

**БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В., ЛЯЛЬКО І. І., ЗІНЧЕНКО М. П.**

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України*

*Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bavol1@rambler.ru*

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТИДІАЗУРОНУ НА ЧАСТОТУ  
УТВОРЕННЯ МОРФОГЕННОГО КАЛЮСУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ  
ПАГОНІВ У КУЛЬТУРІ *IN VITRO* М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ**

На сьогодні біотехнологічні методи широко використовуються для вирішення прикладних задач селекції цінних сільськогосподарських культур і, зокрема, пшениці [1–3]. Одержання морфогенного калюсу і наступна регенерація рослин — невід'ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Однак, до цього часу одним із факторів, що обмежує широке впровадження біотехнологій у генетико-селекційний процес є відсутність ефективних методів масової регенерації рослин із клітинних ліній. Одним із головних чинників, що впливає на регенераційну здатність калюсних культур, є склад живильного середовища. З метою стимулювання процесів морфогенезу до середовищ культивування додають різні біологічно активні речовини — синтетичні аналоги фітогормонів. Зокрема, для вирішення цього завдання дослідниками показана значна ефективність тидіазурону.

Тидіазурон (ТДЗ) — 3-(1,2,3-тіадіазолін-5)-1-фенілсечовина, що використовується як гербіцид та стимулятор росту, одночасно є ефективним регулятором морфогенезу *in vitro* у багатьох дводольних рослин. Показано, що ТДЗ характеризується більшою активністю ніж цитокінін та зеатин. Він стимулює розвиток бічних бруньок пагона та сприяє формуванню стебел у багатьох видів покритонасінних. Згідно сучасних уявлень ТДЗ безпосередньо стимулює ріст через власну біологічну (цитокінінову) активність та здатний стимулювати синтез і накопичення ендогенних цитокінінів. Низькі концентрації ТДЗ у рослин стимулюють ріст пазушних бруньок, однак високі — здатні його інгібувати. Відомо також, що відносно високі концентрації ТДЗ здатні індукувати утворення калюсу та стимулювати формування соматичних ембріоїдів [4].

Однак, на сьогодні інформації щодо дії ТДЗ на культуру пшениці *in vitro* недостатньо. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідження впливу ТДЗ на індукцію морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у калюсних культур пшениці.

**Матеріали і методи**

Матеріалом досліджень був сорт-дворучка м'якої пшениці — Зимоярка, отриманий у відділі експериментального мутагенезу ІФРГ НАН України. В якості експлантів використовували верхівки пагона 1–3 добових проростків, розмір яких варіював у межах 1,5–2,0 мм. 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 °С на безгормональному середовищі МС 1–3 доби. Експланти висаджували на живильне середовище МС, яке додатково містило L-аспарагін — 150 мг/л, AgNO<sub>3</sub> — 10 мг/л та 2,4-Д 2 мг/л та культивували при 26 °С в темряві протягом двох тижнів. Потім калюси 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 10 мг/л AgNO<sub>3</sub> і ТДЗ у різних концентраціях: 0,1–1,5 мг/л (залежно від варіанту досліду). Для контролю калюси висаджували на регенераційне середовище МС, що додатково містило 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК, ефективність якого була нами продемонстрована раніше [5]. Досліджували по 160 експлантів, представлених 4-ма чашками Петрі (по 40 експлантів в чашці) на кожну концентрацію ТДЗ. Частоту індукції морфогенного калюсу визначали на 21 добу культивування. Число пагонів, отриманих з калюсних культур, підраховували після 8 тижнів вирощування. Частоту регенерації рослин (у відсотках), визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили рослини-регенеранти, до загального числа експлантів.

### **Результати та обговорення**

У злаків регенераційну здатність досить часто пов'язують з появою в калюсній тканині щільних ділянок, утворених меристеміодними клітинами, або морфогенних зон [6–8]. Нами досліджувався вплив різних концентрацій ТДЗ на процеси морфогенезу калюсних культур пшениці. Препарат додавали до живильного середовища в концентраціях 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 та 1,50 мг/л.

Після переносу калюсів на світло, через 14 діб вирощування, на частині з них спостерігали появу щільних зелених ділянок. Такий калюс ми відносили до морфогенного типу. При подальшому культивуванні частина з них формувала регенеранти. У всіх варіантах досліду, відмічено утворення морфогенного калюсу, однак частота його формування була різною (рис. 1).

Слід відмітити, що за концентрації ТДЗ в середовищі 0,25 мг/л, частота утворення морфогенного калюсу була найбільшою і сягала 94%. У варіантах з концентрацією ТДЗ 1,25 та 1,50 мг/л морфогенний калюс практично не утворювався. У цих варіантах через 16–20 діб, калюс припиняв ріст, спостерігалось утворення некротичних зон, що в подальшому приводило до його загибелі.

На регенераційному середовищі в калюсах відмічено наступні шляхи морфогенезу: органогенез за типом гемморизогенезу (формування бруньки та кореня), ризогенез (формування кореня) та соматичний ембріодогенез — формування соматичних зародків. Пагони починали розвиватися з морфогенних зон після двох-трьох тижнів культивування.

Низький вміст ТДЗ (0,10 мг/л) спричиняв зниження частоти регенерації пагонів в порівнянні з контролем (рис. 2). При високих дозах ТДЗ (1,00; 1,25 та 1,50 мг/л) спостерігалось погіршення фізіологічного стану калюсів

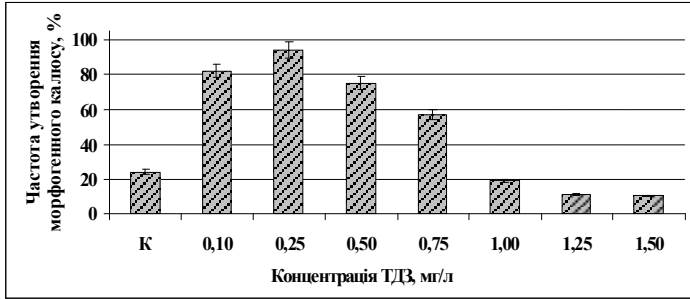


Рис. 1. Частота утворення морфогенного калюсу на середовищах з різною концентрацією ТДЗ

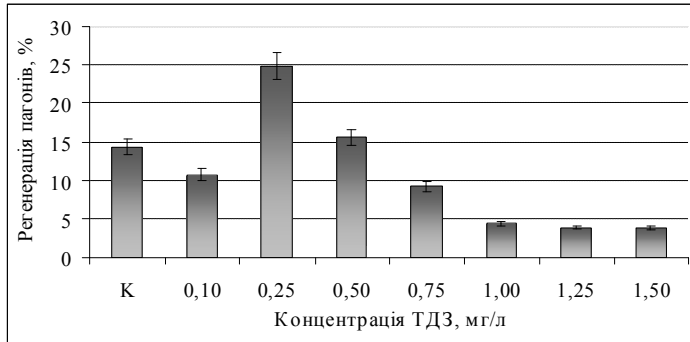


Рис. 2. Вплив різних концентрацій ТДЗ на регенерацію пагонів з калюсних культур пшениці

і їх регенераційна здатність істотно знижувалась. Достовірне підвищення регенераційної здатності виявлено при наявності у живильному середовищі ТДЗ у концентрації 0,25 мг/л.

Слід зазначити, що ряд авторів схиляються до думки, що цитокініни не відіграють суттєвої ролі в соматичному ембріогенезі більшості рослин. Однак, потрібно розділяти різні цитокініни за хімічною будовою на аденинового типу (кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин) та феніл-сечовинного типу (ТДЗ). Для індукції утворення ембріогенного калюсу в багатьох випадках доцільно використовувати кінетин, БАП та бензиладенін (БА). Останній також часто використовують на етапах проліферації соматичних зародків та їх регенерації в повноцінні рослини [9, 10]. На сьогоднішній день, для індукції прямого соматичного ембріогенезу і органогенезу із вегетативних та генеративних тканин, все частіше застосовують цитокініни феніл-сечовинного типу. Особливо це стосується тих видів рослин, які складно культивувати в умовах *in vitro*, до яких належать також злакові культури. Зокрема ряд авторів [4, 11, 12] наводять приклади успішного використання

ТДЗ для підвищення регенераційної здатності пшениці *in vitro*, що в цілому підтверджують наші дослідження.

Таким чином, дослідження впливу ТДЗ на утворення морфогенного калюсу з експлантів верхівки пагона проростків пшениці, ріст калюсних культур та процеси регенерації пагонів показало, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ в середовищі. Відповідно до отриманих результатів, ТДЗ має здатність стимулювати утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у м'якої пшениці за концентрації 0,25 мг/л. В ході дослідження нами не виявлено прямої залежності між частотою утворення морфогенного калюсу та частотою регенерації пагонів.

### Література

1. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // Electronic J. Biotech.— 2001.— V.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 ВФ., Моргун В.В., Карнець 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. Xueyan S., Desen L., Rongda Q. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley // *In vitro Cellular and Development Biology*.— 2000.— Vol.36, №3.— P. 207–210.
5. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.— 2007.— Т.5, №1–2.— С. 3–10.
6. Eudes F., Achatya S., Laroche A. et al. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*— 2003.— Vol.73, №2.— P. 147–157.
7. Chen H., Xu G., Loschke D. et al. Efficient callus formation and plant regeneration from leaves of oats (*Avena sativa* L.) // *Plant Cell Reports*.— 1995.— Vol.14, №6.— P. 393–397.
8. Becher T., Haberland G., Koop H. Callus formation and plant regeneration in standart and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Cell Rep.*— 1992.— Vol.11.— P. 39–43.
9. Hamama L., Baaziz M., Letouze R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of jojoba // *Plant Cell Tissue and Organ Cultures*.— 2001.— Vol.65, N2.— P. 109–113.
10. Nonda R., Rout G. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica* // *Plant Cell Tissue and Organ Cultures*.— 2003.— Vol.73, N2.— P. 131–135.
11. Birsin M., Ozgen M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of Triticale (*Triticosecale* Wittmack) // *Cellular&Molecular Biology Letters*.— 2004.— Vol.9.— P. 353–361.
12. Yaqubov N., Onde S., Osdemir B. The effects of thidiazuron on callus development and organogenesis from mature embryos of selected // Turkish bread and durum wheat varieties // *Proceedings of the Balkan scientific conference of biology*.— 2005.— P. 192–201.

## Резюме

Досліджено вплив тидіазурона (ТДЗ) на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів м'якої пшениці. Показано, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ в поживному середовищі. Найбільшою частотою утворення морфогенного калюсу (94%) спостерігалась за концентрації ТДЗ 0,25 мг/л. У варіанті з концентрацією ТДЗ 0,25 мг/л, також виявлено достовірне підвищення частоти регенерації пагонів до 24%, в порівнянні з контролем, де цей показник складає 18,5%.

Исследовано влияние тидиазулона (ТДЗ) на образование морфогенного каллуса и регенерацию побегов мягкой пшеницы. Показано, что процессы морфогенеза зависят от концентрации ТДЗ в питательной среде. Наибольшую частоту образования морфогенного каллуса (94%) наблюдали при концентрации 0,25 мг/л. В варианте с концентрацией ТДЗ 0,25 мг/л, также выявлено достоверное увеличение частоты регенерации побегов до 24%, в сравнении с контролем, где этот показатель составляет 18,5%.

The effect of thidiazuron (TDZ) on formation morphogenic callus and shoot regeneration of wheat has been investigated. It is shown, that processes of morphogenesis depend at concentration of TDZ in a nutrient medium. The highest frequency of formation morphogenic callus (94%) was observed at concentration 0,25 mg/l. In the variant, with concentration TDZ 0,25 mg/l, we observed increasing of frequency shoot regeneration to 24%, in comparison with 18,5% in the control.

## БЕЛОКУРОВА В.Б.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАННИТОЛА И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *CARYOPHYLLACEAE*

Использование методов биотехнологии, в том числе путём создания банков *in vitro*, рассматривается как важный элемент охраны биоразнообразия растений [1–5]. Уменьшить затраты материалов и труда на поддержание асептических коллекций можно за счёт использования так называемого “замедленного” роста (“slow growth”), который даёт возможность увеличить интервалы субкультивирования. Замедлить или полностью остановить рост *in vitro* можно с помощью ряда методов — снижения температуры, создания осмотического стресса или использования соединений, замедляющих рост [6]. В ряде публикаций сообщается об использовании для этой цели маннитола [2, 5–8], а также абсцизовой кислоты [9–11].

Нами начата работа по изучению возможностей использования замедленного роста для поддержания коллекции растений *in vitro*. Семейство *Caryophyllaceae* в банке представителей мировой флоры *in vitro*, созданном