

УДК 581.143.6:58.085

МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

О.М. ГОНЧАРУК, А.В. БАВОЛ, О.В. ДУБРОВНА

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

Досліджено процеси калюсогенезу та регенерації пагонів у культурі апікальних меристем тридодових проростків 14 високопродуктивних сортів озимої м'якої пшениці. Встановлено, що всі досліджувані сорти характеризувались високою здатністю до утворення калюсу. У вивчених сортів відмічено генотипну залежність процесів регенерації пагонів у культурі *in vitro*. Найвищі регенераційні потенціали мали сорти Подолянка, Володарка та Ятрань 60.

Ключові слова: озима пшениця, апікальні меристеми, морфогенний калюс, регенерація.

Сьогодні біотехнологічні методи широко застосовують для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських культур, зокрема пшениці [2, 20]. Отримання морфогенного калюсу і наступна регенерація рослин — невід'ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Злаки — складний об'єкт із погляду експериментальної біотехнології. Однією з причин, які зумовлюють складність отримання калюсної тканини злаків порівняно з дводольними, є нездатність до утворення ранового калюсу в природних умовах. Відомо, що інтенсивність процесів калюсогенезу й утворення пагонів у культурі *in vitro* пшениці великою мірою визначається типом експлантата [5, 7, 8, 11, 15]. Проте досі не вирішена проблема його надійності, доступності в будь-який момент часу та здатності до утворення калюсу з високим регенераційним потенціалом, який зберігає морфогенетичну активність тривалий час.

Незрілі зародки є традиційним експлантатом пшениці, на основі використання яких розроблено ефективні клітинні технології отримання регенерантів [2, 15, 19], проте застосування цього типу експлантата має певні недоліки: короткий період використання в культурі та значні затрати часу і коштів для отримання донорних рослин. Ця обставина змусила дослідників шукати альтернативні типи експлантатів, якими були: зрілі зародки або їх частини [8, 9, 17, 19], незрілі суцвіття [5, 7, 25], сегменти колеоптиля, мезокотилля, молодих листків [1, 11].

Останнім часом значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найперспективнішого експлантата для злакових культур [4, 20, 22, 24, 27, 28], оскільки його перевагою є можливість подолання генотипних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Протягом останнього десятиліття вчені успішно працюють з апексами пагонів проростків кукурудзи, вівса,

сорго, проса, пшениці, тритикале, ячменю для розробки ефективних і менш залежних від генотипу систем регенерації зернових [4, 21, 23, 24, 26, 28]. Культуру апікальних меристем широко використовують як джерело калусної тканини для клітинної селекції й генетичної трансформації рослин, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, які активно діляться, характеризуються високою частотою індукції калусу — до 90 % [20].

У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження особливостей процесів калусогенезу та регенерації в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці.

Методика

Матеріалом досліджень слугували 14 сучасних високопродуктивних сортів озимої м'якої пшениці, серед яких високоінтенсивні — Смуглянка, Володарка, Достаток, Золотоколоса, Колумбія, Славна, Фаворитка, Чорнява; інтенсивні — Богдана, Вінничанка, Подолянка, Переяславка, Снігурка, Ятрань 60, отримані у відділі генетичного поліпшення рослин Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Ці сорти за оптимального фону мінерального живлення забезпечують вирощування високих та якісних урожаїв.

Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3 %-м розчином NaOCl протягом 15 хв, 4 рази промивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі за 24 °С на безгормональному середовищі МС [18]. Експлантатами слугувала апікальна меристема пагона тридобових стерильних проростків (рис. 1, а). Розмір експлантатів

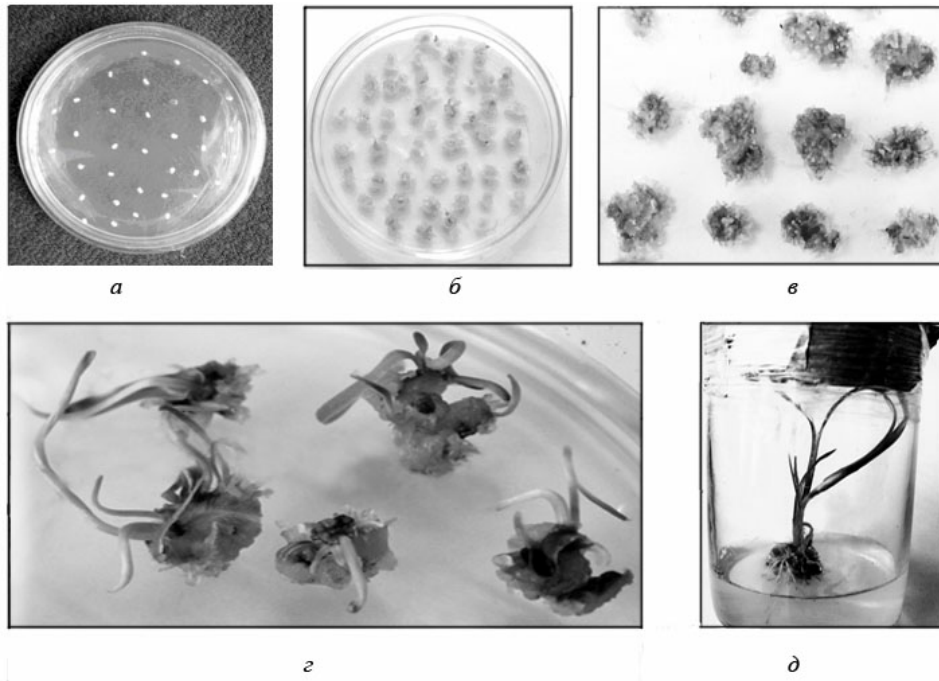


Рис. 1. Етапи отримання рослин-регенерантів в умовах *in vitro*:

а — експлантати апікальної меристеми пагонів; б — первинний калус; в — морфогенний калус; г — регенерація пагонів із калусу; д — укорінення рослин-регенерантів *in vitro*

змінювався в межах 1,5—2,0 мм. Для кожного генотипу брали по 160 експлантатів (4 чашки Петрі по 40 експлантатів у кожній).

Культуру калусної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило *L*-аспарагін — 150 мг/л, AgNO_3 — 10 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д [1]. Експлантати культивували за 26 °С в темряві протягом 3 тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували за освітлення 3—4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду ще протягом 2 тижнів. Сформовані так калуси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 1 мг/л БАП, 0,5 ІОК та 10 мг/л AgNO_3 [1]. Пагони в міру їх розвитку переносили на безгормональне середовище МС з половинним вмістом макросолей для вкорінення. Вкорінені регенеранти пересаджували в стерильний пісок і вміщували у вологу камеру на 7—14 діб. Добре вкорінені рослини пересаджували у ґрунт.

Частоту індукції калусу та регенерації пагонів (у відсотках) визначали як відношення кількості експлантатів, які утворили калус або регенеранти, до загальної кількості експлантатів.

Результати та обговорення

Морфогенез *in vitro* складається з багатьох аспектів, таких як фітогормональне сприйняття, дедиференціація клітин для набуття компетентності до органогенезу, повернення спочивальних клітин у клітинний цикл, організація поділу клітин для формування примордіїв певних органів та меристеми. Уже перші експерименти з культивованими клітинами показали, що на результати роботи впливають не тільки склад поживних середовищ, умови культивування, тип тканин експлантата, умови підготовки рослинного матеріалу до введення його в культуру, а й генотипні особливості [20].

Ми показали, що всі досліджені сорти м'якої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів характеризувались високою здатністю до утворення калусу, яка варіювала від 69 % у сорту Достаток до 99 % у сорту Подолянка (таблиця). Початок калусогенезу в усіх досліджених форм спостерігали вже на другу—третю добу культивування. Утворювався прозорий світлий калус аморфної консистенції. Після перенесення на світло через 10—16 діб культивування виявлено два типи калусу, які різнилися за морфологічними властивостями: морфогенний калус — щільний, жовтуватий, глобулярний (див. рис. 1, б), який на середовищі для регенерації утворював пагони та корені; неморфогенний калус — пухкий, водянистий, прозорий.

У наших дослідженнях після перенесення калусів на світло через 2 тижні вирощування на частині з них спостерігали появу щільних зелених ділянок. Такий калус ми відносили до морфогенного типу. За подальшого культивування частина з них формувала регенеранти. Усі вивчені генотипи озимої пшениці утворювали морфогенний калус, але з різною частотою. Найчастіше він утворювався у сортів Ятрань 60 (88 %) та Подолянка (86 %), найрідше — в сортів Снігурка, Колумбія, Вінничанка — від 33 до 46,9 %.

Після перенесення калусів на регенераційне середовище, яке додатково містило 1 мг/л БАП, утворювались щільні зелені або світло-жовті глобулярні ділянки. За подальшого культивування на зелених ділянках відбувався інтенсивний ризогенез, а на глобулярних — утворю-

Частота морфогенезу в культурі апікальних меристем пагонів

Сорт	Загальна кількість отриманих калюсів, %	Кількість отриманих морфогенних калюсів, %	Частота регенерації, %
Подольнка	98,8±0,9	86,3±2,7	43,1±3,9
Володарка	91,3±2,2	66,9±3,7	30,0±3,6
Чорнява	86,9±2,7	79,4±3,2	19,4±3,7
Колумбія	78,1±3,3	45,6±3,9	7,5±2,1
Снігурка	87,5±2,6	33,1±3,7	7,1±2,0
Ятрань 60	93,8±1,9	88,1±2,4	24,4±3,4
Достаток	68,8±3,7	66,3±3,7	17,5±3,0
Богдана	84,4±2,9	66,3±3,7	7,5±2,1
Переяславка	98,1±1,1	58,1±3,9	3,1±1,4
Славна	81,3±3,1	54,4±3,9	10,6±2,4
Фаворитка	97,5±1,2	53,1±4,0	10,0±2,4
Вінничанка	80,6±3,1	46,9±4,0	15,6±2,9
Смуглянка	92,5±2,1	56,9±3,9	5,0±1,7
Золотоколоса	78,8±3,2	63,8±3,8	8,8±2,2

вались рослини-регенеранти. Формування соматичних зародків спостерігали на 5—10-ту доби культивування на регенераційному середовищі (див. рис. 1, в). Максимальну частоту утворення соматичних зародків (5,1 шт/см²) зафіксовано на 18—20-ту доби культивування. Важливо наголосити, що соматичний ембріогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки в цьому випадку рослина формується із зародка, що має зачатки всіх органів. Максимальною частотою утворення соматичних зародків була на 20—25-ту доби культивування.

Регенерація пагонів відбувалась у всіх генотипів. Проте серед досліджених сортів виявлено істотні відмінності щодо здатності до регенерації. Найбільшою частотою регенерації пагонів характеризувались сорти пшениці Подольнка, Володарка та Ятрань 60, вона становила від 24 до 43 %. Найменшу частоту регенерації пагонів виявлено у сортів Колумбія, Снігурка, Богдана, Смуглянка, Переяславка, Золотоколоса — отримано близько 10 % регенерантів. Подальший розвиток рослин-регенерантів відбувався подібно до розвитку інтактних рослин пшениці в природних умовах *in vivo* (див. рис. 1, д).

Показником, який визначає ефективність регенерації, є кількість пагонів, отриманих з одного калюсу. У наших дослідженнях виявлено, що з одного калюсу утворювалось від 1 до 6 пагонів (див. рис. 1, з). Як видно з рис. 2, на цей показник значно впливав генотип. Серед досліджених сортів середня кількість пагонів, отриманих з одного калюсу, змінювалось від 1,3 у сорту Снігурка до 4,7 у сорту Чорнява. Цей показник був найвищим переважно у сортів з порівняно високою регенераційною здатністю: Подольнка, Чорнява, Ятрань 60, тоді як сорт Володарка, що характеризувався відносно високим регенераційним потенціалом, ймовірно, формувал багато регенерантів за рахунок високого відсотка калюсів, здатних до регенерації, оскільки кожен окремий калюс утворював у середньому 2,3 пагона. Сорт із низькою регенераційною

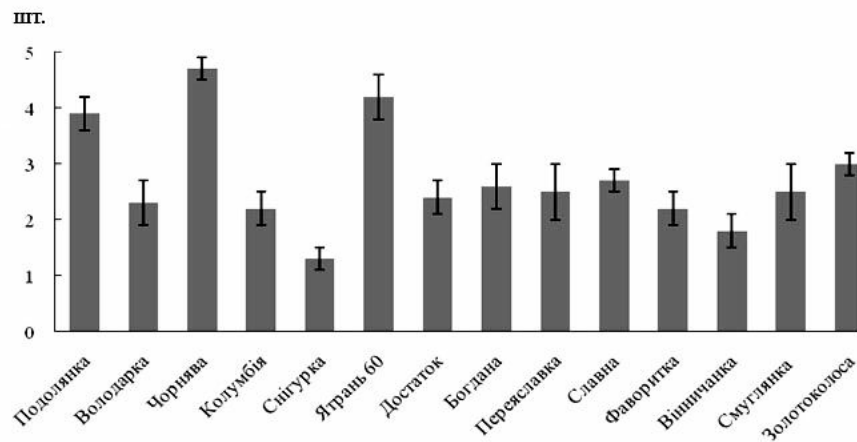


Рис. 2. Середня кількість пагонів (шт.), отриманих з одного калюса

здатністю Снігурка характеризувався найменшою кількістю пагонів, що утворювались з одного калюса.

Висока частота калюсоутворення, що спостерігалась у наших дослідках із генотипами м'якої пшениці в культурі апікальних меристем, і значна розбіжність між генотипами за частотою регенерації пагонів підтвердили існування різних генетичних систем регуляції цих процесів. Одними з перших, хто висловив припущення про те, що такі ознаки, як здатність до калюсогенезу та регенераційний потенціал контролюються незалежними генетичними системами, були Комасуда та співавт. [14]. За допомогою діалельного аналізу дослідники довели справедливість такого припущення для культури тканин незрілих зародків ячменю. Пізніше в низці робіт було показано вплив генотипу й на регенераційну здатність культивованих тканин пшениці [12].

Класичні генетичні підходи дають змогу не тільки виявляти гени, які відповідають за відмінності в прояві тотипотентності *in vitro*, а й визначати їх локалізацію на генетичних картах. Із використанням ліній пшениці з додатковими або заміщеними хромосомами, з транслокаціями проведено генетичний аналіз їхньої здатності до калюсогенезу й регенерації з пиляків і незрілих ембріонів [9, 10], а також локалізовано деякі гени, що контролюють ці ознаки в певних хромосомах пшениці [12]. Дослідженнями на мутантах підтверджено, що великий вплив на прояв тотипотентності *in vitro* мають гени, які змінюють рівень гормонів у клітинах або поріг чутливості до них. У працях [3, 16], виконаних на ізогенних лініях пшениці, що різняться за алелями гена *Rht*, відповідальною за чутливість рослин до гібереліну, показано, що алельні відмінності впливають на ріст і морфогенез калюсних культур, хоча цей ефект залежав від генотипу. Прояв у культурі *in vitro* генів зі специфічним характером експресії може бути пов'язаний з активацією їхньої транскрипції під впливом екзогенних гормонів (регульовані гормонами *цис*-елементи наявні в регуляторних ділянках багатьох генів морфогенезу), в тому числі ауксинрегульована послідовність є в 5'-ділянці гена *PIDIABR* [6].

Частота регенерації, досягнута в умовах дослідку за використання як експлантатів апікальної меристеми пагонів проростків, певною мірою може задовольнити потреби сучасної біотехнології пшениці. Хоча реге-

нераційний потенціал цього типу експлантата дещо нижчий порівняно з незрілими зародками, його доступність у будь-яку пору року дає змогу за короткий проміжок часу отримати значну кількість рослин-регенерантів. Серед досліджених генотипів найбільшою частотою регенерації характеризуються сорти Подолянка, Володарка, Ятрань 60, які можна рекомендувати для подальших робіт, пов'язаних із біотехнологією пшениці, зокрема генної інженерії та клітинної селекції.

1. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Особливості процесів морфогенезу в культурі листкових експлантів озимої пшениці // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 444—448.
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. Емельяничук Н.А., Гвоздев А.В. Использование изогенных линий для изучения каллусообразования и регенерации // Использование изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах. — Новосибирск, 1990. — С. 96—98.
4. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: In vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. — 2002. — **38**, N 2. — P. 163—168.
5. 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. — **108**, N 3. — P. 161—167.
6. Benjamins R., Quint A., Weijers D. et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // Development. — 2001. — **128**. — P. 4057—4067.
7. 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. — **61**. — P. 107—113.
8. Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // Ibid. — 2001. — **67**, N 2. — P. 73—80.
9. Felsenburg T., Feldman M., Galun E. Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat // Theor. Appl. Genet. — 1987. — **74**. — P. 802—810.
10. Galiba G., Kovdez G., Sutka J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat // Plant Breed. — 1986. — **97**. — P. 261—263.
11. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // Biol. Plant. — 2006. — **50**, N 3. — P. 326—330.
12. Henry Y., Marcotte J., De Buyser J. Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines // Theor. Appl. Genet. — 1994. — **89**. — P. 344—350.
13. Karp A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures // Plant Cell and Tissue Cult. / I.K. Vasil, T.A. Thorpe (eds.) — Dordrecht: Kluwer Publ., 1994. — P. 139—151.
14. Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // J. Hered. — 1989. — **80**. — P. 345—350.
15. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T. et al. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures // Plant Cell, Tissue Organ Cult. — 1998. — **53**, N 1. — P. 67—74.
16. Mathias R.J., Atkinson E. In vitro expression of genes affecting whole plant phenotype — the effect of Rht/Gai alleles on the callus culture response of wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) // Theor. Appl. Genet. — 1988. — **75**. — P. 474—479.
17. 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 Cell. Dev. Biol. Plant. — 2002. — **38**, N 1. — P. 39—45.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—479.
19. 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. — **115**. — P. 455—458.
20. Patnaik D., Khurana P. Wheat biotechnology: A minireview plant biotechnology // Electronic J. Biotechnol. — 2001. — **4**. — P. 74—102.

МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПОБЕГОВ

21. *Pizetakiwicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.* The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 3. — P. 245—256.
22. *Sharma V., Hansch R., Mendel J.E.* Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments // *Plant Breed.* — 2005. — **124**, N 3. — P. 242—246.
23. *Sharma V., Hansch 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. — **23**. — P. 9—16.
24. *Sharma V., Hansch R., Mendel R., Schulze J.* Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2007. — **88**, N 1. — P. 21—33.
25. *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. Desf. // *Plant Cell Rep.* — 1995. — **15**, N 3—4. — P. 227—231.
26. *Tsukahara M., Hirotsawa T., Murajama H.* Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa*) plantlets // *Ibid.* — 1996. — **15**, N 8. — P. 597—600.
27. *Viertel K., Hess D.* Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 1996. — **44**. — P. 183—188.
28. *Zhang S., Zhang H., Sticklen H.* Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol.* — 1996. — **148**, N 6. — P. 667—671.

Отримано 14.02.2014

МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПОБЕГОВ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СОРТОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

А.Н. Гончарук, А.В. Бавол, О.В. Дубровная

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследованы процессы каллюсогенеза и регенерации побегов в культуре апикальных меристем трехсуточных проростков 14 высокопродуктивных сортов озимой мягкой пшеницы. Установлено, что все исследуемые сорта характеризовались высокой способностью к образованию каллюса. У изученных сортов отмечена генотипическая зависимость процессов регенерации побегов в культуре *in vitro*. Самые высокие регенерационные потенциалы имели сорта Подолянка, Володарка и Ятрань 60.

MORPHOGENESIS IN APICAL MERISTEMS CULTURE OF HIGHLY PRODUCTIVE WINTER WHEAT VARIETIES

A.N. Goncharuk, A.V. Baval, O.V. Dubrovna

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The processes of calli formation and regeneration of shoots in tissue culture of 3-days seedlings apical meristems of 14 highly productive winter wheat varieties were investigated. It was established that all studied varieties were characterized by a high ability to form callus. It was observed the genotypic dependence of shoots regeneration processes in culture *in vitro*. Podolyanka, Volodarka and Yatran 60 varieties had the highest regeneration potential.

Key words: winter wheat, apical meristem, morphogenic callus regeneration.