

УДК: 581.143.6:58.085

ПІДВИЩЕННЯ ЧАСТОТИ РЕГЕНЕРАЦІЇ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ПШЕНИЦІ ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

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

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
 Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
 e-mail: dubrovny@ukr.net

Мета. Вивчення впливу віку незрілих зародків та синтетичного ауксину дикамби на морфогенетичний потенціал калюсів двох сортів м'якої пшениці – Подолянка та Зимоярка за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. **Методи.** Оптимізація умов регенерації пагонів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. **Результати.** Встановлено, що вік незрілих зародків суттєво впливає на частоту калюсоутворення та виявлено сортоспецифічність цього показника. Заміна 2,4-Д на дикамбу в середовищі для калюсогенезу та ІОК на дикамбу в середовищі для регенерації дозволила підвищити частоту індукції пагонів за генетичної трансформації у 2–3 рази. Найбільша кількість рослин-регенерантів у сорту Подолянка отримана на середовищі з дикамбою в концентрації 3 мг/л, а у сорту Зимоярка – при 2 мг/л. **Висновки.** Оптимізовано живильне середовище з використанням синтетичного ауксину дикамби, що дозволило підвищити частоту регенерації пагонів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, незрілі зародки, дикамба, регенерація.

Вступ. На сьогодні при створенні сортів пшениці, стійких до стресових чинників довкілля, все більшого значення набувають методи генетичної інженерії [1]. Проте пшениця залишається складною культурою для проведення біотехнологічних робіт, оскільки процеси калюсогенезу та утворення пагонів в умовах *in vitro* значною мірою визначаються типом експланту [2–7], генотипом [8] та складом живильного середовища [9, 10]. Крім того, тип експланту і склад живильного середовища є основними чинниками, що впливають на регенерацію пагонів.

Незрілі зародки є традиційним експлантом у пшениці, на основі застосування яких розроблено ефективні технології отримання калюсних культур та подальшої індукції з них рослин-регенерантів [2]. Варто зазначити, що високий морфогенетичний потенціал калюсів, отриманих із незрілих зародків, зберігається нетривалий час і може залежати від генетичних особливостей донорної рослини [9]. Тому для успішного використання незрілих зародків необхідним є визначення оптимальної стадії виділення експлантів з урахуванням особливостей конкретного генотипу.

За *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці необхідно проводити кокультивацію калюсів із агробактерією, що негативно впливає на по-

дальшу регенерацію пагонів. Крім того, для елімінації агробактерії використовуються високі дози антибіотику, що теж має негативний вплив на морфогенний потенціал калюсів, зменшує імовірність регенерації і, відповідно, отримання трансгенних форм [11].

Традиційно для дедиференціації клітин злакових та індукції калюсогенезу використовують середовища з додаванням 2,4-Д. Разом і з тим, отримані калюси характеризуються повільним переходом до морфогенного стану, а період індукції пагонів настає пізніше. Застосування 2,4-Д за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації не є оптимальним, оскільки через затримку морфогенезу та регенерації за тривалого культивування калюси можуть гинути раніше появи регенерантів. Можливим варіантом підвищення регенераційної здатності калюсів після проведення трансформації є заміна 2,4-Д на інші ауксини синтетичного походження, зокрема дикамбу [12]. Є дані, що ці ауксини не тільки стимулюють калюсогенез, але й прискорюють перехід калюсів у морфогенний стан, істотно збільшують кількість меристематичних ділянок, з яких в подальшому відбувається соматичний ембріогенез [13]. У результаті цього регенераційні процеси відбуваються швидко, а вихід регенерантів збільшується. Метою нашого дослідження є вивчення впливу віку незрілих зародків та синтетичного ауксину дикамбу на морфогенетичний потенціал калюсів двох сортів пшениці – Подолянка та Зимоярка за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були два сучасні сорти м'якої пшениці Подолянка та Зимоярка, створені у відділі генетичного поліпшення рослин ІФРГ НАН України. Як експланти використовували незрілі зародки інтактних польових рослин, які ізолювали

щоденно, починаючи з дев'ятої та закінчуючи шістнадцятою добою після запилення. Для точного визначення віку незрілих зародків проводили кастрацію колоса, а через три доби опилували пилком з рослин того ж сорту. Розмір експлантів варіював від 1 до 3 мм. Зародки стерилізували в три етапи: 1 % розчином $KMnO_4$ протягом 2 хв., потім 70 % етанолом – 2 хв. та 30 % комерційним препаратом «Білізна» 10 хв., після чого тричі промивали стерильною дистильованою водою. Для вивчення впливу синтетичного ауксину на процеси калюсогенезу використовували модифіковане середовище МС [14] з додаванням дикамбу в концентрації 1, 2 та 3 мг/л. Як контроль використовували теж саме середовище з 2,4-Д в концентрації 2 мг/л, оскільки ця концентрація є оптимальною для калюсогенезу *Triticum aestivum* L. [15]. У кожному варіанті дослідження використовували по 200 незрілих зародків. Умови та процедура *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації наведено у роботі [16].

Частоту індукції калюсу, утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів (у відсотках) визначали за співвідношенням кількості експлантів, які утворили калюс або пагони, до їхньої загальної кількості. Канаміцин-стійкими вважали рослини, які зберігали зелене забарвлення на селективному середовищі. Достовірність різниці між показниками оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати і обговорення

Незрілі зародки як експланти характеризуються високою здатністю до калюсоутворення та подальшої регенерації. Проте, одним з основних недоліків їхнього використання як експлантів є короткий проміжок часу, протягом якого їх можливо виділяти. Зазвичай він припадає на 12–15 добу.

Нами було проаналізовано здатність до калюсогенезу незрілих зародків, виділених протягом 8 діб, починаючи з 9-ї та закінчуючи 16-ю добою після запилення. Встановлено, що вік незрілих зародків значною мірою впливав на здатність до утворення калюсу (рисунк).

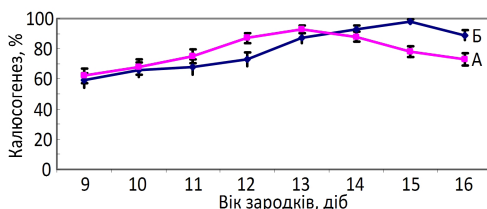


Рисунок. Вплив віку незрілих зародків сортів пшениці Зимоярка (А) та Подільянка (Б) на здатність до калюсогенезу на живильному середовищі з 2,4-Д

Для сорту Зимоярка найоптимальнішим строком виділення зародків виявилася 13 доба – більше 90 % експлантів утворили калюс. Для сорту Подільянка оптимальною виявилася 15 доба, оскільки здатність експлантів утворювати калюс була близькою до 96 %. Те, що у кожного сорту оптимум калюсогенезу спостерігали у зародків різного віку, вказує на сортоспецифічність цього показника.

Зародки, виділені на більш ранніх етапах онтогенезу (на 9-ту добу), характеризувались зниженою здатністю до калюсогенезу, а сам процес їхнього отримання був складнішим та часто супроводжувався пошкодженням тканин. Отримані калюси розвивались уповільнено. За використання експлантів більш пізнього віку (16-та доба після запилення) спостерігали зниження частоти калюсогенезу за рахунок того, що замість індукції калюсу відбувалося проростання зародків. У пізні строки процес виділення ускладнювався через більш щільне прилягання зародків до насінних покривів. У подальшій роботі незрілі зародки у сорту Зимоярка виділяли на 13-ту, а у сорту Подільянка на 15-ту добу.

Для отримання регенерантів після генетичної трансформації калюсів принципово важливими є умови, в яких утворювались та розвивались калюси. Важливим є використання ауксинів, які не тільки сприяють росту калюсу, але й підвищують морфогенний потенціал та стимулюють регенерацію. Наші результати свідчать, що застосування різних ауксинів не вплинуло на початок калюсогенезу, який в усіх досліджених форм розпочався вже на другу-третю добу культивування. Утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції.

Морфологічно калюси, отримані на середовищах з різними ауксинами, не відрізнялися. Концентрація 1 мг/л дикамби в індукційному середовищі виявилася недостатньою для утворення калюсу в більшості експлантів (табл. 1). Калюсогенез при такій концентрації хоч і відбувався, проте його частота була достовірно нижчою за контроль, калюси росли повільно.

Таблиця 1. Вплив різних концентрацій дикамби на частоту калюсогенезу з незрілих зародків пшениці сортів Подільянка та Зимоярка

Ауксин	Концентрація, мг/л	Частота калюсогенезу, %
Сорт Подільянка		
2,4-Д (контроль)	2	95,5±1,5
дикамба	1	59,0±3,5
	2	70,5±3,2
	3	93,0±1,8
Сорт Зимоярка		
2,4-Д (контроль)	2	95,5±1,5
дикамба	1	34,5±3,4
	2	67,0±3,3
	3	98,0±1,0

При застосуванні дикамби у дозі 2 мг/л відбувалося підвищення частоти утворення калюсу, проте вона також значно поступалася частоті калюсогенезу на середовищі з 2,4-Д. Збільшення концентрації до 3 мг/л не

Таблиця 2. Частота регенерації з калюсів пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації

Регенераційне середовище	Калюси, ініційовані на середовищі з 2 мг/л 2,4-Д			Калюси, ініційовані на середовищі з 3 мг/л дикамби		
	морфогенних калюсів, %	частота регенерації, %	частота зелених пагонів, %	морфогенних калюсів, %	частота регенерації, %	частота зелених пагонів, %
<i>Сорт Подольнка</i>						
МС -21 (1 мг/л БАП + 0,5 мг/л ІОК) (контроль)	14,0±2,5	5,0±1,5	0,5±0,5	16,5±2,6	10,0±2,1	1,5±0,9
МС-31 (1 мг/л БАП + 2 мг/л дикамба)	14,5±2,5	7,5±1,9	1,0±0,7	19,5±2,8	15,0±2,5*	2,5±1,1
МС-32 (1 мг/л БАП + 3 мг/л дикамба)	19,0±2,8	10,5±2,1	1,5±0,9	28,0±3,2	21,0±2,9*	6,0±1,7
МС-33 (1 мг/л БАП + 4 мг/л дикамба)	10,0±2,1	3,5±1,3	–	14,5±2,5	6,0±1,7	1,5±0,9
<i>Сорт Зимоярка</i>						
МС-21 (1 мг/л БАП + 0,5 мг/л ІОК) (контроль)	12,5±2,3	3,5±1,3	0,5±0,5	17,0±2,7	6,0±1,7	1,0±0,7
МС-31 (1 мг/л БАП + 2 мг/л дикамба)	16,0±2,6	5,5±1,6	1,0±0,7	24,5±3,0	12,0±2,3*	4,5±0,7
МС-32 (1 мг/л БАП + 3 мг/л дикамба)	13,0±2,4	2,5±1,1	1,0±0,7	16,0±2,6	5,0±1,5	1,0±0,7
МС-33 (1 мг/л БАП + 4 мг/л дикамба)	8,5±2,0	–	–	14,5±2,5	3,5±1,3	1,0±0,7

Пр и м і т ка. * – Різниця між контролем та дослідом достовірна при P = 0,95.

виявило достовірних відмінностей від контролю за частотою калюсоутворення.

Після того, як калюси набули необхідного розміру (діаметром близько 5 мм), їх було використано для проведення генетичної трансформації. Попередні дослідження показали, що основною причиною загибелі рослинних клітин в умовах *in vitro*, особливо за кокультивування з *Agrobacterium*, як правило, є некроз або апоптоз завдяки надвиробництву перекису водню, що різко зменшує регенераційний потенціал калюсних клітин. Для протидії цьому явищу зазвичай до складу регенераційного середовища додають антиоксиданти, зокрема нітрат срібла, цистеїн і аскорбінову кислоту, що може істотно поліпшити регенерацію. Нами досліджено ефективність

регенераційних середовищ – МС-21, яке додатково містило аспарагінову кислоту (150 мг/л), азотнокисле срібло (5 мг/л), глютамін (10 мг/л), цистеїн (20 мг/л), аскорбінову кислоту (100 мг/л), ІОК (0,5 мг/л) та БАП (1 мг/л), а також живильні середовища МС-31, МС-32 та МС-33, які містили ті ж компоненти, проте ІОК було замінено на дикамбу у концентрації 2–4 мг/л, відповідно.

Після кокультивування з агробактерією, селекції на середовищі з антибіотиком та перенесення калюсів на регенераційні середовища на них спостерігали утворення глобулярних ділянок яскраво-зеленого або світло-жовтого кольору. Такі калюси відносили до морфогенних. Однак у варіанті з 2,4-Д спостерігали біль-

шу кількість некрозів та перехід тканин до морфогенного стану відбувався пізніше на 3–5 діб порівняно з калюсами, отриманими на середовищі з дикамбою.

Результати досліджень свідчать, що гормональний склад середовища під час індукції та росту калюсів впливає на подальший перехід до морфогенного стану після трансформації. Утворення максимальної кількості морфогенного калюсу (28 %) у сорту Подолянка спостерігали на середовищі з додаванням дикамби в концентрації 3 мг/л, в той час як у сорту Зимоярка при 2 мг/л (24 %) (табл. 2). Оскільки існує пряма кореляція між кількістю морфогенних калюсів та рослин-регенерантів, на вказаних середовищах вдалося отримати і найбільшу кількість рослин.

Спостерігали суттєву різницю між кількістю отриманих регенерантів на середовищі з ІОК та дикамбою (табл. 2). При оптимальній концентрації дикамби виявлено достовірну різницю та збільшення числа регенерантів у 2–3 рази.

Це можна пояснити повільним переходом у морфогенний стан та інгібуванням подальшої регенерації калюсів, ініційованих на середовищі з 2 мг/л 2,4-Д. Внаслідок негативної дії антибіотиків та інфекції агробактерією загибель калюсів настає до того, як почнуться активні морфогенні процеси. Підвищення частоти регенерації також можливо пов'язано з більшою ефективністю дикамби в регенераційному середовищі порівняно з індолілоцтовою кислотою.

Неодноразово повідомлялося, що в культурі тканин зернових дикамба має більшу ауксинову активність порівняно з 2,4-Д. Так, згідно з літературними даними [10, 17, 18] додавання 2 мг/л дикамби до середовища для калюсогенезу значно підвищило частоту утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів. Аналогічний результат спостерігали й інші автори при використанні 4–5 мг/л дикамби [13,

19, 20]. Філіппов та ін. [9] також підтверджують ефективність дикамби, однак рекомендують значно вищі концентрації препарату (12 мг/л). Такі розбіжності можна пояснити різним ендогенним рівнем ауксинів у сортів, які використовувалися для досліджень. Тобто, різні генотипи пшениці можуть по-різному реагувати на вміст та концентрацію дикамби. Тому для оптимального результату у кожного конкретного сорту підбір концентрації дикамби повинен здійснюватися індивідуально.

Висновки

За результатами досліджень встановлено, що найоптимальнішим строком виділення незрілих зародків для сорту Подолянка була п'ятнадцята, а для Зимоярки – тринадцята доба, що забезпечує частоту утворення калюсу на рівні понад 95 %. Використання в середовищах для калюсогенезу та регенерації дикамби дозволяє підвищити регенераційну здатність калюсів пшениці *in vitro* у 2–3 рази. Найбільша кількість рослин-регенерантів у сорту Подолянка отримали на середовищі з додаванням дикамби в концентрації 3 мг/л, в той час як у сорту Зимоярка – при 2 мг/л. Встановлено, що для кожного генотипу підбір концентрації дикамби повинен здійснюватися індивідуально. Оптимізовано живильне середовище з використанням синтетичного ауксину дикамби, що дозволило підвищити частоту регенерації пагонів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці.

Перелік літератури

1. *Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh M.B.* Wheat transformation – an update of recent progress // *Euphytica*. – 2006. – Vol. 149. – P. 353–366.
2. *Machii H.* 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.

3. Benkirane 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.
4. Shariatpanahi M., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E., Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment // *Plant Cell Reports.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1294–1299.
5. Tamas C., Szucs P., Rakszegi M., Tamas L., Bedo Z. Effect of combined changes in culture medium and incubation conditions on the regeneration from immature embryos of elite varieties of winter wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2004. – Vol. 79. – P. 39–44.
6. Redha A, Talaat A. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat // *Plant Cell Tissue Organ Culture.* – 2008. – Vol. 92. – P. 141–146.
7. Liu X., Liu J., Guo A., Zhao H. Study on the tissue culture and plant regeneration of different explant from wheat // *J. of Triticeae Crops.* – 2008. – Vol. 28. – P. 568–572.
8. Fennell S., Bohorova N., Ginkel M., Crossa J., Hoisington D. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheat // *Theoretical and Applied Genetics.* – 1996. – Vol. 92. – P. 163–169.
9. Filippov M., Miroshnichenko D., Vernikovskaya D., Dolgov S. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2006. – Vol. 84. – P. 213–222.
10. Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2003. – Vol. 73. – P. 245–256.
11. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 115. – P. 971–980.
12. Tang Z., Ren Z., Wu F., Fu S., Wang X., Zhang H. The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system // *Agricultural Sciences in China.* – 2006. – Vol. 5. – P. 417–424.
13. Ren J., Wang X., Yin J. Dicamba and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of wheat // *Agricultural Sciences in China.* – 2010. – Vol. 9, № 1. – P. 31–37.
14. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2008. – Т. 40, № 2. – С. 150–156.
15. 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.
16. Бавол А.В., Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – 2014. – Т. 15. – С. 16–19.
17. Satyavathi V., Jauhar P., Elias E., Rao M. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat // *Crop Science.* – 2004. – Vol. 44. – P. 1839–1846.
18. Trifonova A., Madsen S., Olesen A. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions // *Plant Science.* – 2001. – Vol. 161. – P. 871–880.
19. 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.
20. Kilinc M. Effects of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes // *Biotechnology and Biotechnology Equipment.* – 2004. – Vol. 18. – P. 58–61.

Представлено В.А. Кунахом
Надійшла 18.11.2014

ПОВЫШЕНИЕ ЧАСТОТЫ РЕГЕНЕРАЦИИ
КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПШЕНИЦЫ
ПРИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ

А.Н. Гончарук, А.В. Бавол, А.В. Дубровная
Институт физиологии растений и генетики
Национальной академии наук Украины
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская,
31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

Цель. Изучение влияния возраста незрелых зародышей и синтетического ауксина дикамбы на морфогенетический потенциал каллусов двух сортов пшеницы – Подольнка и Зимоярка при *Agrobacterium*-опосредованной транс-

формации. **Методы.** Оптимизация условий регенерации побегов при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. **Результаты.** Установлено, что возраст незрелых зародышей существенно влиял на частоту каллусообразования, выявлена сортоспецифичность этого показателя. Замена 2,4-Д на дикамбу в среде для каллусогенеза и ИУК на дикамбу в среде для регенерации позволила повысить частоту индукции образования побегов при генетической трансформации в 2–3 раза. Наибольшее количество растений-регенерантов у сорта Подольянка получено на среде с дикамбой в концентрации 3 мг/л, а у сорта Зимоярка – при 2 мг/л. **Выводы.** Оптимизирована питательная среда с использованием синтетического ауксина дикамба, что позволило повысить частоту регенерации побегов при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, незрелые зародыши, дикамба, регенерация.

INCREASE IN FREQUENCY OF WHEAT CALLUS CULTURES REGENERATION FOR AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION

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

Institute of Plant Physiology and Genetics,
National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska Str., 31/17
e-mail: dubrovny@ukr.net

Aim is to study the impact of immature embryos age and synthetic dicamba auxin on callus morphogenetic potential in two wheat varieties, Podolyanka and Zymoyarka, during *Agrobacterium*-mediated transformation. **Methods.** Optimization of conditions for shoot regeneration during *Agrobacterium*-mediated transformation. **Results.** Age of immature embryos was found to significantly influence the incidence of callus formation and cultivar-specificity of this indicator. Replacement of 2,4-D on dicamba in the medium for callus formation and IAA on dicamba in the medium for regeneration has increased frequency of shoots induction 2–3 times during genetic transformation. The largest number of plant-regenerants in a variety Podolyanka was obtained on medium with dicamba at concentration 3 mg/L, while in the variety Zymoyarka – at 2 mg/l. **Conclusions.** Nutrient medium using synthetic auxin dicamba was optimized, thus allowing to increase the incidence of shoots regeneration during *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat.

Keywords: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, immature embryos, dicamba, regeneration.