

## Криоконсервация каллусных клеток зерновых культур в электроморозильной камере

Сергушкина М. И. \*, Шуплецова О. Н.\*\*,  
Полежаева Т. В. \*, Зайцева О. О. \*,  
Худяков А. Н. \*, Соломина О. Н. \*

\* ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,

г. Сыктывкар

\*\* Федеральный аграрный научный центр

Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого,

г. Киров

mara.kovalkova@mail.ru

### Аннотация

Современная селекция зерновых культур, таких как пшеница (*Triticum aestivum* L.) и ячмень (*Hordeum vulgare* L.), дополняется биотехнологическими методами, включая клеточную селекцию *in vitro* и генетическую трансформацию. Для долговременного сохранения полученных уникальных клеточных линий и минимизации генетических изменений необходимо применять метод криоконсервации, который останавливает метаболизм и исключает необходимость регулярных пассажей.

Цель работы оценить эффективность применения криоконсервирующих сред (глицерин, глицерин и яблочный пектин) для сохранения каллусных клеток яровых ячменя и пшеницы при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях бытового электроморозильника. Использовали каллусы ячменя (четыре линии) и пшеницы (две линии), полученные из незрелых зародышей. Клетки каллуса замораживали под защитой криоконсервирующих сред в электроморозильнике  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 7 суток, с последующим культивированием размороженных клеток каллуса на питательной среде. Перед охлаждением и после размораживания оценивали жизнеспособность клеток каллуса при помощи витального красителя, а также способность клеток после отогрева к рекультивации. Установлено, что после воздействия отрицательной температуры при использовании криоконсервирующих растворов целостность клеточной мембраны каллусов как ячменя, так и пшеницы, независимо от генотипов, сохранялась стабильно на уровне 50 %. Таким образом, определено, что применение криоконсервирующих сред (глицерина, глицерина и яблочного пектина) при сохранении каллусных клеток яровых пшеницы и ячменя при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях бытового электроморозильника является успешным в отношении сохранности целостности клеточной мембраны клеток каллуса.

### Ключевые слова:

каллус пшеницы, каллус ячменя, яблочный пектин, глицерин, целостность клеточной мембраны, генотип, культивирование

## Cryopreservation of callus cells of grain crops in electric freezer

Sergushkina M. I. \*, Shupletsova O. N.\*\*,  
Polezhaeva T. V. \*, Zaitseva O. O. \*,  
Khudyakov A. N. \*, Solomina O. N. \*

\* Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,

Syktvykar

\*\* N. V. Rudnitsky Federal Agricultural Science Centre

of the North-East, Kirov

mara.kovalkova@mail.ru

### Abstract

Modern breeding of cereals such as wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) is complemented by biotechnological methods, including *in vitro* cell selection and genetic transformation. For long-term preservation of the resulting unique cell lines and minimisation of genetic changes, the scientists should use cryopreservation, which halts metabolism and eliminates the need for regular passages.

The aim of this study was to evaluate the efficiency of cryopreservation media (glycerol, glycerol and apple pectin) for preserving spring barley and wheat callus cells at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a domestic electric freezer. Barley (four lines) and wheat (two lines) calli obtained from immature embryos were used. Callus cells were frozen under the protection of cryopreservative media in electric freezer at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for seven days, followed by cultivation of thawed callus cells in a nutrient medium. Before cooling and after thawing, we assessed the viability of callus cells using a vital dye. The ability of cells to regenerate after thawing was also assessed. After exposure to subzero temperatures using cryopreservation solutions, the cell membrane integrity of both barley and wheat calli, regardless of genotype, was consistently maintained at 50 %. Thus, the use of cryopreservation media (glycerol, glycerol and apple pectin) for preserving spring wheat and barley callus cells at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a domestic electric freezer is successful in maintaining the cell membrane integrity of callus cells.

### Keywords:

wheat callus, barley callus, apple pectin, glycerol, cell membrane integrity, genotype, cultivation

## Введение

Для обеспечения продовольственной безопасности и устойчивого существования человечества в условиях роста численности населения необходима интенсификация сельскохозяйственного производства, сопряженная с адаптацией к изменяющимся окружающим условиям. Ключевым моментом для этого является создание высокопродуктивных сельскохозяйственных культур, прежде всего зерновых, обладающих устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Пшеница, ячмень – одни из основных продовольственных культур современного мира [1]. Сорты селекции аграрного научного центра Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого (Россия) служат ценным источником генов, которые обуславливают устойчивость к спектру стрессоров, актуальных для Евро-Северо-Востока (повышенная кислотность почв, изменения температуры, патогены и др.) [2, 3], что особенно актуально в условиях нарастающих климатических изменений. Так же огромные усилия и средства направляются на улучшение производственных характеристик ценных сортов путем использования современных научных методов. Помимо классической селекции генотипов, основанной на гибридизации и отборе, применяется биотехнологический подход, который предполагает селекцию клеток *in vitro* с использованием каллусных и суспензионных культур, генетическую трансформацию и соматическую гибридизацию [4].

Сохранение в стационарном состоянии уникальных *in vitro* клеточных линий, полученных в результате этих сложных и затратных процедур, является актуальной проблемой [5]. Для решения данной задачи применяют современный и эффективный способ криоконсервирования, при котором метаболические процессы замедляются, отпадает необходимость частых пересадок и снижается риск соматической изменчивости.

По сравнению с животными клетками криоконсервация растительных клеток значительно затруднена, что связано с наличием в них крупных вакуолей, заполненных водой [6]. Не все растительные объекты имеют большие вакуоли, например, пыльца и семена содержат минимальное количество воды, поэтому в отношении них криоконсервация не имеет особой сложности. В этом случае растительный материал (пыльцу, семена) помещают непосредственно в жидкий азот, далее размораживают в воздушной среде при комнатной температуре. В настоящее время разработаны типичные протоколы криоконсервации, которые основаны на хранении клеток при температуре  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  в жидком азоте [4, 7, 8]. Однако процедура заморозки с использованием жидкого азота связана с большими трудностями в применении данного способа (дорогостоящее оборудование и его обслуживание, необходимость специального обучения персонала и налаженной логистики от производителя или поставщика, сложность равномерного и контролируемого замораживания и др.). Особенности современных лабораторий и использование более доступного технического оборудования, в частности бытовых электроморозильников, предоставляет возможность

разрабатывать новые протоколы для заморозки культур клеток без применения жидкого азота. При работе с каллусными клетками необходимо учитывать их особенности. Каллусные культуры растений способны к неограниченному пролиферативному росту в недифференцированном состоянии *in vitro*, сохраняя тотипотентность, которая при определенных условиях индуцирует их дифференцировку в специализированные структуры. Однако их длительное культивирование сопряжено с риском возникновения соматической изменчивости в клетках, ведущей к генетической нестабильности, а также требует значительных ресурсов для поддержания. В этой связи криоконсервация каллусных линий представляет собой необходимый метод для долгосрочного сохранения хозяйственно-значимых генотипов. Несмотря на существующие протоколы криоконсервации каллусов [9], внутриклеточные метаболические процессы, происходящие на этапах заморозки, оттаивания и последующей регенерации, остаются недостаточно изученными. Решение вопроса о долговременной сохранности каллусных и суспензионных клеток имеет практическое значение для современной селекции. Серьезной проблемой использования метода криоконсервирования, особенно для однодольных культур, прежде всего зерновых, являются низкая жизнеспособность и слабое возобновление роста растительных клеток после оттаивания. Эффективная криоконсервация растительных клеток, тканей и органов *in vitro* требует минимизации содержания свободной воды, способной к кристаллизации. Обезвоживание растительных препаратов перед замораживанием – обязательная процедура, так как клетки освобождаются от несвязанной воды, которая при замораживании образует кристаллы льда, что приводит к повреждению и гибели клеток. Следует отметить, что на всех этапах заморозки клетки испытывают стресс, спровоцированный воздействием комплекса различных факторов, которые вызывают образование свободных радикалов и создают условия для появления генетических изменений. Для устранения этих проблем при процедуре заморозки используются консервирующие среды, способствующие сохранности разных типов клеток, тканей и т. д. Современные консервирующие среды имеют разнообразный состав и могут включать сочетание проникающих и не проникающих криопротекторов [10]. Необходимо отметить, что некоторые криопротекторы, например диметилсульфоксид (ДМСО), часто используются при криоконсервировании клеток и являются токсичными и обладают мутагенными свойствами [там же]. Рассматривая каллусные клетки зерновых культур как многообещающий во всех сферах биологический объект и современные перспективы использования отрицательных температур ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), нами был разработан новый протокол заморозки для этих объектов.

Цель данной работы – оценить эффективность применения криоконсервирующих сред (глицерин, глицерин и яблочный пектин) для сохранения каллусных клеток яровых ячменя и пшеницы при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях бытового электроморозильника.

## Материалы и методы

### Характеристика каллуса

Используемые в работе генотипы ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) (селекционные линии 143-20; 460-20; 515-20; 502-20) и яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) (селекционные линии 151; 230) относятся к селекции ФАНЦ Северо-Востока, и ранее не подвергались отбору на устойчивость к экстремальным температурам. При введении в культуру *in vitro* эксплантами служили незрелые зародыши, извлеченные из зерновки на 12–14-й день после опыления. Индукцию каллуса осуществляли на среде Мурасиге и Скуга (МС) [11], содержащей витамины (мг/л: В1 – 1,0; В2 – 0,5; В3 – 2,0; В5 – 1,0; В6 – 1,0; В7 – 1,0; В9 – 0,5; В12 – 0,0015) и синтетический фитогормон 2,4-Д (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота – 2–5 мг/л). В двухнедельном возрасте каллус для проведения клеточной селекции на стрессоустойчивость пассировали на искусственные среды с измененным набором фитогормонов (0,5 мг/л – индо-лилуksусная кислота, 1 мг/л – кинетин, 0,01 мг/л – гибберелловая кислота). По истечении трех недель прошедшие отбор *in vitro* каллусные линии ячменя и пшеницы с перспективой регенерации растений представляли селекционную ценность в качестве генотипов с устойчивостью к почвенным стрессорам.

### Криоконсервирование клеток

В качестве биологического объекта для криоконсервации использовали клетки каллуса (в возрасте пяти недель). Цвет каллусной ткани – белый без примесей. Для эксперимента от тела каллуса отделяли агрегат размером 10×10 мм и помещали в криопробирку. Далее к каждому образцу добавляли одну из криоконсервирующих сред по 1,8 мл. Каллусы замораживали в среде МС с добавлением криопротектора – глицерина 10 % (контрольная группа) и с криоконсервирующей средой в комбинации глицерина 10 % и яблочного пектина AU-701 (Herbstreith&FoxKG, Германия) 0,2 %, химическая характеристика полисахарида представлена в табл. 1. Среды для криоконсервирования готовили за сутки до заморозки и автоклавировали при одной атмосфере, 25 мин, доведены до pH=5,8–6,1. Криопробирки с образцами, погруженными в криоконсервирующие среды, помещали в воздушную среду холодильника при +5 °С для экспозиции в течение суток. Затем для дальнейшего замораживания и хранения их переносили в воздушную среду камеры электроморозильника при температуре -80 °С «Vestfrost» (Дания). Средняя скорость охлаждения от +20 °С до -20 °С составила 2,6°/мин, далее до -80 °С – по 3,5 °С/мин. Через семь суток хранения пробы размораживали в 10-литровой водяной бане (+38...+40 °С),

при интенсивном встряхивании в течение 2 мин. После отогрева проводили процедуру отмывки каллуса от криоконсервирующего раствора (замена криопротекторной среды на среду МС), экспозиция в среде МС – 30 мин. Процедуру замораживания-отогрева осуществляли по 10 тестирований с каждой из сред для каждого генотипа (всего – 100 исследований).

### Определение жизнеспособности клеток

При работе с клеточными культурами важнейшим параметром является их жизнеспособность. С помощью световой микроскопии (Nikon H550S, Япония) до заморозки и после отогрева оценивали целостность клеточной мембраны при помощи витального красителя – трипанового синего (Mw-960,81 а.е.м). Отбирали пинцетом часть каллуса и помещали его в эппендорф, далее добавляли 400 мкл среды МС и аккуратно встряхивали каллус. Пипеткой Пастера отбирали 100 мкл жидкости с клетками, каплю помещали на предметное стекло и добавляли 100 мкл 0,1%-ного раствора трипанового синего, накрывали покровным стеклом, излишки убирали фильтровальной бумагой. Препарат оценивали под микроскопом при увеличении 10×10. Определяли процент жизнеспособных клеток в образце (на 100 клеток), исходя из того, что краситель проникает через поврежденную мембрану погибших клеток, окрашивая их в синий цвет, при этом живые клетки (с неповрежденной мембраной) им не окрашиваются. Нарушение барьерной функции клеточной мембраны является общим и необходимым критерием гибели клетки.

После оттаивания и процедуры отмывки каллусы культивировали на поверхностной полутвердой питательной среде МС такого же состава, как и при индукции каллуса до заморозки. Данная процедура необходима для анализа способности клеток каллуса к возобновлению роста и морфогенетической способности после воздействия отрицательной температуры. Инкубация каллусов проводилась в течение трех недель в термостате при +25 °С. Все процедуры извлечения, разделения, пассирования, отмывания и т. д. каллусных клеток осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса. После истечения данного срока визуально оценивали прирост и особенности возобновления роста клеток.

### Статистический анализ

Статистическая обработка данных заключалась в вычислении среднего арифметического значения и среднеквадратичного отклонения. Для определения статистической значимости различий между значениями с помощью программного обеспечения «BIOSTAT»23 применяли непараметрические критерии Уилкоксона и Манна-Уитни. Значения считались достоверными при  $p < 0,05$ . Сохранность (выживаемость) представляли в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятого за 100 %.

Химическая характеристика полисахарида яблочного пектина AU-701

Chemical characteristics of apple pectin polysaccharide AU-701

Полисахарид, Mw kDa	GalA, %	CM, %	Нейтральные моносахариды, %							
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Api	Man	Fuc
AU-701, 80	91,0	38-40	2,4	3,1	0,3	1,4	2,9	1,6	0,3	-

Таблица 1

Table 1

## Результаты и их обсуждение

После проведения процедур заморозки и отогрева на первом этапе проводили первичную визуальную оценку состояния каллусной ткани. В результате анализа изменений морфологических признаков установлено, что до воздействия отрицательной температуры цвет каллуса во всех пробах был белый без особенностей в цветовой окраске, консистенция рыхлая, легкое разделение на агрегаты. Выявлено, что после заморозки и отогрева во всех образцах цвет каллуса не изменился, но повысилась плотность и, как следствие, разделение на агрегаты стало трудоемким.

В нашем исследовании выявлено, что целостность клеточной мембраны каллусов как ячменя, так и пшеницы, независимо от генотипов, сохранялась стабильно на уровне 50 % (рис. 1). Статистически значимых различий между образцами при использовании экспериментальных (различных по составу) криоконсервирующих сред не наблюдалось.

Установлено, что после процедуры криоконсервирования во всех вариантах (образцах исследования) возобновления роста и деления клеток при рекультивации на питательной среде не обнаружено. Однако в образцах с использованием криоконсервирующей среды, в составе которой был яблочный пектин, у генотипов пшеницы наблюдалось формирование ризогенных структур в каллусе (рис. 2).

Для установления жизнеспособности клеток каллуса после рекультивации в течение трех недель оценивали целостности клеточной мембраны (рис. 3). Сравнительный анализ между результатами жизнеспособности исследуемых клеток каллуса с использованием криоконсервирующих сред после воздействия отрицательной температуры  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение семи суток и результатами жизнеспособности клеток каллуса после воздействия отрицательной температуры  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  и рекультивации их в течение трех недель представлен в табл. 2. Анализ показал, что каллусные

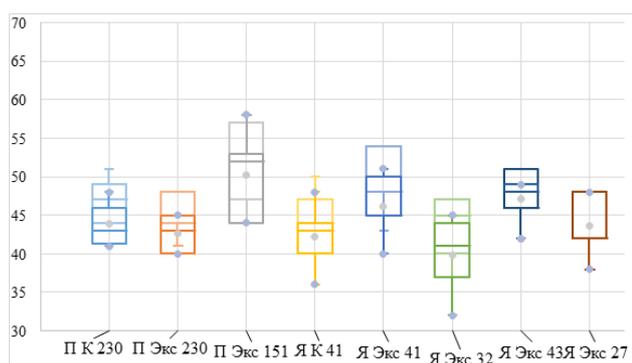


Рисунок 1. Показатель целостности клеточной мембраны каллусных клеток ячменя и пшеницы разных линий ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ ), хранившихся при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение семи суток.

Условные обозначения: К - контроль (глицерин); Экс - эксперимент (глицерин и яблочный пектин); П - пшеница; Я - ячмень; (230) и (...) - генотип. Пример - П К 230 (контроль - пшеница 230).

Figure 1. The cell membrane integrity values of callus cells of barley and wheat of different lines ( $M \pm \sigma$ ,  $n=10$ ), stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for seven days.

Keys: К - control (glycerin); Экс - experiment (glycerin and apple pectin); П - wheat; Я - barley; (230) and (...) - genotype. An example is П К 230 (wheat control 230).

клетки после рекультивирования статистически не отличаются от размороженных, следовательно, каллус после трехнедельного культивирования на питательной среде является жизнеспособным, однако в нем не сохранились способности к накоплению его биомассы и регенерации.

В данном исследовании изучали применение криоконсервирующих сред (глицерина, глицерина и яблочного пектина) для сохранения каллусных клеток яровых ячменя и пшеницы при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях бытового электроморозильника. После криоконсервирования (за-

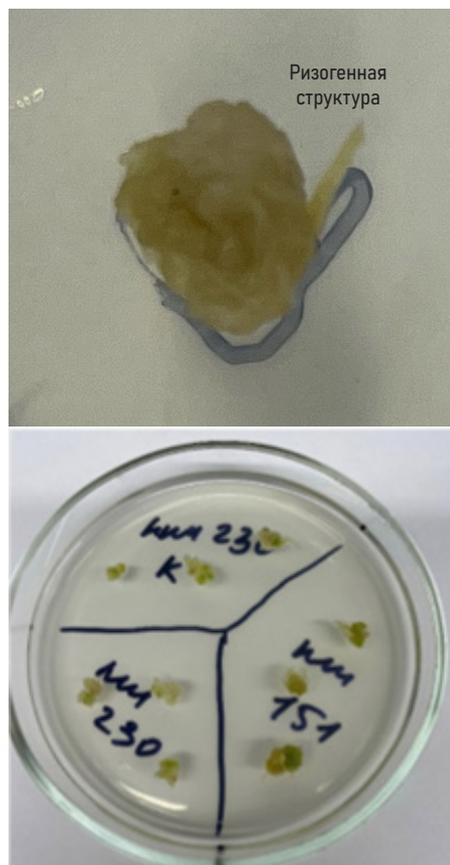


Рисунок 2. Каллус *Triticum aestivum* L. - линия 230 после воздействия отрицательной температуры  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение семи суток с последующей рекультивацией.

Figure 2. Callus *Triticum aestivum* L. - line 230 after exposure to a negative temperature of  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for seven days, followed by recultivation.



Рисунок 3. Микрофотография клеток каллуса, окрашенных трипановым синим (увеличение  $10 \times 100$ ).

Figure 3. Micrograph of callus cells stained with trypan blue (magnification  $10 \times 100$ ).

Таблица 2  
Сравнительные данные показателя целостности клеточной мембраны каллусных клеток зерновых (ячмень, пшеница) разных генотипов (M±σ, n=10), хранившихся при -80 °C в течение семи суток и каллусных клеток (M±σ, n=10) после рекультивирования в течение трех недель

Table 2  
Comparative data on the cell membrane integrity value of callus cells of cereals (barley, wheat) of different genotypes (M±σ, n=10) stored at -80 °C for seven days and callus cells (M±σ, n=10) after recultivation for three weeks

Серия	Показатели целостности мембраны клеток после оттаивания	Показатели целостности мембраны клеток после оттаивания и культивирования
ПШ К 230	45,4±5,5	43,9±2,8
ПШ ОП 230	45,0±2,8	42,6±2,3
ПШ ОП 151	51,6±5,7	50,2±5,7
ЯЧ К 41	44,6±4,1	42,2±4,2
ЯЧ ОП 41	49,4±4,4	46,2±4,1
ЯЧ ОП 32	42,2±6,0	39,8±5,1
ЯЧ ОП 43	47,2±3,6	47,0±2,7
ЯЧ ОП 27	43,6±4,0	43,0±4,1

Условные обозначения: К – контроль (глицерин); оп – опыт (глицерин и яблочный пектин); пш – пшеница, яч – ячмень; (230) и (...) – генотип.  
Keys: K – control (glycerin); op – experiment (glycerin and apple pectin); пш – wheat; яч – barley; (230) and (...) – genotype.

морозки и оттаивания) каллуса визуально наблюдаемая морфология ткани осталась неизменной по сравнению с образцами, которые не подвергались воздействию отрицательной температуры. Однако разделение каллуса на агрегаты после заморозки стало трудоемким. Криоконсервация, даже успешная, неизбежно приводит к гибели части клеток. В этом случае клетки теряют тургор, их содержимое и мембраны повреждаются. Протопласт отходит от клеточной стенки, а сами стенки становятся более жесткими и хрупкими. В результате вся ткань теряет упругость и становится не эластичной, а аморфной и вязкой, похожей на влажную вату или кашу. При попытке разделить ее, она не рвется, а деформируется, мнется и тянется, что требует больше усилий и затрудняет четкое разделение на агрегаты. Так же известно, что стресс может стимулировать синтез каллозы (β-1,3-глюкан) – полисахарида, который быстро откладывается в клеточных стенках в ответ на повреждение, что также меняет механические свойства ткани [12]. Данные факты не обязательно свидетельствуют о нежизнеспособности каллусов. Часть клеток, которая, вероятнее всего, располагалась в глубине тела каллуса, успешно перенесла заморозку, что было доказано в нашем исследовании. Установлено, что жизнеспособность каллусных клеток после воздействия отрицательной температуры с использованием криоконсервирующих сред стабильно сохранялась на уровне 50 %. Однако для последующего культивирования и закладки морфогенетических структур, в том числе инициации соматического эбриогенеза, важно получать простое разделение каллуса на агрегаты. Для оценки способности каллуса к возобновлению роста и морфогенетической способности после проведение процедур криоконсервирования нами был проведен процесс рекультивации клеток на твердых пи-

тательных средах. Согласно полученным данным, трехнедельная рекультивация не привела к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток каллуса зерновых культур по сравнению с вариантом без заморозки. Анализ целостности мембран подтвердил, что клетки остаются жизнеспособными. Следовательно, применение криоконсервирующих сред (глицерин, глицерин и яблочный пектин) для каллусных клеток зерновых является целесообразным.

Выбор в качестве основного криопротектора глицерина обусловлен тем, что он обеспечивает плавное обезвоживание биологического объекта. При криоконсервации каллусов наиболее часто используются ДМСО и глицерин, они применяются как для предварительного выращивания, так и для криозащиты [13]. Их ключевой эффект при криоконсервации – деплеция электролитов в охлажденной клетке и ее непосредственном окружении [14]. Однако эффективное использование ДМСО требует тонкого баланса. Необходимо точно подбирать его концентрацию, чтобы, с одной стороны, обеспечить нужную степень обезвоживания, а с другой – избежать клеточных повреждений (разрушение билипидного слоя мембраны), вызванных как его собственной токсичностью, так и сильным осмотическим стрессом [15]. Токсическое действие ДМСО на клетки каллуса уже проявляется после 40 мин воздействия [8]. Учитывать точное время воздействия ДМСО затруднительно и бывает не контролируемо из-за разной скорости дегидратации клеток каллуса. Так как каллусы однодольных растений отличаются большой восприимчивостью к стрессовым факторам (изменение температуры, осмотического давления и т. д.), в нашем исследовании в качестве основного криопротектора выбран глицерин. Так же эксперименты по прямому наблюдению за проникновением традиционных криопротекторов в каллус риса [16] подтверждают целесообразность нашего выбора криопротектора глицерина. Samuels и соавторы, доказали, что глицерин более активно проникает внутрь каллусной клетки, чем ДМСО и этиленгликоль. Глицерин проникает в клетку, но при этом ингибирует деплазмолиз, а клетка активно поддерживает его низкую внутриклеточную концентрацию, это прямо указывает на ее активную роль в создании и поддержании осмотического градиента. Таким образом, механизм криозащиты в растворе PVS3, где глицерин – единственный проникаемый компонент, принципиально меняется: он основан не на пассивном проникновении, а на энергозатратной регуляции со стороны самой клетки [там же]. Следовательно, применение глицерина в качестве основного компонента криоконсервирующей среды оптимально, что подтверждено результатами нашего исследования. Применение яблочного пектина в составе криоконсервирующей среды обусловлено тем, что при разработке новых криоконсервантов необходимо учитывать, что одним из сильнейших стрессовых факторов при процессе заморозки и оттаивания является окислительный стресс. Яблочный пектин – это компонент, который будет проявлять не только криозащитное свойство, но и антиоксидантную активность. Яблочный пектин обладает стабилизирующей способностью при кристал-

лизации воды [17] и имеет высокую степень антиоксидантной активности.

## Заключение

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что применение криоконсервирующих сред (глицерина, глицерина и яблочного пектина) при сохранении каллусных клеток яровых ячменя и пшеницы при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в условиях бытового электроморозильника является успешным в отношении сохранности целостности клеточной мембраны клеток каллуса и перспективным способом в области криоконсервирования. Однако данный протокол заморозки требует дальнейшей доработки, так как он не обеспечивает положительного возобновления роста каллусной биомассы после оттаивания.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Источники и литература

1. Özбек, K. Advances in wheat breeding. Chapter: Wheat Genetic Resources / K. Özбек, C. N. Keskin, N. Zencirci. – Singapore: Springer, 2024. – P. 525–554.
2. Шуплецова, О. Н. Генетические источники селекции ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в Волго-Вятском регионе / О. Н. Шуплецова, И. Н. Щенникова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – Т. 180, № 1. – С. 82–88.
3. Волкова, Л. В. Результаты сравнительного изучения коммерческих сортов яровой мягкой пшеницы в условиях Кировской области / Л. В. Волкова // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2025. – Т. 26, № 3. – С. 536–545.
4. Freezing of dehydrated calli of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in liquid nitrogen and their morphogenetic potential / A. I. Solovyeva, O. N. Vysotskaya, A. S. Popov [et al.] // Biology Bulletin. – 2010. – Vol. 37, № 5. – P. 489–495.
5. A simple and efficient protocol for cryopreservation of *Taxodium* hybrid 'zhongshanshan' embryogenic callus / T. Chen, X. Jia, C. Yu [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2024. – Vol.156, № 44.
6. Tissue culture-induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications / D. Zhang, Z. Wang, N. Wang [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – P. e96879.
7. Benson, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice / E. E. Benson // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 141–219.
8. Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method / S. A. Bekheet, V. Sota, H. M. El-Shabrawi [et al.] // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 18. – № 1.
9. Hao, Y.-J. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus / Y.-J. Hao, C.-X. You, X.-X. Deng // Cryo-Letters. – 2002. – Vol. 23, № 1. – P. 27–35.
10. Elliott, G. D. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures / G. D. Elliott, S. Wang, B. J. Fuller // Cryobiology. – Vol. 76. – P. 74–91.
11. Murashige, T. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture / T.A. Murashige, F. Scoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
12. Defense-related callose deposition in plants against pathogens: A review / S. R. Roohall, F. Fariba, G. V. Mozghan [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Vol. 320, № 4. – P. 146005.
13. Uemura, M. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen / M. Uemura, A. Sakai // Plant and Cell Physiology. – 1980. – Vol. 21. – № 1. – P. 85–94.
14. Sakai, A. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification / A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama // Plant Cell Reports. – 1990. – Vol. 9, № 3. – P. 30–33.
15. Panis, B. Cryopreservation of plant germplasm / B. Panis, R. Swennen, F. Engelmann // Acta Horticulturae. – 2001. – Vol. 560. – P. 79–86.
16. Direct observation of common cryoprotectant permeation into rice callus by CARS microscopy / F. M. D. Samuels, K. C. Pearce, S. Soderlund [et al.] // Cell Reports Physical Science. – 2023. – Vol. 4. – № 7. – P. 101469.
17. Apple pectin as a new component for cryopreservation of nucleated cells / M. I. Sergushkina, O. O. Zaitseva, A. N. Khudyakov [et al.] // Biopreservation and Biobanking. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 84–89.

## References

1. Özбек, K. Advances in wheat breeding. Chapter: Wheat Genetic Resources / K. Özбек, C. N. Keskin, N. Zencirci. – Singapore: Springer, 2024. – P. 525–554.
2. Shupletsova, O. N. Geneticheskie istochniki selekcii yachmenya *Hordeum vulgare* L. v Volgo-Vyatском regione [Genetic sources of barley (*Hordeum vulgare* L.) breeding in the Volga-Vyatka region] / O. N. Schupletsova, I. N. Shchennikova // Trudi po prikladnoi botanike, genetike i selekcii [Transactions on Applied Botany, Genetics, and Breeding]. – 2019. – Vol.180, № 1. – P. 82–88.
3. Volkova, L. V. Rezultati sravnitel'nogo izucheniya kommercheskih sortov yarovoi myagkoi pshenici v usloviyah Kirovskoi oblasti [Results of a comparative study of commercial varieties of spring soft wheat in the Kirov region] / L. V. Volkova // Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka [Agricultural Science of the Euro-North-East]. – 2025. – Vol. 26, № 3. – P. 536–545.
4. Freezing of dehydrated calli of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in liquid nitrogen and their morphogenetic potential / A. I. Solovyeva, O. N. Vysotskaya, A. S. Popov [et al.] // Biology Bulletin. – 2010. – Vol. 37, № 5. – P. 489–495.

5. A simple and efficient protocol for cryopreservation of *Taxodium* hybrid 'zhongshanshan' embryogenic callus / T. Chen, X. Jia, C. Yu [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2024. – Vol.156, № 44.
6. Tissue culture-induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications / D. Zhang, Z. Wang, N. Wang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – P. e96879.
7. Benson, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory & practice / E. E. Benson // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 141–219.
8. Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method / S. A. Bekheet, V. Sota, H. M. El-Shabrawi [et al.] // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 18. – № 1.
9. Hao, Y.-J. Effects of cryopreservation on developmental competency, cytological and molecular stability of citrus callus / Y.-J. Hao, C.-X. You, X.-X. Deng // *Cryo-Letters*. – 2002. – Vol. 23, № 1. – P. 27–35.
10. Elliott, G. D. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures / G. D. Elliott, S. Wang, B. J. Fuller // *Cryobiology*. – Vol. 76. – P. 74–91.
11. Murashige, T. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture / T.A. Murashige, F. Scoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
12. Defense-related callose deposition in plants against pathogens: A review / S. R. Roohall, F. Fariba, G. V. Mozghan [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2025. – Vol. 320, № 4. – P. 146005.
13. Uemura, M. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen / M. Uemura, A. Sakai // *Plant and Cell Physiology*. – 1980. – Vol. 21. – № 1. – P. 85–94.
14. Sakai, A. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification / A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama // *Plant Cell Reports*. – 1990. – Vol. 9, № 3. – P. 30–33.
15. Panis, B. Cryopreservation of plant germplasm / B. Panis, R. Swennen, F. Engelmann // *Acta Horticulturae*. – 2001. – Vol. 560. – P. 79–86.
16. Direct observation of common cryoprotectant permeation into rice callus by CARS microscopy / F. M. D. Samuels, K. C. Pearce, S. Soderlund [et al.] // *Cell Reports Physical Science*. – 2023. – Vol. 4. – № 7. – P. 101469.
17. Apple pectin as a new component for cryopreservation of nucleated cells / M. I. Sergushkina, O. O. Zaitseva, A. N. Khudyakov [et al.] // *Biopreservation and Biobanking*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 84–89.

#### Благодарность (госзадание)

Исследования проводились в рамках научных тем Института физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН – FUUU-2022-0065 (№ 1021051201894-0) и ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого – FNWE-2025-0008.

#### Acknowledgements (state task)

The research was conducted within the framework of the scientific topics of the Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – FUUU-2022-0065 (№ 1021051201894-0) and the Rudnitsky Federal Agricultural Science Centre of the North-East – FNWE-2025-0008.

#### Информация об авторах:

**Сергушкина Марта Игоревна** – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID: 57196452710; ORCID 0000-0002-3113-527X, SPIN-код: 2019-0391 (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: mara.kovalkova@mail.ru, автор для переписки).

**Шуплецова Ольга Наумовна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого; Scopus Author ID: 54385823700; ORCID 0000-0003-4679-0717, SPIN-код: 8443-0705 (610007, Российская Федерация, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а, e-mail: olga.shuplecova@mail.ru).

**Полежаева Татьяна Витальевна** – доктор биологических наук, заведующая лабораторией Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID: 35590512500; ORCID 0000-0003-4999-3077, SPIN-код: 5834-4600 (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: tatvita@yandex.ru).

**Зайцева Оксана Олеговна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID: 231120092100; ORCID 0000-0001-9427-0420, SPIN-код: 7054-9040 (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: ddics@yandex.ru).

**Худяков Андрей Николаевич** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID: 23110765900; ORCID 0000-0003-3757-8263, SPIN-код: 4477-2779 (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: defender36@yandex.ru).

**Соломина Ольга Нурзадиновна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук; Scopus Author ID: 55287278200; ORCID 0000-0001-5187-8698, SPIN-код: 9388-2446 (167982, Российская Федерация, Республика Коми, г. Сыктывкар, ГСП-2, ул. Первомайская, д. 50; e-mail: gameta@mail.ru).

#### **About the authors:**

**Marta I. Sergushkina** – Candidate of Sciences (Biology), Junior Researcher at the Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID: 57196452710; ORCID 0000-0002-3113-527X, SPIN-code: 2019-0391 (50 Pervomayskaya str., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation; e-mail: mara.kovalkova@mail.ru, corresponding author).

**Olga N. Shupletsova** – Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher at the Federal Agricultural Science Centre of the North-East named after N. V. Rudnitsky; Scopus Author ID: 54385823700; ORCID 0000-0003-4679-0717, SPIN-code: 8443-0705 (166a Lenin str., Kirov, 610007, Russian Federation; e-mail: olga.shuplecova@mail.ru).

**Tatyana V. Polezhaeva** – Doctor of Sciences (Biology), Head of the Laboratory at the Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID: 35590512500; ORCID 0000-0003-4999-3077, SPIN-code: 5834-4600 (50 Pervomayskaya str., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation; e-mail: tatvita@yandex.ru).

**Oksana O. Zaitseva** – Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher, Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID: 231120092100; ORCID 0000-0001-9427-0420, SPIN-code: 7054-9040 (50 Pervomayskaya str., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation; e-mail: ddics@yandex.ru).

**Andrey N. Khudyakov** – Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher at the Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID: 23110765900; ORCID 0000-0003-3757-8263, SPIN-code: 4477-2779 (50 Pervomayskaya str., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation; e-mail: defender36@yandex.ru).

**Olga N. Solomina** – Candidate of Sciences (Biology), Researcher at the Institute of Physiology, Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; Scopus Author ID: 55287278200; ORCID 0000-0001-5187-8698, SPIN-code: 9388-2446 (50 Pervomayskaya str., Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russian Federation; e-mail: gameta@mail.ru).

#### **Для цитирования:**

Криоконсервация каллусных клеток зерновых культур в электроморозильной камере / М. И. Сергушкина, О. Н. Шуплецова, Т. В. Полежаева [и др.] // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Сельскохозяйственные науки». – 2026. – № 1 (86). – С. 79–86.

#### **For citation:**

Kriokonservaciya kallusnyh kletok zernovyh kul'tur v elektromorozilnoj kamere [Cryopreservation of callus cells of grain crops in electric freezer] / M. I. Sergushkina, O. N. Shupletsova, T. V. Polezhaeva [et al.] // Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Series "Agricultural Sciences". – 2026. – № 1 (86). – P. 79–86.

Дата поступления рукописи: 21.01.2026

Прошла рецензирование: 26.01.2026

Принято решение о публикации: 16.02.2026

Received: 21.01.2026

Reviewed: 26.01.2026

Accepted: 16.02.2026