

УДК 581.143.6:58.085

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ІЗ ЕКСПЛАНТІВ ВЕРХІВКИ ПАГОНА ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНА, І.І. ЛЯЛЬКО

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17

Досліджено процеси калюсогенезу та регенерації рослин у культурі тканин верхівки пагона проростків різних генотипів м'якої пшениці озимого та ярого типу. У вивчених форм виявлено генотипну залежність процесів утворення пагонів у культурі *in vitro*. Проаналізовано вплив стадії розвитку донорного матеріалу на регенераційний потенціал культури. У калюсів, які культивувалися на середовищі з піклорамом, виявлено тенденцію до підвищення частоти регенерації пагонів.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., верхівка пагона проростків, піклорам, калюсогенез, регенерація рослин.

ВСТУП. На сьогодні біотехнологічні методи широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських культур і, зокрема, пшениці [1–3]. Одержання морфогенного калюсу і подальша регенерація рослин — невід'ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Відомо, що процеси калюсогенезу та утворення пагонів у культурі *in vitro* пшениці значною мірою визначаються типом експланта [4, 5], проте досі не вирішена проблема його надійності, доступності в будь-який момент часу та здатності до утворення калюсу з високим регенераційним потенціалом, який зберігає морфогенну активність достатньо тривалий час.

Традиційним типом експланта для злакових і, зокрема, пшениці, є незрілі зародки [4, 6], проте їхнє використання має ряд обмежень, оскільки вони доступні тільки короткий час протягом вегетаційного періоду. Ця обставина змусила дослідників шукати альтернативні типи експлантів: зрілі зародки або їхні частини [6, 7], незрілі суцвіття [5, 8, 9], сегменти колеоптиля, мезокотилля та молодих листків [5, 10–13], апікальні меристеми пагонів [14–15]. Останнім часом значно зріс інтерес до листових сегментів та верхівок пагонів як найбільш перспективних експлантів для злакових культур [16–19]. Обнадійливі результати отримано для сорго [19, 20], пшениці [10–13], вівса [15, 21], жита [22],

кукурудзи [18], тритікале [23] та рису [24].

На морфогенетичний потенціал експланта впливає багато чинників, у тому числі: генотип, стадія розвитку донорного органу, кількісний та якісний склад гормонального компоненту живильного середовища, умови культивування. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження особливостей процесів калюсогенезу та регенерації рослин у культурі тканин верхівок пагонів проростків цінних генотипів озимої та ярої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були 5 генотипів озимої м'якої пшениці: сорти — Солоха, Колумбія, Переяславка, Смуглянка, Веснянка, а також 2 сорти ярої пшениці — Зимоярка та Хуторянка, отримані у відділі експериментального мутагенезу ІФРГ НАН України. Як експланти використовували сегмент пагона 1–3 добових проростків, що включає апікальну меристему, листові примордії та базальні частини листків (рис. 1). Експланти попередньо позбавляли колеоптіля та поміщали



Рисунок 1. Зріз пагона на другий день проростання (колеоптіль видалено). Стрілкою показано сегмент пагона, що використовували як експлант

на середовище так, щоб базальна частина мала максимальну площу контакту із середовищем. Розмір експлантів варював у межах 1,2–2,0 мм. Для кожного генотипу було взято по 160 експлантів, представлених 4-ма чашками Петрі (по 40 експлантів у кожній).

Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3%-вим розчином NaOCl протягом 15 хв, чотири рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі при 24 °C на безгормональному середовищі МС [25] 1–3 доби, залежно від варіанту досліду. Культуру калюсної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін — 150 мг/л, AgNO₃ — 10 мг/л та піклорам (4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота) — 2 мг/л або 2 мг/л 2,4-Д. Експланти культивували при 26 °C у темряві протягом двох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді, ще протягом двох тижнів. Сформовані таким чином калюси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ІОК та 10 мг/л AgNO₃. Отримані пагони по мірі розвитку переносили на безгормональне середовище МС з половинним вмістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували в стерильний пісок і поміщали у вологу камеру на 7–14 дб. Добре укорінені рослини переносили у ґрунт.

Частоту індукції калюсу та регенерації рослин (у відсотках) визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили калюс або рослини-регенеранти, до загального числа експлантів.

Отримані результати аналізували за допомогою двофакторного дисперсій-

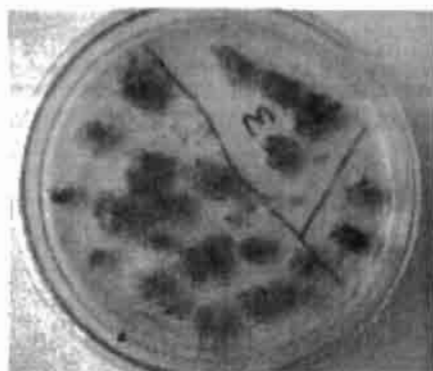
ного аналізу [26, 27]. Оскільки вихідні величини отримували у відсотках (в тому числі значення близькі до критичних), також використовували перетворення даних методом трансформації X в "кут-арксинус $\sqrt{\text{відсоток}}$ " для більш точного порівняння даних [27].

Результати та обговорення

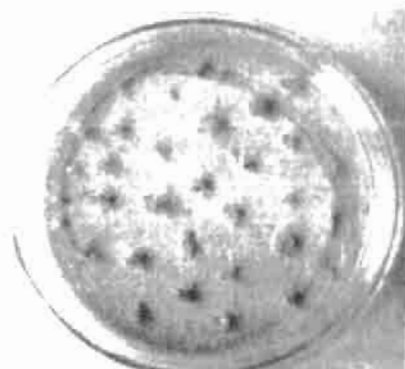
У даній роботі ми вивчали вплив двох синтетичних ауксинів у середовищі для калюсоутворення на процеси регенерації при подальшому культивуванні калюсної тканини різних генотипів м'якої озимої та ярої пшениці. Хоча численні дослідники успішно використовували 2,4-Д для індукції калюсу, цей ауксин при високих концентраціях збільшує хромосомну нестабільність, що призводить до виникнення соматоклональних змін [28]. Тому інші сильні ауксини, в тому числі і піклорам, застосовують як його альтернативу [8, 29–31]. Показано ефективність його використання як окремо, так і у поєднанні з цитокінінами, для підвищення частоти калюсогенезу та росту калюсу [31], соматичного ембріодогенезу [8, 31], регенерації рослин пшениці [29, 30].

Початок калюсоутворення у наших дослідах спостерігали вже на другу — третю добу. Морфологічно калюси, отримані на середовищах із різними ауксинами, не відрізнялися, однак на четвертому тижні культивування показники маси та об'єму калюсу на середовищі з піклорамом були вищі (рис. 2). Також, на калюсах у варіанті з 2,4-Д спостерігали більше число некрозів порівняно з калюсами, отриманими на середовищі з піклорамом.

Утворення морфогенного калюсу та регенерація пагонів відбувалося в усіх досліджених генотипів (рис. 3). У проведених дослідах заміна 2,4-Д на



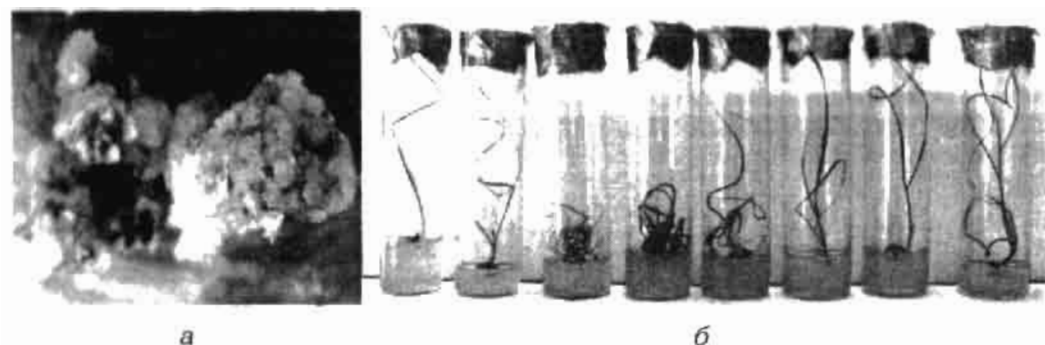
а



б

Рисунок 2. Морфологічний стан калюсної культури після 4 тижнів культивування: а — на середовищі з піклорамом; б — на середовищі з 2,4-Д

піклорам сприяла певному підвищенню частоти регенерації з калюсних культур (табл. 1), а у сортів Смуглянка та Веснянка вона достовірно збільшилась. Підвищення регенераційної здатності калюсу, отримане в умовах експерименту, може бути пов'язане з менш негативним впливом піклорама на генетичний апарат клітин протягом калюсогенезу. Серед досліджених форм найбільшою частотою регенерації характеризувалися ярі сорти пшениці — Зимоярка та Хуторянка, а серед озимих — Смуглянка, Солоха та Веснянка.



а

б

Рисунок 3. Морфогенний калус (а) та отримані рослини-регенеранти досліджуваних сортів ярої та озимої м'якої пшениці (б)

Таблиця 1. Частота регенерації у калюсних культур, отриманих із експлантів на другу добу проростання, на середовищах із різними ауксинами

Ауксин	Сорт	Частота регенерації, %
2,4-Д	Солоха	11,9±2,6
	Колумбія	5,0±1,7
	Переяславка	4,4±1,6
	Смуглянка	6,9±2,0*
	Веснянка	9,4±2,3*
	Зимоярка	24,4±3,4
	Хуторянка	16,9±3,0
Піклорам	Солоха	20,6±3,2
	Колумбія	8,9±2,2
	Переяславка	7,5±2,1
	Смуглянка	17,5±3,0*
	Веснянка	28,2±3,5*
	Зимоярка	26,3±3,4
	Хуторянка	22,5±3,3

* Достовірно на 5% рівні значущості при попарному порівнянні частоти регенерації у одного сорту на середовищах із різним ауксином.

Аналіз даних (табл. 2) свідчить про достовірність отриманих результатів на 5% рівні значимості: фактичні значення критерію F_{ϕ} для ауксину (параметр А), генотипу (параметр В) та їхньої спільної дії (параметр АВ) перевищили показник F_{05} , отриманого виходячи з

відповідних значень ступеня свободи дисперсії основних ефектів і взаємодії та ступеня свободи залишку. Спираючись на дані двофакторного дисперсійного аналізу було проведено оцінку сили впливу зазначених факторів на частоту регенерації — як резуль-

Таблиця 2. Результати двофакторного дисперсійного аналізу

Дисперсія	Сума квадратів	Ступені свободи	Середній квадрат	F _(об)	F _(ос)
Загальна	2760,328	55	—	—	—
Ауксин А	572,8002	1	572,8002	116,2976	4,08
Генотип В	1749,415	6	291,5691	59,19827	2,34
Взаємодія АВ	231,2511	6	38,54185	7,825282	2,34
Залишок (помилка)	206,8625	42	4,925298	—	—

Таблиця 3. Частота регенерації у калюсів, отриманих з проростків різного віку

№	Генотип	Вік проростків, доба*		
		1	2	3
Озимі сорти				
1	Солоха	20,0±3,6	20,6±3,2	22,5±3,3
2	Колумбія	10,0±2,4	8,9±2,2	7,5±2,1
3	Переяславка	7,5±2,1	7,5±2,1	10,0±2,4
4	Смуглянка	17,5±3,0	17,5±3,0	20,0±3,6
5	Веснянка	27,5±3,5	28,2±3,5	30,0±3,6
Ярі сорти				
6	Зимоярка	25,0±3,4	22,5±3,3	25,5±3,3
7	Хуторянка	22,5±3,3	23,7±3,3	25,0±3,4

* Наведено середні значення, отримані у чотирьох дослідах.

тативну ознаку. В умовах експерименту вплив фітогормонального компонента середовища для калюсоутворення складав 20,6%, генотипу 63,3%, а їхньої спільної дії — 8,4% при похибці =0,04, =0,03 та =0,06 — відповідно.

У проведених дослідах ми також оцінювали вплив піклораму та 2,4-Д на життєздатність та збереження регенераційного потенціалу калюсу. За нашими спостереженнями життєздатність морфогенного калюсу, отриманого на середовищі з піклорамом, зберігається протягом 7–10 пасажів, у той час, як тривалість культивування калюсу,

отриманого на середовищі з 2,4-Д, не перевищує 4 пасажів. Регенераційний потенціал на середовищі з 2,4-Д у сортів Смуглянка, Зимоярка, Хуторянка, а також Веснянка зберігався максимально протягом 4 пасажів, у той же час як пагони з калюсу, утвореного на середовищі з піклорамом, отримували на п'ятому, шостому, а у Веснянки і на сьомому пасажі.

Вивчали вплив віку проростка на морфогенетичний потенціал експлантів семи генотипів пшениці. Для калюсоутворення використовували середовище з піклорамом. В таблиці 3 наведено частоту регенерації з калюсів,

отриманих із експлантів проростків на 1–3 добу проростання. В умовах даного експерименту ми не виявили залежності між стадією розвитку донорної рослини та регенераційною здатністю калюсів, отриманих з верхівок пагонів. Хоча при використанні листових експлантів ми спостерігали таку залежність [32]. Отриманий результат можливо пояснити тим, що при використанні верхівок пагона проростка як експланта, що містять меристемні зони, калюс переважно утворюється з початково недиференційованої тканини. У випадку застосування листових експлантів калюсна тканина ініціюється з клітин мезофілу, провідних пучків або інших диференційованих тканин.

Таким чином, показано позитивний вплив піклорама в середовищі для калюсоутворення на життєздатність та збереження регенераційного потенціалу клітинних культур пшениці. Частота регенерації, яку досягнуто в умовах досліджу при використанні верхівок пагона проростків як експлантів, що містять апікальну меристему, певною мірою може задовольнити потреби сучасної біотехнології даної культури. Хоча регенераційний потенціал цього типу експланта нижчий порівняно з незрілими зародками, його доступність в будь-яку пору року і за короткий проміжок часу є перспективним для отримання рослин-регенерантів пшениці.

Висновки

1. Наявність у живильному середовищі піклорама сприяла утворенню калюсу більшої маси при зменшенні числа некрозів. У клітинних культур, які вирощували на середовищі з даним ауксином, виявлено тенденцію до підвищення частоти регенерації пагонів.

2. Калюс, утворений на середовищі з піклорамом, здатний до більш тривалого культивування в умовах *in vitro* (до десяти пасажів), зберігаючи регенераційну здатність до 7 пасажу.

3. Частота регенерації з калюсів, отриманих із верхівок пагонів 1–3 добових проростків, достовірно не відрізнялася.

4. Найбільшою частотою регенерації серед досліджених генотипів характеризуються ярі сорти пшениці — Зимоярка і Хуторянка та озимі сорти Смуґлянка та Веснянка.

Перелік літератури

1. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // *Electronic J. Biotech.* — 2001. — Vol. 4. — P. 74–102.
2. Волощук С.І., Волощук Г.Д., Гірко В.С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // *Захист рослин.* — 1998. — № 8. — С. 4–5.
3. Логвиненко В.Ф., Моргун В.В., Карпець А.І. Індукована *in vitro* мутаційна мінливість озимої пшениці // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.* — Київ: Логос, 2001. — Т. 1. — С. 616–624.
4. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H., Hagi T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1998. — Vol. 53, № 1. — P. 67–74.
5. Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 2000. — Vol. 61. — P. 107–113.
6. Ozgen M., Turet M., Ozcan S., Sancak C. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes // *Plant Breed.* — 1996. — Vol. 115. — P. 455–458.

7. *Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J.* Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.— 2001.— Vol. 67, № 2.— P. 73–80.
8. *Barro F., Martin A., Lazzeri P., Barcel P.* Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum // *Euphytica*.— 1999.— Vol. 108, № 3.— P. 161–167.
9. *Sharma V., Rao A., Varshney A., Kothari S.* Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* L. Des. // *Plant Cell Report*.— 1995.— № 5.— P. 227–231.
10. *Halliloglu K.* Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // *Biologia Plantarum*.— 2006.— Vol. 50, № 3.— P. 326–330.
11. *Rajyalakshmi K., Grover A., Maheshwari A., Tyagi S., Maheshwari C.* High frequency regeneration of plantlets from the leaf-bases via somatic embryogenesis and comparison of polypeptide profiles from morphogenic and non-morphogenic calli in wheat (*Triticum aestivum*) // *Physiologia Plantarum*.— 1991.— Vol. 82, № 4.— P. 617–623.
12. *Wang C., Wei Z.* Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.— 2004.— Vol. 77, № 2.— P. 149–156.
13. *Копертех Л.Г., Стрибная Л.А.* Регенерація рослин із листових експлантів пшениці // *Фізіологія рослин*.— 2003.— Т. 50, № 3.— С. 410–414.
14. *Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M.* Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In vitro cellular and development biology*.— 2002.— Vol. 38, № 2.— P. 163–167.
15. *Zhang S., Zhang H., Sticklen H.B.* Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *Journal of Plant Physiology*.— 1996.— Vol. 148, № 6.— P. 667–671.
16. *Sharma V., Hönsch R., Mendel R., Schulze J.* A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos // *Plant Cell Rep.*— 2004.— Vol. 23.— P. 9–16.
17. *Viertel K., Hess D.* Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures // *Plant Cell Tissue Organ Cult.*— 1996.— Vol. 44.— P. 183–188.
18. *Zhong H., Srinivasan C., Sticklen M.* *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) 1. differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips // *Planta*.— 1992.— Vol. 187.— P. 483–489.
19. *Zhong H., Wang W., Sticklen M.* *In vitro* morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: Efficient plant regeneration from shoot apices // *J. Plant Physiol.*— 1998.— Vol. 153.— P. 719–726.
20. *Wernicke W., Brettell R.* Somatic embryogenesis from sorghum bicolor leaves // *Nature*.— 1980.— Vol. 287.— P. 138–139.
21. *Rines H.W., McCoy T.J.* Tissue culture initiation and plant regeneration in hexaploid species of oats // *Crop Sci.*— 1981.— Vol. 21.— P. 837–842.
22. *Linacero R., Vazquez A. M.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of rye (*Secale cereale* L.) // *Plant Sci.*— 1986.— Vol. 44.— P. 219–222.
23. *Pizetakiwicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.* The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*— 2003.— Vol. 73, № 3.— P. 245–256.
24. *Tsukahara M., Hirokawa T., Murajama H.* Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa*) plantlets // *Plant Cell Rep.*— 1996.— Vol. 8.— P. 597–600.

25. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*— 1962.— Vol. 15.— P. 473–479.
26. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта.— М.: Агропромиздат, 1985.— 351 с.
27. *Лакин Г.Ф.* Биометрия.— М.: Высшая школа, 1973.— 343 с.
28. *Karp A.* Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In I.K. Vasil and T.A. Thorpe (ed.) *Plant cell and tissue culture.* Kluwer Publ., Dordrecht, the Netherlands. 1994.— P. 139–151.
29. *Sharma V., Hänsch R., Mendel J.E.* Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments // *Plant Breeding.*— 2005.— Vol. 124, № 3.— P. 242–246.
30. *Sharma V. K. R., Hänsch R., Mendel R., Schultze J.* Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*— 2007.— Vol. 88, № 1.— P. 21–33.
31. *Mendoza M., Kaeppler H.* Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant.*— 2002.— Vol. 38, № 1.— P. 39–45.
32. *Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І.* Особливості процесів морфогенезу в культурі листових експлантів озимої пшениці // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наук. праць.— Київ: Логос.— 2007.— Т. 2.— С. 444–448.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 9.10.2007

РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ ИЗ ЭКСПЛАНТОВ ВЕРХУШКИ ПОБЕГА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

А.В. Бавол, О.В. Дубровная, И.И. Лялько
Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины,
Украина, 03022 Киев,
ул. Васильковская, 31/17

Изучены процессы каллюсогенеза и регенерации растений в культуре тканей верхушки побега различных генотипов мягкой пшеницы озимого и ярого типов. У изученных форм отмечена генотипическая зависимость процессов образования побегов в культуре *in vitro*. Проанализировано влияние стадии развития донорного материала на регенерационный потенциал культуры. У каллусов, культивировавшихся на среде с пиклорамом выявлена тенденция к повышению частоты регенерации.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., верхушка побега, пиклорам, каллюсогенез, регенерация растений.

PLANT REGENERATION FROM SHOOT TIPS OF WHEAT

A.V. Baval, O.V. Dubrovna, I.I. Lyalko
Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The processes of callusogenesis and regeneration of plants in culture of shoot apices of various genotypes of bread wheat of winter and summer types has been investigated. At the studied forms it is noted genotyping dependence of processes formation of shoots *in vitro*. Influence of a stage of development donor materials on regeneration potential of culture has been analyzed. At callus, cultivated on the medium with picloram, the tendency to increase of frequency of regeneration is revealed.

Key words: *Triticum aestivum* L., shoot tips, picloram, callusogenesis, plant regeneration.