткани проса происходит на 5-7 сутки. Активную пролиферацию тканей из семян отмечали на 10-15 сутки. На 28-30 сутки была сформирована первичная каллусная масса в объеме, позволяющем провести ее субкультивирование. Полученные результаты относительно частоты образования каллусогенеза представлены на Рисунке 1.

В ходе исследования по индукции каллусообразования из семян проса, у эксплантов, высаженных на питательную среду, наблюдалось прорастание проростка (первичного корешка) в течении 3-х суток. После удаления проростка, первичный каллус (недифференцированная масса клеток) формировался на поверхности семян спустя 5-7 дней (Рисунок 2а). Эти данные полностью соответствуют ранее опубликованным нами данным по индукции каллусообразования у семян пяти сортов проса американской селекции: Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee и Trailblazer [7].

Полученные результаты, представленные на Рисунке 1, свидетельствуют о том, что при культивировании максимальная частота каллусообразования отмечена при использовании МС2-среды у обоих сортов Кормового-14 и Яркого-6 (95%). Незначительно более низкая частота каллусообразования была отмечена на вариантах питательных сред МС1, МС3, МС4 и в среднем составила у сорта Кормовое-14 (94%), у сорта Яркое-6 (93%). Сходные дан-

ные по частоте каллусообразования из семян проса обыкновенного (от 82% до 96 %) были также получены другими исследователями [9, 19].

Из полученных результатов следует, что наиболее благоприятной для индукции каллусогенеза семян проса является питательная среда МС2, содержащая минеральные соли по прописи МС с добавлением 30 г/л мальтозы и витаминов по прописи Гамборга В5. В качестве регуляторов роста использовали 0.2 мг/л БАП и 3 мг/л 2.4-Д (Рисунок 1).

В ходе исследования каллуса, формируемого из семян проса было выявлено два фенотипических типа: каллус I типа характеризуется водянистой консистенцией и отсутствием морфогенеза (неспособность к дифференцировке в ткани растения) и каллус II типа отличается компактной структурой, желто-кремовым цветом с признаками соматического эмбриогенеза, проявляющиеся в образовании белых, плотных и компактных структур. Наличие зеленых точек на каллусе II типа является индикатором потенциального развития растений-регенерантов. Начальная стадия каллусообразования у всех изученных сортов проса характеризовалась формированием каллуса I типа, который либо оставался в первичном состоянии, либо трансформировался в каллус II типа в процессе культивирования.

Первичный каллус I типа демонстрирует низкую интенсивность клеточного деления, что приводит при длительном культивировании к замедленному развитию и частичному отмиранию.

В ходе исследования каллуса, формируемого из семян проса, было выявлено два фенотипических типа: каллус I типа - характеризуется водянистой консистенцией и отсутствием морфогенеза (неспособность к дифференцировке в ткани растения). Каллус II типа - отличается компактной структурой, желто-кремовым цветом и демонстрирует признаки соматического эмбриогенеза, что проявляется в образовании белых, плотных и компактных

структур. Наличие зеленых точек на каллусе II типа является индикатором потенциального развития растений-регенерантов. Начальная стадия каллусообразования у всех изученных сортов проса характеризовалась формированием каллуса I типа, который либо оставался в первичном состоянии, либо трансформировался в каллус II типа в процессе культивирования.

Первичный каллус I типа демонстрирует низкую интенсивность клеточного деления, что приводит к замедленному развитию и частичному отмиранию при длительном культивировании. Однако в некоторых случаях было отмечено, что каллус развивается и растет намного быстрее, сохраняя высокую жизнеспособность в течение длительного времени (до 6 месяцев) на питательной среде LP9 при дополнительном введении L-пролина (100 мг/л), L-глутамина (500 мг/л) и гидролизата казеина (500 мг/л) в качестве дополнительных источников питания [20].

После 35-40 дней культивирования на среде для индукции каллусообразования, каллусы были перенесены на питательную среду для эмбриогенеза (Рисунок 2в). Далее

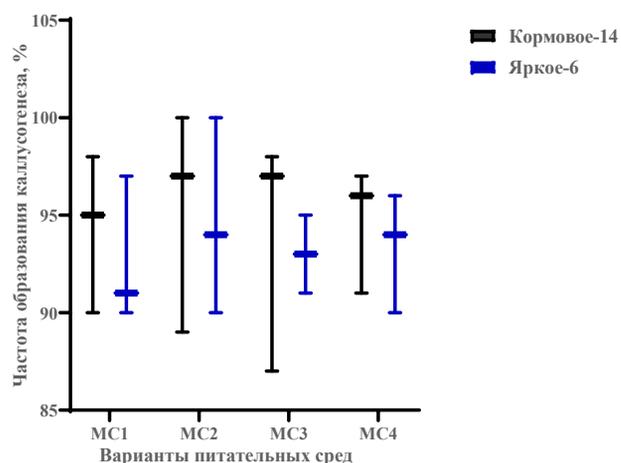


Рисунок 1 – Частота образования каллусогенеза на различных питательных средах



Рисунок 2 – Различные стадии индукции каллусогенеза проса и регенерации проростков из эксплантов

Примечание: а) индукция каллуса из семян; б) морфогенный каллус на среде МС + 0.5 мг/л БАП и 2 мг/л 2.4-Д; в) морфогенный, плотный, компактный каллус с ярко-зелеными глобулярными участками; г) морфогенный, рыхлый, компактный каллус с выраженными участками дифференциации на среде МС + 4 мг/л БАП; д) формирование растения-регенеранта; е-и) растения-регенеранты на среде МС 0.2 мг/л ИМК + 0.1 мг/л БАП; к) регенерант проса обыкновенного в стерильной почве.

кallусы были высажены на питательную среду МС, рН 5.8, содержащую 2 г/л L-пролин, 30 г/л мальтозы, 5 мг/л 2.4-Д и 1 мг/л БАП, что привело к 100% индукции эмбрионного каллуса для всех сортов. Полученные нами данные коррелируют с данными американских исследователей, изучавших частоту индукции образования первичного и эмбрионного каллуса из семян коммерческого сорта проса прутьевидного Аламо [17].

Несмотря на высокую интенсивность клеточного деления в структурированном каллусе обоих генотипов, было установлено, что это не коррелирует с высокой частотой регенерации растений. Исследованные сорта проса, в частности Кормовое-14 и Яркое-6, индуцировали оба типа каллуса из семян, однако только каллус I типа демонстрировал способность к регенерации растений. Низкий уровень образования каллусной ткани является одним из ключевых факторов, ограничивающих регенерационный потенциал растений.

Использование семян в качестве эксплантов позволяет оптимизировать процесс по введению в культуру *in vitro*, каллусообразования и регенерации растений проса. Индукция каллуса из семян хорошо изучена, однако проблема регенерации растений проса в культуре *in vitro* путем органогенеза или соматического эмбриогенеза остается актуальной из-за крайне низкой частоты регенерации. В нашем исследовании удалось получить растения-регенеранты у всех исследуемых генотипов проса благодаря оптимальному подбору условий и питательных сред (Рисунок 3).

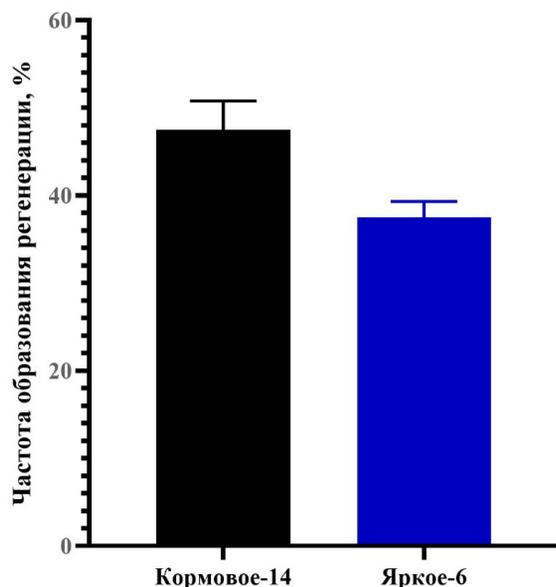


Рисунок 3 – Эффективность регенерации растений сортов проса Кормовое-14 и Яркое-6

Наиболее интенсивная регенерация растений наблюдалась в каллусе I типа. Формирование плотного структурированного каллуса с ярко-зелеными глобулярными участками происходит через 50-60 дней после начала культивирования эксплантов (Рисунок 2в, г). Регенерационная способность у злаковых культур часто связывается с появлением в каллусной ткани именно этих плотных участков, образованных мельчайшими меристематическими

клетками. Однако следует отметить, что при последующем культивировании результаты были неоднозначными. Наряду с сформировавшимися растениями-регенерантами часть из них по непонятным причинам прекращала дифференцировку, темнела и некротировала. Например, каллусная культура на среде РЕГ1, содержащая в себе большое количество плотных, структурированных хлорофиллсодержащих участков, не проявила регенерационную способность, не смотря на высокое количество зеленых точек у эксплантов. Причиной этому, вероятно, является отсутствие в среде дополнительных цитокининов. Хотя в ряде работ индукция каллусообразования и регенерация у проса обыкновенного была достигнута на питательной среде, содержащей только ауксин [21].

Среды РЕГ2 и РЕГ3 содержали одинаково высокие концентрации различных цитокининов. Степень индукции регенерации на среде РЕГ2 была на более низком уровне чем на среде РЕГ3. Формирование растений-регенерантов наблюдалось у обоих сортов уже через 3-4 недели после каллусообразования на среде РЕГ3. Следовательно, регенерация этих сортов начиналась через 50-60 дней после высадки эксплантов на среду.

Высокие показатели регенерации также были характерны для каллусной культуры на среде РЕГ4 у обоих сортов. Однако вместо развития побегов, наблюдалось образование корней.

Регенеранты, успешно сформировавшие корневую систему и достигшие размеров около 7-8 см, были пересажены в стерильную почву и выращены в условиях повышенной влажности (Рисунок 2ж, к).

Таким образом, в результате проведенных исследований в культуру *in vitro* были введены два отечественных сорта проса обыкновенного. Разработан эффективный протокол для индукции каллусообразования и регенерации из семян проса обыкновенного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ зарубежных исследований по культуре проса обыкновенного показывает, что данная культура обладает широким потенциалом и может быть применена в различных отраслях. В Казахстане ежегодно выращивается проса на площади около 17,5 тыс. га, что подчеркивает важность продолжения исследований в этой области.

Одним из перспективных направлений в изучении регенерационного потенциала проса является разработка методов внедрения в культуру *in vitro* путем анализа и улучшения существующих протоколов. В данном исследовании мы сосредоточились на отечественных сортах проса: Кормовое-14 и Яркое-6. Для обеспечения высокой чистоты эксплантов важным этапом является получение асептического растительного материала путем стерилизации семян. Мы использовали 5% раствор гипохлорита натрия для стерилизации семян.

Нами была исследована способность образования каллуса и его развития в культуре тканей и органов семян проса. Для стимуляции роста культуры тканей добавляли аминокислоты и нитраты. Среди четырех питательных сред для формирования каллуса и регенерации растений *in vitro* наиболее эффективными оказались среда МС2 для

индукции каллуса и среда РЕГЗ для регенерации растений проса обыкновенного обоих сортов. Мы достигли высокой частоты индукции каллуса (95%) для обоих сортов и 100% индукции эмбрионного каллуса при использовании среды МС с добавлением 2 г/л L-пролина, 30 г/л мальтозы, 5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП.

Регенерация растений из каллуса у обоих сортов происходила путем соматического эмбриогенеза. Максимальное количество проростков было получено на безауксиновой среде МС, содержащей 4 мг/л БАП. Регенерированные проростки успешно укоренились после переноса на полноценную среду МС с добавлением 0.2 мг/л ИМК и 0.1 мг/л БАП, а также 2% сахарозы. Укоренившиеся саженцы были адаптированы и успешно перенесены в почву.

Полученные результаты могут послужить основой для разработки эффективных методов генетической трансформации и создания трансгенных растений проса обыкновенного.

ФИНИНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках проекта грантового финансирования Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан ИРН: AP05130387 «Получение трансгенных растений проса прутьевидного с низким содержанием лигнина для целлюлозно-бумажной промышленности».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. <https://www.fao.org/statistics/en/> (Дата доступа: 22 апреля 2024).
2. Biesiekierski J. R. What is gluten? // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2017. – Т. 32 Suppl 1. – С. 78-81.
3. Bobkov S. V. Method for preparing regenerate-plants in millet another culture (*Panicum miliaceum* L.) using heat stress // Patent RU № 2006111118/13. 2007. Bull. № 35.
4. Santha B. Somatic Embryogenesis in Pearl Millet (*Pennisetum Glaucum* (L) R.Br.) Using Light and Electron Microscopy // *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science.* – 2013. – Т. 5. – С. 01-09.
5. Varalaxmi Y., Vijayalakshmi A., Kumar K. R., Vijayalakshmi T., Maheswari M. Efficient Plant Regeneration from Shoot Apices of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) // *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 47-53.
6. Jain S., Varshney A., Kothari S. L. Embryogenic Callus Induction and Efficient Plant Regeneration in Proso Millet // *Cereal Research Communications.* – 2001. – Т. 29, № 3. – С. 313-320.
7. Rakhimzhanova A. O., Bekkuzhina S. S., Zhumabek A. T., Ramankulov Y. M., Manabayeva S. A. In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* – 2018. № 3.
8. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum.* – 1962. – Т. 15, № 3. – С. 473-497.
9. Ashok B. Standardization of in-vitro Callus Induction and Regeneration Protocol for Mature Embryo of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* – 2017. – Т. 6. – С. 2153-2163.
10. Gupta P., Raghuvanshi S., K Tyagi A. Assessment of the Efficiency of Various Gene Promoters via Biolistics in Leaf and Regenerating Seed Callus of Millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli* // *Plant Biotechnology.* – 2001. – Т. 18, № 4. – С. 275-282.
11. Grant J. N., Burris J. N., Stewart C. N., Lenaghan S. C. Improved tissue culture conditions for the emerging C4 model *Panicum hallii* // *BMC Biotechnology.* – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 39.
12. Somleva M. N., Tomaszewski Z., Conger B. V. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Switchgrass // *Crop Science.* – 2002. – Т. 42, № 6. – С. 2080-2087.
13. Somleva M. N., Snell K. D., Beaulieu J. J., Peoples O. P., Garrison B. R., Patterson N. A. Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop // *Plant Biotechnol J.* – 2008. – Т. 6, № 7. – С. 663-78.
14. Ogawa Y. Long-term maintenance of high regeneration ability of switchgrass embryogenic callus // *Plant Biotechnology.* – 2015. – Т. 32, № 3. – С. 239-242.
15. Ogawa Y., Honda M., Kondo Y., Hara-Nishimura I. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method for switchgrass genotypes using Type I callus // *Plant Biotechnology.* – 2016. – Т. 33, № 1. – С. 19-26.
16. Ogawa Y., Shirakawa M., Koumoto Y., Honda M., Asami Y., Kondo Y., Hara-Nishimura I. A simple and reliable multi-gene transformation method for switchgrass // *Plant Cell Rep.* – 2014. – Т. 33, № 7. – С. 1161-72.
17. Lin C.-Y., Donohoe B. S., Ahuja N., Garrity D. M., Qu R., Tucker M. P., Himmel M. E., Wei H. Evaluation of parameters affecting switchgrass tissue culture: toward a consolidated procedure for *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass (*Panicum virgatum*) // *Plant Methods.* – 2017. – Т. 13, № 1. – С. 113.
18. Ramamoorthy R., Kumar P. P. A simplified protocol for genetic transformation of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // *Plant Cell Rep.* – 2012. – Т. 31, № 10. – С. 1923-31.
19. Liu B., Wu H., Yang S., Wu E., Yang P., Gao X. Efficient callus induction and regeneration in proso millet // *Agronomy Journal.* – 2021. – Т. 113, № 5. – С. 4003-4012.
20. Burris J. N., Mann D. G. J., Joyce B. L., Stewart C. N. An Improved Tissue Culture System for Embryogenic Callus Production and Plant Regeneration in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // *BioEnergy Research.* – 2009. – Т. 2, № 4. – С. 267-274.
21. Bajaj Y. P. S., Sidhu B. S. and Dubey V. K. Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass - *Panicum* sps // *Euphytica.* – 1981. – Т. 30. – С. 135-140.

REFERENCES

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. <https://www.fao.org/statistics/en/> (Accession date: 22 Apr 2024).
2. Biesiekierski J. R. What is gluten? // J Gastroenterol Hepatol. – 2017. – V. 32 Suppl 1. – P. 78-81.
3. Bobkov S. V. Method for preparing regenerate-plants in millet another culture (*Panicum miliaceum* L.) using heat stress // Patent RU № 2006111118/13. 2007. Bull. № 35.
4. Santha B. Somatic Embryogenesis in Pearl Millet (*Pennisetum Glaucum* (L) R.Br.) Using Light and Electron Microscopy // IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science. – 2013. – V. 5. – P. 01-09.
5. Varalaxmi Y., Vijayalakshmi A., Kumar K. R., Vijayalakshmi T., Maheswari M. Efficient Plant Regeneration from Shoot Apices of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) // Plant Tissue Culture and Biotechnology. – 2010. – V. 20, № 1. – P. 47-53.
6. Jain S., Varshney A., Kothari S. L. Embryogenic Callus Induction and Efficient Plant Regeneration in Proso Millet // Cereal Research Communications. – 2001. – V. 29, № 3. – P. 313-320.
7. Rakhimzhanova A. O., Bekkuzhina S. S., Zhumabek A. T., Ramankulov Y. M., Manabayeva S. A. In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2018. № 3.
8. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 473-497.
9. Ashok B. Standardization of in-vitro Callus Induction and Regeneration Protocol for Mature Embryo of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – V. 6. – P. 2153-2163.
10. Gupta P., Raghuvanshi S., K Tyagi A. Assessment of the Efficiency of Various Gene Promoters via Biolistics in Leaf and Regenerating Seed Callus of Millets, Eleusine coracana and Echinochloa crusgalli // Plant Biotechnology. – 2001. – V. 18, № 4. – P. 275-282.
11. Grant J. N., Burris J. N., Stewart C. N., Lenaghan S. C. Improved tissue culture conditions for the emerging C4 model *Panicum hallii* // BMC Biotechnology. – 2017. – V. 17, № 1. – P. 39.
12. Somleva M. N., Tomaszewski Z., Conger B. V. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Switchgrass // Crop Science. – 2002. – V. 42, № 6. – P. 2080-2087.
13. Somleva M. N., Snell K. D., Beaulieu J. J., Peoples O. P., Garrison B. R., Patterson N. A. Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop // Plant Biotechnol J. – 2008. – V. 6, № 7. – P. 663-78.
14. Ogawa Y. Long-term maintenance of high regeneration ability of switchgrass embryogenic callus // Plant Biotechnology. – 2015. – V. 32, № 3. – P. 239-242.
15. Ogawa Y., Honda M., Kondo Y., Hara-Nishimura I. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method for switchgrass genotypes using Type I callus // Plant Biotechnology. – 2016. – V. 33, № 1. – P. 19-26.
16. Ogawa Y., Shirakawa M., Koumoto Y., Honda M., Asami Y., Kondo Y., Hara-Nishimura I. A simple and reliable multi-gene transformation method for switchgrass // Plant Cell Rep. – 2014. – V. 33, № 7. – P. 1161-72.
17. Lin C.-Y., Donohoe B. S., Ahuja N., Garrity D. M., Qu R., Tucker M. P., Himmel M. E., Wei H. Evaluation of parameters affecting switchgrass tissue culture: toward a consolidated procedure for Agrobacterium-mediated transformation of switchgrass (*Panicum virgatum*) // Plant Methods. – 2017. – V. 13, № 1. – P. 113.
18. Ramamoorthy R., Kumar P. P. A simplified protocol for genetic transformation of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // Plant Cell Rep. – 2012. – V. 31, № 10. – P. 1923-31.
19. Liu B., Wu H., Yang S., Wu E., Yang P., Gao X. Efficient callus induction and regeneration in proso millet // Agronomy Journal. – 2021. – V. 113, № 5. – P. 4003-4012.
20. Burris J. N., Mann D. G. J., Joyce B. L., Stewart C. N. An Improved Tissue Culture System for Embryogenic Callus Production and Plant Regeneration in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // BioEnergy Research. – 2009. – V. 2, № 4. – P. 267-274.
21. Bajaj Y. P. S., Sidhu B. S. and Dubey V. K. Regeneration of genetically diverse plants from tissue cultures of forage grass - *Panicum* sps // Euphytica. – 1981. – V. 30. – P. 135-140.

UDC: 57.085.2

STUDY OF REGENERATION POTENTIAL IN COMMON MILLET (*PANICUM MILIACEUM* L.) VARIETIES IN VITRO CULTUREA.T. Zhumabek^{1,2}, M.Y. Sutula¹, S.A. Manabayeva^{1,2,*}¹National Center for Biotechnology, 010000, Kazakhstan, Astana, Qorgalzhyn hwy., 13/5²L.N. Gumilyov Eurasian National University, 010000, Kazakhstan, Astana, Munaitpasov str., 13

*Corresponding author: manabayeva@biocenter.kz

ABSTRACT

In Kazakhstan, common millet (*Panicum miliaceum* L.) stands as a significant agricultural crop, annually cultivated over an area of approximately 17.5 thousand hectares. This study aimed to develop and optimize a simple and effective method for inducing callus formation and plant regeneration in millet. The research focused on exploring the regeneration potential of Kazakhstani varieties, Kormovoe-14 and Yarkoe-6. Seeds of millet were cultivated on modified Murashige and Skoog medium supplemented with Gamborg B5 vitamins and growth regulators, including 2 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 6-BAP, to induce callusogenesis. Additionally, amino acids such as 500 mg/L L-proline and 300 mg/L casein hydrolysate were added to the medium to provide an additional nitrogen source. The induction frequency of callusogenesis averaged 95% for both Kormovoe-14 and Yarkoe-6 breeding lines. All examined varieties exhibited 100% induction of embryogenic callus when using MS medium supplemented with 2 g/L L-proline, 30 g/L maltose, 5 mg/L 2,4-D, and 1 mg/L BAP. Morphogenic, friable, and compact Type II calli with chlorophyll-containing zones were transferred to MS medium for regeneration, containing 4 mg/L BAP and 500 mg/L L-proline. The maximum number of shoots for both varieties was obtained on auxin-free MS medium containing 4 mg/L BAP, with a regeneration frequency of 47.5% (Kormovoe-14) and 37.5% (Yarkoe-6). Regenerated plants were transferred to full-strength MS medium supplemented with 0.2 mg/L IAA and 0.1 mg/L BAP, 2% sucrose, for rhizogenesis. Successfully rooted plantlets were adapted and transferred to soil. These findings lay the groundwork for the development of effective genetic transformation methods and the creation of transgenic proso millet plants.

Keywords: *Panicum miliaceum*, common millet, in vitro regeneration, morphogenesis induction

ӘОК: 57.085.2

IN VITRO ЖАҒДАЙЫНДА КӘДІМГІ ТАРЫ СОРТТАРЫНЫҢ (*PANICUM MILIACEUM* L.) РЕГЕНЕРАЦИЯЛЫҚ ӘЛЕУЕТІН ЗЕРТТЕУЖұмабек А.Т.^{1,2}, Сутула М.Ю.¹, Манабаева Ш.А.^{1,2,*}¹Ұлттық биотехнология орталығы, 010000, Қазақстан, Астана қ., Қорғалжын тас жолы, 13/5²Л.Н.Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 010000, Қазақстан, Астана қ., Мұңайтпасов көш., 13

*Corresponding author: manabayeva@biocenter.kz

ТҮЙІН

Қазақстанда тары (*Panicum miliaceum* L.) маңызды ауылшаруашылық дақылы болып табылады және жыл сайын шамамен 17,5 мың га алқапта өсіріледі. Бұл зерттеуде тары өсімдіктерінде каллус түзілуі мен регенерациясын индукциялаудың қарапайым және тиімді әдісі әзірленді және оңтайландырылды. Зерттеудің мақсаты Кормовое-14 және Яркое-6 қазақстандық тары сорттарының регенерация мүмкіндіктерін зерттеу болды. Каллусогенезді индукциялау үшін тары тұқымдарын модификацияланған Мурасиге және Скуг қоректік ортасында Гамбург В5 витаминдерін, сондай-ақ 2 мг/л 2,4-Д және 0.5 мг/л 6 БАП өсу реттегіштерін қосу арқылы өсірілді. Азоттың қосымша көзін қамтамасыз ету үшін ортаға 500 мг/л L-пролин және 300 мг/л казеин гидролизаты сияқты аминқышқылдары қосылды. Каллус индукциясының жиілігі Кормовое-14 және Яркое-6 селекциялық линиялары үшін орта есеппен 95%-ға жетті. Барлық зерттелген сорттар 2 г/л L-пролин, 30 г/л мальтоза, 5 мг/л 2,4-Д және 1 мг/л БАП қосылған MS қоректік ортасын қолданғанда эмбриогенді каллустың 100% индукциясын көрсетті. Құрамында хлорофилл аймақтары бар II типті морфогенді, борпылдақ және жинақты каллустар регенерация үшін 4 мг/л БАП және 500 мг/л L-пролин бар MS қоректік ортасына қайта ауыстырылды. Екі сорт бойынша өскіндердің максималды саны 4 мг/л БАП бар ауксинсіз MS қоректік ортасында алынды, регенерация жиілігі 47.5% (Кормовое-14 сорты) және 37.5% (Яркое-6). Ризогенез үшін регенерант-өсімдіктер 0.2 мг/л ИМҚ және 0.1 мг/л БАП, 2% сахароза қосылған толық MS ортасына ауыстырылды. Тамырланған көшеттер сәтті бейімделіп, топыраққа ауыстырылды. Алынған нәтижелер генетикалық трансформацияның тиімді әдістерін жасауға және кәдімгі тарының трансгенді өсімдіктерін құруға негіз болды.

Түйінді сөздер: кәдімгі тары, *Panicum miliaceum*, морфогенез индукциясы, *in vitro* регенерациясы