

УДК 581.1.633.

## ВПЛИВ ТИДІАЗУРОНУ НА ПРОЦЕСИ МОРФОГЕНЕЗУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

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

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: bavo11@rambler.ru*

Досліджено вплив синтетичного фітогормону — тидіазурону (ТДЗ) на утворення морфогенного калюсу з експлантатів верхівки пагона проростків пшениці та регенерацію пагонів. Установлено, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ у поживному середовищі. ТДЗ концентрацією 0,25 мг/л стимулює утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів м'якої пшениці.

*Ключові слова:* *Triticum aestivum* L., тидіазурон, калюсогенез, регенерація пагонів.

Нині біотехнологічні методи широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських культур, зокрема пшениці [1, 9, 20]. Отримання морфогенного калюсу і наступна регенерація рослин — невід'ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Однак досі одним із чинників, що обмежує широке впровадження біотехнологій у генетично-селекційний процес, є відсутність ефективних методів масової регенерації рослин із клітинних ліній. Один із головних чинників, що впливає на регенераційну здатність калюсних культур — склад поживного середовища. Пшениця, як і всі інші злаки, належить до групи гормонозалежних об'єктів культивування *in vitro*. Тому добір оптимальної концентрації певних фітогормонів, які входять до складу поживного середовища, є ключовим етапом роботи з культурою пшениці.

Останнім часом з метою стимулювання процесів морфогенезу до середовищ культивування додають синтетичні аналоги фітогормонів. Зокрема, дослідники встановили значну ефективність відомого дефоліанту — тидіазурону. ТДЗ — 3-(1,2,3-тіадіазолін-5)-1-фенілсечовину застосовують як гербіцид і стимулятор росту, водночас вона є ефективним регулятором процесів морфогенезу в культурі *in vitro* багатьох дводольних рослин [4, 11, 14, 23]. Згідно із сучасними уявленнями, ТДЗ безпосередньо стимулює ріст через власну біологічну (цитокінінову) активність, здатний інтенсифікувати синтез і накопичення ендогенних цитокінінів [19]. Відносно високі концентрації ТДЗ індукують утворення калюсу, стимулюють формування соматичних ембріодів [12, 13, 15]. Однак на сьогодні інформації щодо дії ТДЗ на культуру пшениці *in vitro* обмаль.

Метою нашої роботи було дослідження впливу ТДЗ на індукцію морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у калюсних культур пшениці.

## Методика

Матеріалом для досліджень був сорт дворучка м'якої пшениці — Зимо-ярка, отриманий у відділі експериментального мутагенезу Інституту фізіології рослин і генетики НАН України. Експлантатами слугували верхівки пагона 3-добових проростків, розмір яких варіював у межах 1,5—2,0 мм. Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3 %-м розчином NaOCl протягом 15 хв, чотири рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі МС 3 доби. Експлантати висаджували на поживне середовище МС, яке додатково містило *L*-аспарагін — 150 мг/л, AgNO<sub>3</sub> — 10 мг/л, 2,4-Д — 2 мг/л і культивували при 26 °С в темряві протягом двох тижнів. Потім калюси переносили на світло і далі вирощували за освітлення 3—4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду ще протягом двох тижнів. Сформовані таким чином калюси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>, ТДЗ або БАП у різних концентраціях: 0,1—1,5 мг/л (залежно від варіанта досліджу). Для контролю калюси висаджували на регенераційне середовище МС, що додатково містило 10 мг/л AgNO<sub>3</sub>, 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л ІОК, ефективність якого ми продемонстрували раніше [2]. Досліджували по 160 експлантатів (по 40 у чашці Петрі) за кожної концентрації ТДЗ і БАП. Частоту індукції морфогенного калюсу визначали на 21-шу добу культивування. Кількість пагонів, отриманих із калюсних культур, підраховували після 8 тижнів вирощування. Частоту регенерації рослин (у відсотках) визначали як співвідношення кількості експлантатів, які утворили рослини-регенеранти, до загальної кількості експлантатів.

Цитогенетичний аналіз калюсів і рослин-регенерантів здійснювали, виключаючи передфіксаційний вплив на мітоз. Тимчасові давлені препарати готували за стандартною методикою [3]. Частоту й типи хромосомних перебудов визначали паралельно з підрахунком числа хромосом у клітинах. Для вивчення рівня плоідності рослин-регенерантів і дослідження генетичної структури клітинних ліній використовували автоматичний аналізатор «Partec» (Німеччина).

## Результати та обговорення

Регенераційну здатність злаків часто пов'язують з появою в калюсній тканині щільних ділянок, утворених меристемоїдними клітинами, або морфогенних зон [5, 8, 10]. Ми досліджували вплив різних концентрацій ТДЗ і БАП на процеси морфогенезу калюсних культур пшениці. Препарати в поживне середовище добавляли в концентраціях 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 мг/л.

Після перенесення калюсів на світло (через 14 діб вирощування) на частині з них спостерігали появу щільних зелених ділянок. За подальшого культивування на регенераційному середовищі частина з калюсів формувала регенеранти. Морфогенний калюс утворювався в усіх варіантах досліджу, однак частота його формування була різною (рис. 1).

За концентрації ТДЗ у середовищі 0,25 мг/л частота утворення морфогенного калюсу була найбільшою і сягала 94 %. У варіантах із концентраціями ТДЗ 1,25 і 1,50 мг/л він практично не утворювався. У цих варіантах через 16—20 діб калюс переставав рости, утворювались некротичні зони, що в подальшому призводило до його загибелі. На відміну від середовищ із тидіазуроном на середовищах з БАП частота утворення

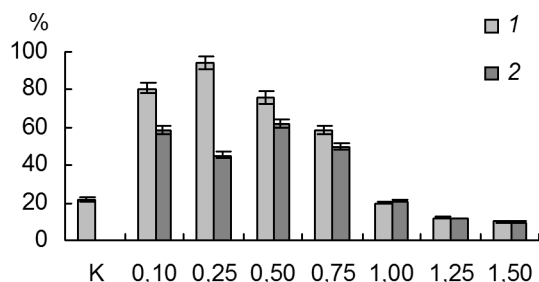


Рис. 1. Частота утворення морфогенного калюсу (%) на середовищах із різними концентраціями тидіазурону і бензиламінопурину. Тут і на рис. 2: на осі абсцис — концентрація ТДЗ і БАП, мг/л; 1 — ТДЗ; 2 — БАП; К — контроль

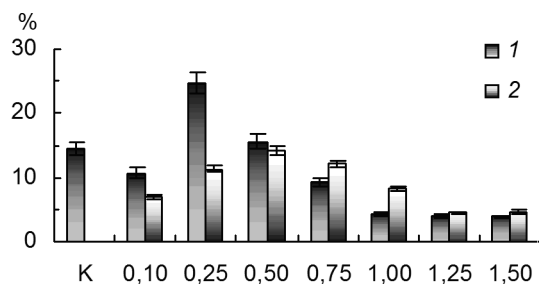


Рис. 2. Частота регенерації пагонів (%) на середовищах із різними концентраціями тидіазурону і бензиламінопурину

регенерації пагонів була нижчою порівняно з контролем (рис. 2). За високих доз ТДЗ (1,00; 1,25 та 1,50 мг/л) фізіологічний стан калюсів погіршувався, їх регенераційна здатність істотно знижувалась. Вірогідне збільшення регенераційної здатності виявлено за концентрації у поживному середовищі 0,25 мг/л ТДЗ. На відміну від середовищ із тидіазуроном на регенераційному середовищі з БАП максимальна частота регенерації пагонів не перевищувала 15 % і вірогідно не відрізнялася від контролю. Найефективнішою виявилась концентрація БАП 0,5 мг/л.

Чимало авторів схиляється до думки, що цитокініни не відіграють істотної ролі в соматичному ембріодогенезі більшості рослин. Однак за хімічною будовою їх поділяють на цитокініни аденінового типу (кінетин, зеатин, 6-бензиламінопурин) та фенілсечовинного типу (ТДЗ). Для індукції утворення ембріогенного калюсу здебільшого доцільно використовувати цитокініни аденінового типу. Разом з тим для індукції прямого соматичного ембріодогенезу й органогенезу з вегетативних і генеративних тканин дедалі частіше застосовують цитокініни фенілсечовинного типу, особливо стосовно тих видів рослин, які складно культивувати в умовах *in vitro*, до яких належать і злакові культури. Зокрема, багато авторів [6, 21, 24, 25] наводить приклади успішного використання ТДЗ для підвищення регенераційної здатності пшениці *in vitro*, що загалом підтверджують результати наших досліджень.

Хоча причина високої активності низьких концентрацій ТДЗ не вивчена на молекулярному рівні, припускається, що тидіазурон постійно знаходиться в рослинній тканині й, можливо, засвоюється подібно до того, як це відбувається у тканинах калюсу квасолі [17]. Автори встано-

морфогенного калюсу була максимальною за його концентрації 0,5 мг/л, але не перевищувала 60 %. Зі збільшенням вмісту цього цитокініну морфогенетичний потенціал калюсу поступово знижувався, також утворювались зони некрозу, що призводило до його загибелі на четвертому тижні культивування.

На регенераційному середовищі в калюсах виявлено такі шляхи морфогенезу: органогенез за типом геморизогенезу (формування бруньки і кореня), ризогенез (формування кореня), соматичний ембріодогенез (формування соматичних зародків). Пагони починали розвиватися з морфогенних зон після двох—трьох тижнів культивування.

За низького вмісту ТДЗ і БАП (0,10 мг/л) частота ре-

вили, що навіть тоді, коли калюс квасолі культивували в середовищі з  $^{14}\text{C}$ -тидіазуроном протягом 33 діб, більша частина мітки залишалась у молекулі ТДЗ. Частина ТДЗ у тканинах була гліколізована, можливо, щоб інактивувати накопичення. Малік і Саксена [16] припустили ключову роль ТДЗ у взаємодії з ендогенними гормонами в перепрограмуванні шляху морфогенезу від органогенезу до соматичного ембріогенезу через вивільнення, синтез, захист або навіть інгібування ауксинів *in situ* в комбінації з іншими субклітинними метаболічними змінами, особливо в ключовому регуляторному ферменті й зв'язаних білках.

Механізм дії, яким ТДЗ викликає цитокініноподібні ефекти, цілком не з'ясовано. Було висловлено думку, що ТДЗ сприяє перетворенню рибонуклеотидів на біологічно активніші рибонуклеозиди в тканинах калюсу квасолі [7]. Інші вчені гадають, що ТДЗ стимулює синтез ендогенного цитокініну аденінового типу або інгібує його деградацію в тканинах калюсу [22]. Нільсен та співавт. [18] запропонували модель дії цитокініну в клітинах рослин, подібну до гормональної системи тварин. Цитокініни як аденінового, так і фенілсечовинного типу можуть взаємодіяти з рецептором цитокінінзв'язувального білка (ЦЗБ). У ЦЗБ є дві різні ділянки зв'язування: одна природно зв'язує аденіноподібний цитокінін, інша — цитокініни фенілсечовинного типу. Зв'язування цитокініну аденінового типу з ЦЗБ так чи інакше викликає відомі цитокінінові ефекти формування пагонів. Екзогенний цитокінін аденінового типу підвищує ефект ендогенного цитокініну, що можна пояснити більшою кількістю на ЦЗБ ділянок для зв'язування цитокініну аденінового типу. Приєднання ТДЗ до ділянки ЦЗБ фенілсечовинного типу збільшує ефект ендогенного цитокініну аденінового типу, вже зв'язаного з цим білком. Припущення про існування двох обов'язкових ділянок на одному рецепторі пояснює, чому ефект тидіазурону вищий, ніж ефект цитокінінів аденінового типу. Врахувавши усе сказане, ми дослідили сумісний вплив ТДЗ і БАП на регенерацію пагонів. Для цього в середовище одночасно добавляли ТДЗ і БАП у концентраціях, які в проведених дослідженнях виявились оптимальними, тобто такими, що забезпечували найбільшу частоту регенерації пагонів. Згідно з отриманими результатами, сумісне застосування ТДЗ (0,25 мг/л) і БАП (0,5 мг/л) забезпечило вірогідне підвищення частоти регенерації пагонів (рис. 3), хоча цей факт ще потребує подальшого ретельного дослідження.

З метою вивчення особливостей дії тидіазурону на генетичну структуру популяцій калюсних клітин пшениці проведено цитологічний аналіз генетичної гетерогенності калюсних культур пшениці, які вирощували на контрольному середовищі й середовищі з тидіазуроном. Вірогідних відмінностей за хромосомним складом клітинних популяцій не виявлено (рис. 4). Аналізом числа хромосом у клітинах калюсів, досліджених протягом п'яти пасажів, підтверджено подібність цитогенетичних процесів, які відбувалися в них. Виявлено незначні відмінності, пов'язані з міжклітинними особливостями.

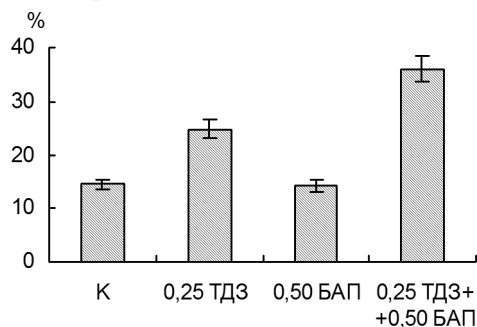


Рис. 3. Частота регенерації пагонів (%) на середовищах за сумісного застосування тидіазурону і бензіламінопурина (К — контроль)

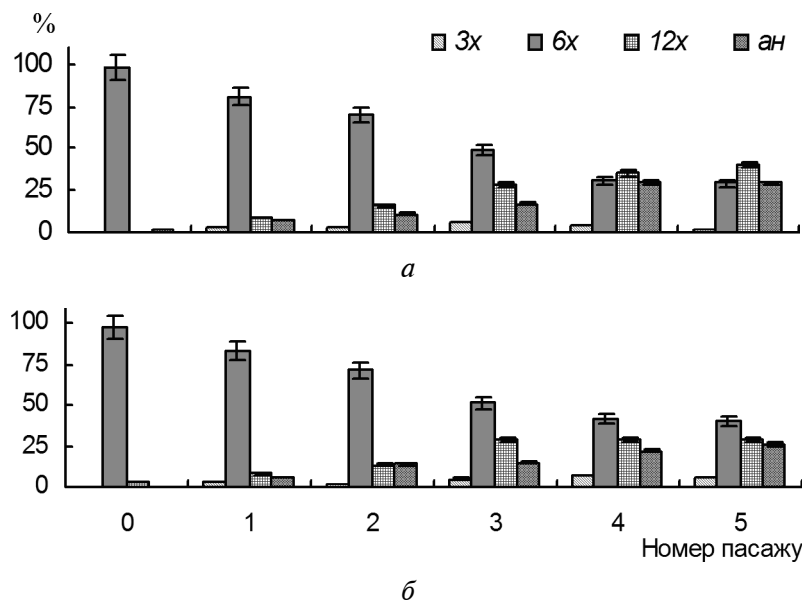


Рис. 4. Мінливість (%) генетичної структури клітинних популяцій калюсних культур пшениці на поживному середовищі з тидіазуроном (а) та контрольному середовищі (б): 3x — гаплоїдні клітини; 6x — диплоїдні; 12x — поліплоїдні; an — анеуплоїдні клітини

Ми також дослідили частоту і спектр структурних перебудов хромосом у клітинах калюсних культур м'якої пшениці, які вирощували на середовищі з тидіазуроном (0,25 мг/л). Динаміку частоти пошкоджень хромосом у процесі вирощування ілюструє рис. 5. Під час аналізу анафаз виявлено хромосомні й хроматидні мости, одиничні та парні фрагменти, що засвідчує перебіг мутаційного процесу, який призводить до порушення цілісності хромосом. Проте кількість таких клітин не перевищувала 5%. Частота аберацій вірогідно збільшувалась у всіх ліній, починаючи з 1—2-го пасажу, проте в 3-му пасажі стабілізувалась. Отже, цитогенетичним аналізом клітинних популяцій калюсних культур, вирощуваних на контрольному середовищі та середовищі з тидіазуроном, не виявлено вірогідних відмінностей за рівнем плідності клітин і частотою структурних перебудов хромосом.

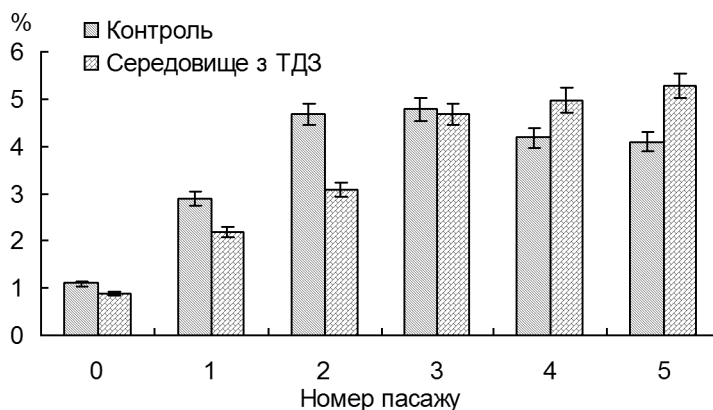


Рис. 5. Частота хромосомних аберацій (%) у клітинах калюсів на середовищі з тидіазуроном (0,25 мг/л)

Під час цитологічного дослідження регенерантів знайдено рослини різного рівня плоідності. Рослини з відмінним від гексаплоїдного набором хромосом ми виявили також методом проточної цитометрії, однак частота їх появи була дуже низькою і не залежала від наявності тидіазурону в поживному середовищі.

Отже, результати дослідження впливу ТДЗ на утворення морфогенного калюсу з експлантатів верхівки пагона проростків пшениці, ріст калюсних культур і пагоноутворення підтвердили, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ у середовищі. Встановлено, що ТДЗ здатний стимулювати утворення морфогенного калюсу й регенерацію пагонів м'якої пшениці за його концентрації 0,25 мг/л. У ході досліджень ми не виявили прямої залежності між частотою утворення морфогенного калюсу та частотою регенерації пагонів. Загалом доведено можливість регулювання морфогенезу пшениці змінами вмісту екзогенних цитокінінів. В експериментах вірогідного впливу тидіазурону на рівень плоідності клітин і частоту структурних перебудов хромосом у популяціях калюсних клітин пшениці не зафіксовано.

1. Анапияев Б.Б., Рсалиев Ш.Т., Сарбаев А.Т. Ускоренная селекция на устойчивость к биотическим факторам окружающей среды *Triticum aestivum* L. методом гаплоидной биотехнологии // Докл. Россельхозакадемии. — 2002. — № 4. — С. 15—17.
2. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1—2. — С. 3—10.
3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1988. — 280 с.
4. Abd Elaleem K.G., Modawi R.S., Khalafalla M.M. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant // Afr. J. Biotechnol. — 2009. — 8, N 11. — P. 2529—2534.
5. 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. — 11. — P. 39—43.
6. Birsin M., Ozgen M. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of Triticale (*Triticosecale* Wittmack) // Cell Mol. Biol. Lett. — 2004. — 9. — P. 353—361.
7. Capelle S.C., Mok D.W., Kirchner S.C., Mok M.C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and metabolism of N6-(2-isopentyl) [8-<sup>14</sup>C] in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. // Plant Physiol. — 1983. — 73. — P. 796—802.
8. Chen H., Xu G., Loschke D. et al. Efficient callus formation and plant regeneration from leaves of oats (*Avena sativa* L.) // Plant Cell Rep. — 1995. — 14, N 6. — P. 393—397.
9. El-Sayed O., Rizkalla A., Sabri S. In vitro mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat // Res. J. Agricult. Biol. Sci. — 2007. — 4, N 5. — P. 377—383.
10. 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, Tissue, Organ Cult. — 2003. — 73, N 2. — P. 147—157.
11. Fratini R., Ruiz M. Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.) // In vitro Cell Dev. Biol. Plant. — 2002. — 38. — P. 46—51.
12. Giridhar P., Kumar V., Indu E. et al. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* Pex Fr // Acta Bot. Croat. — 2004. — 63, N 1. — P. 25—33.
13. Haensch K.T. Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultivars of *Pelargonium × domesticum* and its histological analysis // Plant Cell Rep. — 2004. — 23, N 4. — P. 211—217.
14. Huettemane C.A., Preece J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. — 1993. — 33. — P. 105—119.
15. Husain M.K., Anis M., Shahzad A. In vitro propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron // Cell Dev. Biol. Plant. — 2007. — 43. — P. 59—64.
16. Malik K.A., Saxena P.K. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*) // Aust. J. Plant Physiol. — 1992. — 19. — P. 731—740.
17. Mok M.C., Mok W.C. The metabolism of [<sup>14</sup>C] thidiazuron in callus culture of *Phaseolus lunatus* // Physiol. Plant. — 1985. — 65. — P. 427—432.

18. *Nielsen J., Hansen J., Brandt K.* Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus × ogiformis* 'Giganthus' // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* — 1995. — **41**. — P. 165–170.
19. *Panaia M., Senaratna T., Dixon K.W., Sivasithamparam A.* The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the *Restionaceae* // *Austral. J. Bot.* — 2004. — **52**. — P. 257–265.
20. *Patnaik D., Khurana P.* Wheat biotechnology: A minireview plant biotechnology // *Electronic J. Biotech.* — 2001. — **4**. — P. 74–102.
21. *Sharma V., Hansch R., Mendel J.* Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with longterm retention of morphogenicity using meristematic shoot segments // *Plant Breed.* — 2005. — **124**, N 3. — P. 242–246.
22. *Thomas J.C., Katterman F.R.* Cytokinin activity induced by thidiazuron // *Plant Physiol.* — 1986. — **81**. — P. 681–683.
23. *Thomas T.D., Puthur J.T.* Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L. // *Bot. Bull. Acad. Sin.* — 2004. — **45**. — P. 307–313.
24. *Xueyan S., Desen L., Rongda Q.* Thidiazuron promotes in vitro regeneration of wheat and barley // *In vitro Cell Dev. Biol.* — 2000. — **36**, N 3. — P. 207–210.
25. *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 // *Proc. of the Balkan Sci. Conf. of Biol.* — 2005. — P. 192–201.

Отримано 18.10.2010

#### ВЛИЯНИЕ ТИДИАЗУРОНА НА ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

*А.В. Бавол, О.В. Дубровная, И.И. Лялько, М.А. Зинченко*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовано влияние синтетического фитогормона — тидиазурона (ТДЗ) на образование морфогенного каллуса из эксплантатов верхушки побега проростков пшеницы и регенерацию побегов. Установлено, что процессы морфогенеза зависят от концентрации ТДЗ в питательной среде. ТДЗ концентрацией 0,25 мг/л стимулирует образование морфогенного каллуса и регенерацию побегов мягкой пшеницы.

#### THE INFLUENCE OF THIDIAZURON ON PROCESSES OF MORPHOGENESIS IN CULTURE IN VITRO OF BREAD WHEAT

*A.V. Baval, O.V. Dubrovna, I.I. Lyalko, M.O. Zinchenko*

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

Influence of the synthetic phytohormone thidiazuron (TDZ) on formation of morphogenic callus from explants of shoot apex of wheat seedlings and shoots regeneration has been investigated. It is shown, that processes of morphogenesis are depended on TDZ concentration in a nutrient medium. TDZ stimulated formation of morphogenic callus and regeneration of wheat shoots in concentration of 0.25 mg/l.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., thidiazuron, callusogenesis, shoots regeneration.