



УДК 57.085.23

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.3>

## Сравнение процесса дыхания у донорных растений озимой пшеницы сорта Иркутская и каллусов, полученных из данного сорта в культуре изолированных пыльников

И. В. Любушкина<sup>1,2</sup>, А. В. Поморцев<sup>1</sup>, М. С. Полякова<sup>1</sup>  
Г. А. Арбузова<sup>1,2</sup>, И. В. Уколова<sup>1</sup>, В. К. Войников<sup>1</sup>, Б. Б. Анапияев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>3</sup>Казахский национальный исследовательский технический университет  
им. К. И. Сатпаева, г. Алма-Ата, Казахстан  
E-mail: [ostrov1873@yandex.ru](mailto:ostrov1873@yandex.ru)

**Аннотация.** Изучены особенности дыхания цветков донорных растений озимой пшеницы, используемых для выделения пыльников, и каллусов, полученных в культуре изолированных пыльников. Исследовано влияние фазы развития озимой пшеницы и низкотемпературной предобработки донорных колосьев на активность дыхания и вклады основного цитохромного и альтернативного цианид-резистентного путей транспорта электронов. Выявлены особенности дыхания донорных растений и морфогенных и неморфогенных каллусов озимой пшеницы.

**Ключевые слова:** озимая пшеница, культура изолированных пыльников, индуцированный андрогенез, морфогенные и неморфогенные каллусы, дыхание, альтернативный цианид-резистентный и цитохромный пути дыхания.

**Для цитирования:** Сравнение процесса дыхания у донорных растений озимой пшеницы сорта Иркутская и каллусов, полученных из данного сорта в культуре изолированных пыльников / И. В. Любушкина, А. В. Поморцев, М. С. Полякова, Г. А. Арбузова, И. В. Уколова, В. К. Войников, Б. Б. Анапияев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 37. С. 3–15. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.3>

### Введение

Пшеница *Triticum aestivum* – одна из главных сельскохозяйственных культур в мире, при этом около 75 % возделываемой пшеницы составляют озимые сорта [Shifting the limits ... , 2018]. Постоянно растущие потребности человечества в продовольствии, а также меняющиеся климатические условия требуют от современной селекции новых, более продуктивных сортов с высокой степенью устойчивости к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Экспериментальная гаплоидия как одно из направлений биотехнологии растений позволяет значительно сократить сроки получения чистых линий и новых сортов [Niroula, Vimb, 2009; Lantos, Jancso, Pauk, 2005]. Однако применение самых распространённых биотехнологических

методов – культуры изолированных пыльников и микроспор – в отношении озимых сортов пшеницы затруднено. Высокий процент образующихся ризогенных каллусов и альбиносных растений-регенерантов значительно снижает эффективность андрогенеза *in vitro* [Comparison of the ... , 2020]. Ключевым фактором, определяющим успех данного метода, является генотип растений-доноров [Islam, Tuteja, 2012]. Так, установлено, что регенерация зелёных растений в культуре микроспор *T. aestivum* определяется 13 локусами количественных признаков QTLs, расположенными на хромосомах 2A, 2D, 5A, 5B и 5D [Chromosomal regions ... , 2015]. Однако следует отметить, что физиологическое состояние растений-доноров также очень важно для эффективности индуцированного андрогенеза [Olmedilla, 2010]. Показано, что частота образования эмбриоидов и зелёных растений-регенерантов повышается при стрессовой предобработке колосьев пшеницы перед процедурой извлечения пыльников. Для этого используют низкие и высокие температуры, излучение, различные химические соединения [An improved in vitro ... , 2001; Culture of freshly ... , 2001; Stress induced microspore ... , 1996]. Результатом таких воздействий является инициация деления микроспор и перепрограммирование с гаметофитного пути развития на спорофитный. При этом в цитоплазме стрессированных клеток происходит уменьшение количества и размеров гранул крахмала и липидных тел [Androgenic switch ... , 2005]. Соответственно, можно предположить, что при перепрограммировании микроспор и в условиях андрогенеза *in vitro* роль процесса дыхания, обеспечивающего клетки необходимой энергией для развития, должна быть весьма значимой.

Электронтранспортная цепь растительных митохондрий наряду с основными участниками – НАДН-дегидрогеназой (комплексом I), сукцинат-дегидрогеназой (комплексом II), цитохром-*c*-редуктазой (комплексом III) и цитохром-*c*-оксидазой (комплексом IV), – содержит дополнительные компоненты, позволяющие быстро и эффективно адаптировать энергетические потребности растительной клетки к изменяющимся условиям среды. Так, кроме цитохром-*c*-оксидазы, растительные митохондрии содержат ещё одну терминальную оксидазу – альтернативную [Vanlerberghe, 2013]. Альтернативный путь (АП) дыхания ответвляется от основного на уровне убихинона. Он не создаёт электрохимического градиента на внутренней мембране митохондрий, и энергия, полученная при окислении субстратов, рассеивается в виде тепла [Vanlerberghe, 2013]. Изменение соотношения вкладов основного цитохромного пути (ЦП) и АП дыхания позволяет растениям контролировать энергообеспечение клеток в нормальных и в стрессовых условиях.

Целью настоящей работы стало изучение дыхательной активности и соотношения цитохромного и альтернативного путей дыхания цветков-доноров озимой пшеницы сорта Иркутская и формирующихся в культуре изолированных пыльников морфогенных и неморфогенных каллусов.

### ***Материалы и методы***

В работе использовалась озимая мягкая пшеница сорта Иркутская. Растения выращивались в лабораторных условиях станции искусственного климата (фитотрона) СИФИБР СО РАН и в полевых условиях Заларинского агроэкологического стационара (дер. Тунгуй). В лабораторных условиях донорные растения культивировали при температуре 22–26 °С с 16-часовым фотопериодом. Полив осуществляли еженедельно. Заларинский стационар расположен в лесостепной части Среднего Приангарья в бассейне р. Заларинки. Среднемесячные температуры в 2020–2021 гг. в период активной вегетации колебались от 9 до 19 °С. Количество среднемесячных осадков в этот же период составило от 50 до 130 мм. Колосья срезали на стадии трубкования, после чего помещали в воду в темноту и подвергали низкотемпературному воздействию при 4 °С в течение 7 сут.

Процедуру изоляции пыльников в стерильных условиях и поддержание культуры осуществляли по ранее описанному методу [Влияние инициальных сред ... , 2020]. В качестве инициальной среды использовали среду № [Анапияев, 2001], содержащую сахарозу (90 г/л) и регуляторы роста нафтилуксусную кислоту (НУК, 1 мг/л) и 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д; 1 мг/л). Образовавшиеся андроклинные структуры через 4 недели переносили на среду для регенерации 190-2Cu [Pauk, Mihály, Puolimatka, 2003] с регуляторами роста НУК (0,5 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л) и помещали в темноту при 4 °С на 5 сут. В дальнейшем сосуды с каллусами и эмбриоподобными структурами переносили под непрерывное освещение при 22–24 °С на 8–10 недель.

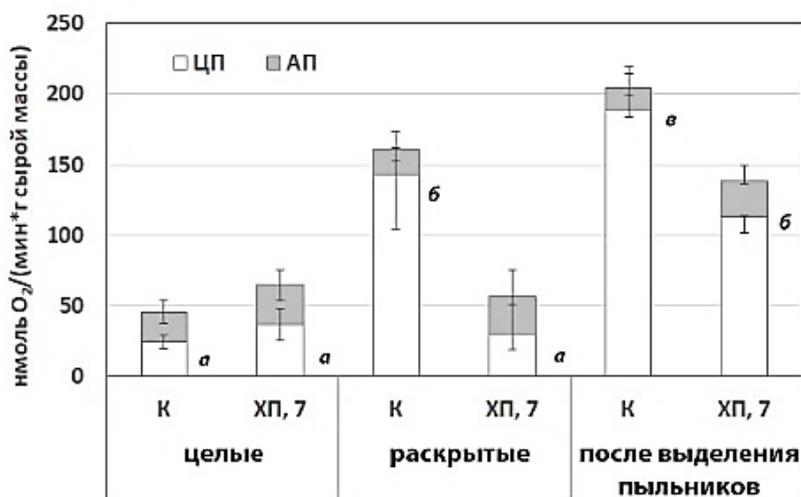
Скорость поглощения кислорода измеряли при 26 °С с использованием системы для измерения респирации Oxyterm (Hansatech Instruments, Великобритания). Концентрация кислорода в насыщенной воздухом среде инкубации при 26 °С составляла 253 мкМ. Навеску исследуемой ткани около 50 мг инфильтровали в шприце раствором среды для инкубации. Инкубационная среда содержала  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 мМ) и сахарозу (50 мМ), pH 7,2. Для определения вклада основного цитохромного и альтернативного цианид-резистентного путей в дыхание применяли ингибиторный анализ. В ячейку с исследуемым образцом вносили последовательно цианид калия (KCN, 1,2 мМ, ингибитор цитохром-с-оксидазы) и бензгидроксамовую кислоту (БГК, 3 мМ, ингибитор альтернативной оксидазы). Поглощение кислорода, регистрируемое после добавления ингибиторов, считали неспецифическим и не включали в расчёт дыхательной активности. Скорость дыхания рассчитывалась как  $\text{нмоль O}_2/(\text{мин} \cdot \text{г сырой массы})$ .

Статистическая обработка данных производилась с использованием программ Excel из пакета MS Office 2016 и SigmaPlot v.14.0.

### ***Результаты и обсуждение***

Дыхание – процесс, чувствительный к различным изменениям физиологического состояния растительного организма [Stress signalling dynamics ... , 2020]. Мы сравнили интенсивность дыхания цветков озимой пшеницы, вы-

деленных из донорных растений, которые находились на разных микрофазах фазы трубкования. Было проведено сравнение дыхания цветков озимой пшеницы до раскрытия флагового листа и сразу после его раскрытия. Установлено, что интенсивность дыхания у цветков, выделенных из колосьев уже после раскрытия влагалища флагового листа, была выше примерно в 6 раз, чем у цветков до раскрытия – она составила около 150 нмоль  $O_2$ /(мин·г сырой массы) (рис. 1). Вклад ЦП в дыхание после раскрытия флагового листа увеличивался до 90 %. При этом, если раскрытие влагалища происходило в период холодной предобработки колосьев, то интенсивность дыхания цветков не изменялась и оставалась в пределах 50 нмоль  $O_2$ /(мин·г сырой массы). Не изменялся и вклад ЦП (см. рис. 1).



*Рис. 1.* Изменение интенсивности дыхания в зависимости от физиологического состояния цветков озимой пшеницы сорта Иркутская. К – образцы, выделенные из контрольных колосьев сразу после срезки; ХП, 7 – образцы, выделенные из колосьев, подвергнутых холодной предобработке при 4 °С в течение 7 сут.; целые – дыхание цветков, выделенных из колосьев, находящихся в фазе трубкования до раскрытия влагалища флагового листа; раскрытые – дыхание цветков, выделенных из колосьев, находящихся в фазе трубкования в микрофазу раскрытия влагалища флагового листа; после выделения пыльников – дыхание цветков после выделения из них пыльников, ЦП – вклад основного цитохромного пути в дыхание; АП – вклад альтернативного цианид-резистентного пути в дыхание. Тест на нормальность проводился по методу Шапиро – Уилка. Использовался односторонний дисперсионный анализ рангов Краскела – Уоллиса. Попарное множественное сравнение проводилось с использованием метода Данна. Представлена медиана ( $Q_2$ ), планки погрешностей ограничивают  $Q_1$  и  $Q_3$  процентиля.  $n = 3-4$ ;  $p < 0,05$ . Значимые различия между вкладом цитохромного пути имеются лишь между вариантами, обозначенными на диаграмме разными буквами. Значимых различий между вкладом альтернативного пути в разных вариантах не обнаружено

Мы также сравнили дыхание цветков озимой пшеницы после выделения из них пыльников, при этом процедура выделения пыльников проводилась как из колосьев сразу после срезки, так и через 7 дней холодной предобработки донорных растений. Травмирование цветков во время процедуры выделения приводило к значимому усилению интенсивности дыхания за счёт увеличения вклада основного пути, однако данное усиление было менее выраженным у растений, подвергнутых холодной предобработке (см. рис. 1). Таким образом, можно заключить, что как раскрытие флагового листа, так и повреждение цветков вызывало резкое увеличение интенсивности дыхания, главным образом, за счёт интенсивности ЦП. В то же время длительное воздействие низкой положительной температуры не оказывало значимого влияния на дыхательную активность и вклады ЦП и АП у неповреждённых цветков ни на одной из изученных микрофаз развития колоса.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что изменения физиологического состояния растений, происходящие в период стрессовой предобработки колосьев озимой пшеницы, могут иметь определяющее значение для образования андроклинных структур в культуре изолированных пыльников. Особого внимания заслуживает тот факт, что скорость дыхания, обусловленная активностью АО у цветков-доноров пыльников, во время стрессового воздействия практически не изменялась. В то же время данные, имеющиеся в литературе, свидетельствуют о том, что действие низких положительных температур обычно приводит к увеличению активности, содержания белка и уровня транскриптов АО в растениях [Митохондриальные энергорассеивающие системы ... , 2014]. Отсутствие активации АО в наших экспериментах могло быть обусловлено тем, что колосья пшеницы подвергались воздействию температуры в течение длительного времени в темноте. На сегодняшний день установлено, что свет регулирует экспрессию многих генов, связанных не только с фотосинтезом, но и с дыханием, в том числе и АО [Effects of light ... , 2010; Xu, Yuan, Lin, 2011]. Кроме того, низкотемпературная предобработка колосьев пшеницы перед выделением пыльников для культуры играет роль не закалывающего, а стрессирующего фактора, способствующего перепрограммированию микроспор в пыльниках [Androgenic switch ... , 2005]. Показано, что не только низкие положительные температуры приводят к дедифференциации микроспор и блокированию развития гаметофита. Такое же воздействие способны оказать высокие температуры, голодание, осмотический стресс и другие стрессовые факторы [Androgenesis in *Hordeum* ... , 1997; The switch of ... , 2001]. Ремоделирование цитоплазмы, происходящее при такой предобработке, может быть результатом активации либо убиквитин-26S-протеасомной системы, либо автофагии [Androgenic switch ... , 2005]. Отметим, что в обоих случаях активация ремоделирования задействует схожие сигнальные пути при участии активных форм кислорода (АФК) и гормонов [Ethylene synthesis ... , 2004; Genes involved in ... , 1994]. Таким образом, АФК, формирующиеся в электронтранспортной цепи митохондрий в процессе дыхания, выступают в роли важных вторичных мессенджеров, и активация механизмов, снижающих

их образование, в том числе и АО, в данном случае нецелесообразна. Кроме того, отметим, что вклад АО в дыхание цветов озимой пшеницы в наших экспериментах в контрольных условиях составлял около 40 % (см. рис. 1), что является весьма высоким показателем [Митохондриальные энерго рассеивающие системы ... , 2014]. Именно ЦП дыхания поставляет энергию для нужд клетки, в том числе и для процессов морфогенеза, поэтому отсутствие повышения вклада АП в условиях низкотемпературной предобработки донорных колосьев озимой пшеницы может свидетельствовать о поддержании энергетической эффективности дыхания в стрессовых условиях [Vanlerberghe, 2013].

На сегодняшний день существует весьма ограниченный круг работ, посвящённых изучению дыхания растительных клеток в культурах *in vitro* [Horn, Merz, 1982; Kapulnik, Yalpan, Raskin, 1992; Robson, Vanlerberghe, 2002; The role of ... , 2005]. Результаты наших экспериментов выявили значительные различия в дыхании морфогенных и неморфогенных каллусов, полученных при культивировании изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская. Было установлено, что максимальная скорость дыхания была характерна для ризогенных каллусов и составила около 100 нмоль  $O_2$ /(мин·г сырой массы), при этом вклад АП в дыхание был не более 10 % (рис. 2). Интересно отметить, что такая интенсивность дыхания обеспечивалась, главным образом, за счёт высокой дыхательной активности корней, образовавшихся в данных каллусах.

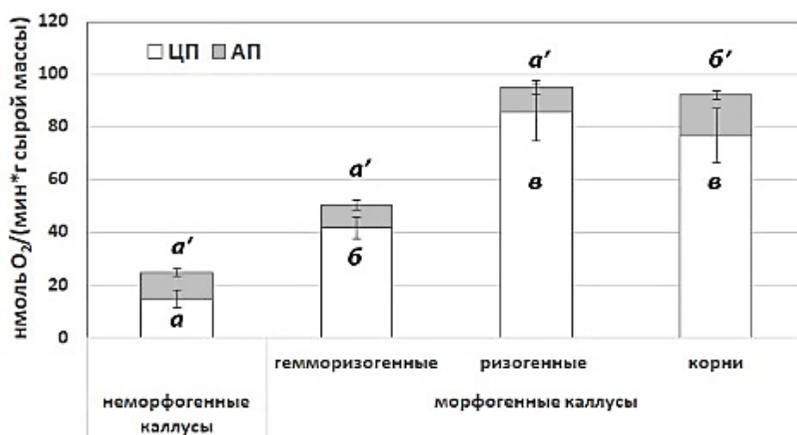


Рис. 2. Интенсивность дыхания и вклады основного цитохромного и альтернативного цианид-резистентного путей у морфогенных и неморфогенных каллусов озимой пшеницы. ЦП – вклад основного цитохромного пути дыхания; АП – вклад альтернативного цианид-резистентного пути в дыхание.  $M \pm S.D.$   $n = 3-4$ ;  $p < 0,05$ . Тест на нормальность проводился по методу Шапиро – Уилкса. Использовался односторонний дисперсионный анализ рангов Краскела – Уоллиса. Парное множественное сравнение проводилось с использованием метода Холма – Сидака. Значимые различия  $M$  при  $p < 0,05$  имеются лишь между вариантами с разными буквенными обозначениями. Буквенные обозначения без апострофа обозначают различия для ЦП, с апострофом – различия для АП

Некоторые авторы отмечают высокую активность АО у гетеротрофных суспензионных культур растительных клеток [Horn, Merz, 1982]. Возможно, это характерно именно для дедифференцированных клеток культуры, поскольку мы получили аналогичные результаты лишь для дыхания неморфогенных каллусов. Им была свойственна минимальная скорость дыхания, однако при этом вклад АП достигал 40 % (см. рис. 2). В пользу этого предположения свидетельствуют имеющиеся в литературе данные о том, что высокий вклад АП в дыхание присутствует в меристематически активных частях листьев у интактных растений яровой пшеницы [Гармаш, 2019]. Отметим, что интенсивность дыхания и вклад АП у гемморизогенных каллусов занимали промежуточные значения между соответствующими показателями неморфогенных каллусов и ризогенных каллусов – около 50 нмоль  $O_2$ /(мин·г сырой массы) и 20 % соответственно (см. рис. 2). Именно интенсивность дыхания гемморизогенных каллусов соответствовала интенсивности дыхания цветков донорных растений озимой пшеницы, из которых выделяли пыльники (см. рис. 1, 2). Такие результаты вполне обоснованы, поскольку процессы морфогенеза связаны с активным формированием клеточных структур и дифференциацией клеток и тканей, что требует большого количества энергии [Гармаш, 2019].

Проведённые эксперименты позволили нам определить возрастные особенности процесса дыхания и соотношения дыхательных путей у цветков озимой пшеницы, извлечённых из донорных растений, находящихся на разных микрофазах фазы трубкования. Выявлены различия в дыхательной активности морфогенных и неморфогенных каллусов, полученных в результате культивирования изолированных пыльников.

### **Выводы**

1. Раскрытие флагового листа, равно как процедура извлечения пыльников из цветков озимой пшеницы, приводило к резкому повышению интенсивности дыхания, главным образом, за счёт активности цитохромного пути.

2. Длительное воздействие низкой положительной температуры не вызвало изменений скорости дыхания и активности альтернативной цианид-резистентной оксидазы у цветков-доноров пыльников озимой пшеницы, что может свидетельствовать о поддержании эффективности энергетического обмена в клетках в стрессовых условиях.

3. Максимальные значения дыхательной активности были зарегистрированы для ризогенных каллусов. Дыхательная активность гемморизогенных каллусов по скорости и вкладам цитохромного и альтернативного путей была аналогична дыханию цветков-доноров пыльников, что указывает на схожие энергетические потребности растительных клеток в этих системах.

*Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН.*

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-34-80003 мол\_эв\_а.*

## Список литературы

Анапиев Б. Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы. Алматы, 2001. 220 с.

Влияние инициальных сред и длительности холодовой предобработки на эффективность андрогенеза в культуре изолированных пыльников озимой пшеницы сорта Иркутская / И. В. Любушкина, А. В. Поморцев, М. С. Полякова, Г. А. Арбузова, В. К. Войников, Б. Б. Анапиев // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2020. Т. 34. С. 20–32. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.34.20>

Гармаш Е. В. Дыхание и вовлечение альтернативного пути в связи с возрастом и фенологической стратегией листа // Физиология растений. 2019. Т. 66, № 3. С. 218–229. <https://doi.org/10.1134/S0015330319030047>

Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных, О. А. Боровик, Е. Л. Таусон, Т. П. Побежимова, А. И. Катышев, Н. С. Павловская, Н. А. Королева, И. В. Любушкина, В. Ю. Башмаков, В. Н. Попов, Г. Б. Боровский, В. К. Войников // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 645–660. <https://doi.org/10.1134/S0006297914060030>

Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective / S. F. Maraschin, W. de Priester, H. P. Spaink, M. Wang // J. Exp. Botany. 2005. Vol. 56, N 417. P. 1711–172. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>

Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment / S. Hoekstra, S. van Bergen, I. R. van Brouwershaven, R. A. Schilperoort, M. Wang // Plant Sci. 1997. Vol. 126. P. 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00096-4)

An improved *in vitro* technique for isolated microspore culture of barley / K. J. Kasha, E. Simion, R. Oro, Q. A. Yao, T. C. Hu, A. R. Carlson // Euphytica. 2001. Vol. 120. P. 379–385. <https://doi.org/10.1023/A:1017564100823>

Chromosomal regions associated with the *in vitro* culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores / N. H. Nielsen, S. U. Andersen, J. Stougaard, A. Jensen, G. Backes, A. Jahoor // Plant Breed. 2015. Vol. 134. P. 255–263. <https://doi.org/10.1111/pbr.12257>

Comparison of the androgenic response of spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) / D. Weigt, A. Kiel, I. Siatkowski, J. Zypych-Walczak, A. Tomkowiak, M. Kwiatek // Plants. 2020. Vol. 9, N 1. P. 49. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>

Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores with inducer chemicals / M. Y. Zheng, W. Liu, Y. Weng, E. Polle, C. F. Konzak // Plant Cell Rep. 2001. Vol. 20. P. 685–690. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0393-0>

Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings / D. W. Zhang, F. Xu, Z. W. Zhang, Y. E. Chen, J. B. Du, S. D. Jia, S. Yuan, H.-H. Lin // Plant Cell Environ. 2010. Vol. 33. P. 2121–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02211.x>

Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize / R. Mól, M. Filek, I. Macháčková, E. Matthys-Rochon // Plant Cell Physiol. 2004. Vol. 45. P. 1396–1405. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch167>

Genes involved in the dedifferentiation of plant cells / T. Nagata, S. Ishida, S. Hasezawa, Y. Takahashi // Int. J. Dev. Biol. 1994. Vol. 38. P. 321–327.

Horn M. E., Mertz D. Cyanide-resistant respiration in suspension cultured cells of *Nicotiana glutinosa* L. // Plant Physiol. 1982. Vol. 69. P. 1439–1443. <https://doi.org/10.1104/pp.69.6.1439>

Islam S. M. S., Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pre-treatments in major crop species // Plant Sci. 2012. Vol. 182. P. 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>

Kapulnik Y., Yalpani N., Raskin I. Salicylic acid induce cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures // Plant Physiol. 1992. Vol. 100. P. 1921–1926. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1921>

- Lantos C., Jancsó M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals // *Acta Physiol. Plant.* 2005. Vol. 27. P. 631–639. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0067-6>
- Niroula R. K., Bimb H. P. Overview of wheat X maize system of crosses for dihaploid induction in wheat // *World Appl. Sci. J.* 2009. Vol. 7, N 8. P. 1037–1045.
- Olmedilla A. Microspore embryogenesis // *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives*. Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. Vol. 2. P. 27–44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_2)
- Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht : Springer Science+Business Media B.V., 2003. P. 59–64. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_10)
- Robson C. A., Vanlerberge G. C. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death // *Plant Physiol.* 2002. Vol. 129. P. 1908–1920. <https://doi.org/10.1104/pp.004853>
- Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome / International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) // *Science*. 2018. Vol. 361. eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies / A. Touraev, A. Ilham, O. Vicente, E. Heberle-Bors // *Plant Cell Rep.* 1996. Vol. 15. P. 561–565. <https://doi.org/10.1007/BF00232453>
- Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants / C. Dourmap, S. Roque, A. Morin, D. Caubrière, M. Kerdiles, K. Béguin, R. Perdoux, N. Reynoud, L. Bourdet, P.-A. Audebert, J. Le Moullec, I. Couée // *Ann. Bot.* 2020. Vol. 125, N 5. P. 721–736. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz184>
- The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells / S. M. Sieger, B. K. Kristensen, C. A. Robson, S. Amirsadeghi, E. W. Y. Eng, A. Abdel-Mesih, I. M. Møller, G. C. Vanlerberghe // *J. Exp. Bot.* 2005. Vol. 56, N 416. P. 1499–1515. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri146>
- The switch of the microspore program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants / I. Bárány, P. S. Testillano, J. Mitykó, M. C. Risueno // *Int. J. Dev. Biol.* 2001. Vol. 45. P. 39–40.
- Vanlerberghe G. C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 6805–6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Xu F., Yuan S., Lin H.-H. Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals // *Plant Signal. Behav.* 2011. Vol. 6, N 1. P. 55–58. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14192>

## Comparison of the Respiration Process in Donor Winter Wheat Plants (Irkutskaya Variety) and Calli from this Variety in the Culture of Isolated Anthers

I. V. Lyubushkina<sup>1,2</sup>, A. V. Pomortsev<sup>1</sup>, M. S. Polyakova<sup>1</sup>  
G. A. Arbuzova<sup>1,2</sup>, I. V. Ukolova<sup>1</sup>, V. K. Voinikov<sup>1</sup>, B. B. Anapiyaev<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

<sup>2</sup>Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

<sup>3</sup>Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

**Abstract.** Winter wheat is one of the main agricultural crops in the world. The constantly growing needs for food, as well as changing climatic conditions require modern breeding of new, more productive varieties with a high degree of cold, frost, drought and salt resistance,

and resistance to pathogens and pests. Experimental haploidy can significantly reduce the time required for obtaining pure lines and new varieties. It is known that the physiological state of donor plants is very important for the effectiveness of androgenesis *in vitro*. In this work, we studied the features of flowers respiration in donor winter wheat plants used to isolate anthers and calli obtained in this culture. Winter wheat of Irkutskaya variety was used in the work. The plants were grown at the artificial climate station of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS and in the field conditions of the Zalarinsky agroecological station. The plant material was selected at the booting stage. The initial medium was modified N<sub>6</sub> containing sucrose (90 g/L), glycine (2 mg/L), 2,4-D (1 mg/L), and NAA (1 mg/L). The medium for regeneration was 190-2Cu with the addition of growth regulators 2,4-D (0.5 mg/L) and kinetin (0.5 mg/L). The oxygen uptake rate was measured at 26 ° C using an Oxyterm system (Hansatech Instruments, Great Britain). To determine the contribution of the main cytochrome and alternative cyanide-resistant pathways to respiration, an inhibitory assay was used. It was shown that opening of the flag leaf, as well as the procedure of anther isolation, led to an increase in the respiratory activity of winter wheat flowers, mainly due to the activation of the cytochrome pathway. At the same time, long-term low-temperature exposure contributed to the stabilization of respiration at the control level and did not cause changes in the activity of the alternative cyanide-resistant oxidase. The maximum respiratory activity was recorded in rhizogenic calli, while the respiratory activity of gemmorrhizogenic calli was similar in respiration rate and contribution of the cytochrome and alternative pathways to the respiration of anther donor flowers.

**Keywords:** winter wheat, isolated anther culture, induced androgenesis, morphogenic and non-morphogenic calli, respiration, cytochrome and alternative pathways.

**Acknowledgment.** The research was done using the collections of Core Facilities Center “Bioresource Center” and the equipment of Core Facilities Center “Bioanalitika” at Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Irkutsk, Russia). The reported study was funded by RFBR, project number 20-34-80003.

**For citation:** Lyubushkina I.V., Pomortsev A.V., Polyakova M.S., Arbuzova G.A., Ukolova I.V., Voinikov V.K., Anapiyayev B.B. Comparison of the Respiration Process in Donor Winter Wheat Plants (Irkutskaya Variety) and Calli from this Variety in the Culture of Isolated Anthers. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 37, pp. 3-15. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.3> (in Russian)

## References

Anapiyayev B.B. *Kultura mikrospor i gaploidnaya biotekhnologiya pshenitsy* [The microspores culture and haploid biotechnology of wheat]. Almaty, 2001, 220 p. (in Russian)

Lyubushkina I.V., Pomortsev A.V., Polyakova M.S., Arbuzova G.A., Voinikov V.K., Anapiyayev B.B. Vliyaniye initsialnykh sred i dlitelnosti kholodovoi predobrabotki na effektivnost' androgeneza v kulture izolirovannykh pyl'nikov ozimoi pshenitsy sorta Irkutskaya [Influence of Initial Media and Duration of Cold Pretreatment on the Efficiency of Androgenesis in the Culture of Isolated Anthers of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Variety Irkutskaya]. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2020, vol. 34, pp. 20-32. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.34.20> (in Russian)

Garmash E.V. Dykhanie i vovlechenie alternativnogo puti v svyazi s vozrastom i fenologicheskoi strategiei lista [Respiration and involvement of an alternative pathway as related to age and phenological strategy of the leaf]. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2019, vol. 66, no. 3, pp. 218-229. <https://doi.org/10.1134/S0015330319030047> (in Russian)

Grabelnykh O.I., Borovik O.A., Tauson E.L., Pobezhimova T.P., Katyshev A.I., Pavlovskaya N.S., Koroleva N.A., Lyubushkina I.V., Bashmakov V.Yu., Popov V.N., Borovskii G.B., Voinikov V.K. Mitochondrialnye energorasseivayushchie sistemy (alternativnaya oksidaza, razobshchayushchie belki i “vneshnyaya” NADH-degidrogenaza) vovlecheny v razvitiye morozoustoichivosti prorostkov ozimoi pshenitsy [Mitochondrial energy-dissipating

systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings]. *Biochemistry Moscow*, 2014, vol. 79, pp. 506-519. <https://doi.org/10.1134/S0006297914060030> (in Russian)

Maraschin S.F., de Priester W., Spaik H.P., Wang M. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Botany*, 2005. vol. 56, no. 417, pp. 1711-172. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>

Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven I.R., Schilperoort R.A., Wang M. Androgenesis in *Hordeum vulgare* L.: effects of mannitol, calcium and abscisic acid on anther pretreatment. *Plant Sci.*, 1997, vol. 126, pp. 211-218. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00096-4)

Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. *Euphytica*, 2001, vol. 120, pp. 379-385. <https://doi.org/10.1023/A:1017564100823>.

Nielsen N.H., Andersen S.U., Stougaard J., Jensen A., Backes G., Jahoor A. Chromosomal regions associated with the in vitro culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores. *Plant Breed.*, 2015, vol. 134, pp. 255-263. <https://doi.org/10.1111/pbr.12257>

Weigt D., Kiel A., Siatkowski I., Zyprych-Walczak J., Tomkowiak A., Kwiatek M. Comparison of the androgenic response of spring and winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*, 2020, vol. 9, is. 1, pp. 49. <https://doi.org/10.3390/plants9010049>

Zheng M.Y., Liu W., Weng Y., Polle E., Konzak C.F. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores with inducer chemicals. *Plant Cell Reports*, 2001, vol. 20, pp. 685-690. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0393-0>

Zhang D.W., Xu F., Zhang Z.W., Chen Y.E., Du J.B., Jia S.D., Yuan S., Lin H.-H. Effects of light on cyanide-resistant respiration and alternative oxidase function in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Environ.*, 2010, vol. 33, pp. 2121-2131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02211.x>

Mòl R., Filek M., Macháčková I., Matthys-Rochon E. Ethylene synthesis and auxin augmentation in pistil tissues are important for egg cell differentiation after pollination in maize. *Plant Cell Physiol.*, 2004, vol. 45, pp. 1396-1405. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch167>

Nagata T., Ishida S., Hasezawa S., Takahashi Y. Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 1994, vol. 38, pp. 321-327.

Horn M.E., Mertz D. Cyanide-resistant respiration in suspension cultured cells of *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Physiol.*, 1982, vol. 69, pp. 1439-1443. <https://doi.org/10.1104/pp.69.6.1439>

Islam S.M.S., Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci.*, 2012, vol. 182, pp. 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>

Kapulnik Y., Yalpani N., Raskin I. Salicylic acid induce cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiol.*, 1992, vol. 100, pp. 1921-1926. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1921>

Lantos C., Jancsó M., Pauk J. Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol. Plant.* 2005, vol. 27, pp. 631-639. <https://doi.org/10.1007/s11738-005-0067-6>

Niroula R.K., Bimb H.P. Overview of wheat X maize system of crosses for dihaploid induction in wheat. *World Appl. Sci. J.*, 2009, vol. 7, no. 8, pp. 1037-1045.

Olmedilla A. Microspore embryogenesis. *Plant Development Biology – Biotechnological Perspectives*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2010, vol. 2, pp. 27-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-04670-4_2)

Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Dordrecht, Springer Science+Business Media B.V., 2003, pp. 59-64. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_10)

Robson C.A., Vanlerberge G.C. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of

programmed cell death. *Plant Physiol.*, 2002, vol. 129, pp. 1908-1920. <https://doi.org/10.1104/pp.004853>

International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 2018, vol. 361, eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>

Touraev A., Ilham A., Vicente O., Heberle-Bors E. Stress induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.*, 1996, vol. 15, pp. 561-565. <https://doi.org/10.1007/BF00232453>

Dourmap C., Roque S., Morin A., Caubrière D., Kerdiles M., Béguin K., Perdoux R., Reynoud N., Bourdet L., Audebert P.-A., Le Moullec J., Couée I. Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants. *Ann. Bot.*, 2020, vol. 125, no. 5, pp. 721-736. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz184>

Sieger S.M., Kristensen B.K., Robson C.A., Amirsadeghi S., Eng E.W.Y., Abdel-Mesih A., Möller I.M., Vanlerberghe G.C. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J. Exp. Bot.*, 2005, vol. 56, no. 416, pp. 1499-1515. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri146>

Bárány I., Testillano P.S., Mitykó J., Risueno M.C. The switch of the microspore program in Capsicum involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int. J. Dev. Biol.*, 2001, vol. 45, pp. 39-40.

Vanlerberghe G.C. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 6805-6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>

Xu F., Yuan S., Lin H.-H. Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals. *Plant Signal. Behav.*, 2011, vol. 6, no. 1, pp. 55-58. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14192>

Любушкина Ирина Викторовна  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Lyubushkina Irina Viktorovna  
Candidate of Sciences (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Assistant Professor  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: ostrov1873@yandex.ru

Поморцев Анатолий Владимирович  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: pomorcevanatolii@mail.ru

Pomortsev Anatolii Vladimirovich  
Candidate of Science (Biology),  
Research Scientist  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: pomorcevanatolii@mail.ru

Полякова Марина Станиславовна  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,

Polyakova Marina Stanislavovna  
Lead Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,

ул. Лермонтова, 132  
e-mail: poljakova.m@gmail.com

Russian Federation  
e-mail: poljakova.m@gmail.com

Арбузова Галина Андреевна  
ведущий инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
магистрант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: mingronland@mail.ru

Arbuzova Galina Andreevna  
Lead Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
Undergraduate  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: mingronland@mail.ru

Уколова Ирина Владимировна  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: irina@sifibr.irk.ru

Ukolova Irina Vladimirovna  
Candidate of Science (Biology),  
Senior Researcher  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: irina@sifibr.irk.ru

Войников Виктор Кириллович  
доктор биологических наук, профессор  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск,  
ул. Лермонтова, 132  
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru

Voinikov Victor Kirillovich  
Doctor of Sciences (Biology), Professor  
Scientific Director  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: vvk@sifibr.irk.ru

Анапияев Бахытжан Бейсенбекович  
доктор биологических наук  
Казахский национальный  
исследовательский технический  
университет им. К. И. Сатпаева  
050013, Казахстан, г. Алматы,  
ул. Сатпаева, 22а  
e-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru

Anapiyayev Bahytzhan Beisenbekovich  
Doctor of Sciences (Biology)  
Satbayev University  
22a, Satpaev st., Almaty, 050013, Kazakhstan  
e-mail: bak\_anapiyayev@mail.ru