

И.В. ТАНАСИЕНКО, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев
E-mail: alyemets@univ.kiev.ua

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ЯРОВЫХ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ, РАЙОНИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ



Восемь коммерческих сортов ярового ячменя *Hordeum vulgare* отечественной и зарубежной селекции (Гетьман, Табора, Адажио, Галактик, Европрестиж, Корона, Невада, Сталкер) были использованы для введения в культуру *in vitro* и разработки эффективного протокола индукции каллусообразования и регенерации растений. Для этого в качестве эксплантов использовали зрелые зародыши семян упомянутых генотипов. Индукцию образования каллуса, пассаж культур и регенерацию растений проводили на среде, содержащей соли Мурасиге и Скуга [22], гидролизат казеина (1 г/л), L-пролин (690 мг/л), тиамин-НСI (1 мг/л), мальтозу (30 г/л), миоинозитол (250 мг/л), джелрайт (3,5 г/л), 2,4-Д (2 мг/л), CuSO_4 (12,5 мг/л), рН 5,6–5,8. Способность к каллусообразованию наблюдали у всех изученных генотипов, показатели частоты каллусогенеза варьировали в пределах от $65 \pm 3,4$ до 100 %. К сортам с высоким уровнем каллусообразования были отнесены сорта Корона ($88 \pm 2,8$ %), Европрестиж ($89 \pm 6,5$ %), Табора ($93 \pm 3,4$ %), Гетьман ($99 \pm 0,8$ %) и Невада (100 %). Регенерация растений из каллуса у всех сортов происходила путем органогенеза и соматического эмбриогенеза. Самый высокий суммарный показатель частоты регенерации растений был характерен для сорта Гетьман (50 ± 5 %), который отобран нами для дальнейшей работы по разработке эффективных методов генетической трансформации.

© И.В. ТАНАСИЕНКО, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2009

Введение. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) – одна из четырех наиболее важных злаковых культур в мире после кукурузы (*Zea mays* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и риса (*Oryza sativa* L.) [1]. Около 15 % мирового ежегодного урожая ячменя употребляется в пищу, а также идет на изготовление солода и пива [2, 3]. Кроме того, наряду с другими зерновыми культурами и сахарным тростником ячмень может использоваться для производства возобновляемого биотоплива, а также для синтеза рекомбинантных белков [3]. Зерна ячменя запасают большое количество белка (15 % общего веса), а в зрелом виде обеспечивают идеальные условия для хранения таких белков на протяжении 5–10 лет [3], поэтому их можно использовать для получения рекомбинантных белков.

В сравнении с другими зерновыми культурами ячмень имеет значительно более широкое географическое распространение и является особенно важным злаком в Северной Америке, Европе и Австралии (<http://barleyworld.org/>; <http://oregonstate.edu/instruct/css/330/five/BarleyOverview.htm>). В 2007 г. на территории Украины яровыми сортами ячменя была засеяна площадь в 4124,5 тыс. га (<http://www.minagro.gov.ua/page/?n=4266>). Именно этими факторами обуславливается постоянно возрастающий интерес к развитию современных методов молекулярной селекции этого вида зерновых культур [2]. В последние годы успешно развивается проект по исследованию генома ячменя (<http://barleyworld.org/northamericanbarley.php>). За последние десятилетия достигнут огромный прогресс в развитии методов трансформации ячменя и получения его трансгенных линий с заданными свойствами [4–6].

Однако несмотря на то, что ячмень представляет собой перспективную модель для развития и усовершенствования методов генетической инженерии, трансформация его сопряжена с некоторыми сложностями. Одним из главных условий получения большого количества генетически модифицированных злаков является разработка эффективного протокола регенерации растений [7]. У ячменя эффективность каллусогенеза и регенерации во многом зависит от исходного генотипа растения-донора [8] и в особенности от используемого типа экспланта – апикальной меристемы [9], незрелых зародышей [10–13], зрелых зародышей [14, 15], проростков [16].

Из всех типов эксплантов ячменя наиболее часто для эффективной регенерации используют незрелые зародыши [13, 17, 18], которые характеризуются высокой эффективностью каллусообразования [10, 11, 13]. Тем не менее сравнение различных данных позволяет сделать вывод о том, что эффективность каллусообразования и регенерации побегов у зрелых и незрелых зародышей ячменя мало отличается, но работа с незрелыми зародышами сопряжена с определенными трудностями. Так, незрелые зародыши сложно получать на протяжении всего года, а необходимая для успешного культивирования *in vitro* стадия развития зародыша строго лимитирована во времени [19]. Использование же зрелых зародышей для индукции каллусообразования и регенерации растений обладает определенными преимуществами: упрощенное культивирование ткани, полученной из зрелых зародышей, и доступность материала на протяжении года в большом количестве [14].

Большинство исследователей разрабатывали системы индукции каллусогенеза и регенерации растений ячменя для таких, например, модельных сортов, как Golden Promise, Igrі, обладающих высоким регенерационным потенциалом, но не представляющих большого интереса для сельского хозяйства [20, 21]. Поэтому целью настоящего исследования было введение в культуру *in vitro* различных яровых сортов ячменя отечественной и зарубежной селекции, районированных на территории Украины, которые могут эффективно использоваться для выращивания в зонах Полесья, Лесостепи и Степи, а также разработка эффективного протокола их регенерации для последующей генетической трансформации наиболее перспективных генотипов.

Материалы и методы. В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши семян ячменя сортов Гетьман, Тавора, Адажио, Галактик, Европрестиж, Корона, Невада, Сталкер, любезно предоставленных сотрудниками Института земледелия УААН. Для размягчения оболочки зрелых семян их предварительно выдерживали в 50%-ном растворе серной кислоты на протяжении 30 мин. После отмывания семена обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом в течение 1 мин. Стерилизацию проводили в

0,5%-ном гипохлориде на протяжении 30 мин с последующим четырехразовым отмыванием в стерильной дистиллированной воде. Затем семена оставляли в воде на 12 ч для набухания, далее зрелые зародыши отделяли от эндосперма с помощью пинцета и скальпеля.

Для индукции каллусогенеза зародыши помещали на среду, содержащую соли Мурасиге и Скуга [22], гидролизат казеина (1 г/л), L-пролин (690 мг/л), тиамин-НСІ (1 мг/л), мальтозу (30 г/л), миоинозитол (250 мг/л), джелрайт (3,5 г/л), 2,4-Д (2 мг/л), CuSO_4 (12,5 мг/л), рН 5,6–5,8. Экспланты культивировали на рассеянном свете при температуре 24–26 °С и 16-часовом фотопериоде. Частоту индукции каллусообразования для всех сортов определяли как соотношение количества эксплантов, продуцирующих каллус, к общему количеству высаженных эксплантов. Частоту образования каллуса I типа определяли как соотношение количества эксплантов, на которых происходило образование первичного каллуса, к общему количеству высаженных эксплантов. Аналогичным образом определяли частоту формирования каллуса II типа: в виде соотношения количества эксплантов, на которых происходило формирование этого типа каллуса, к общему количеству эксплантов.

Пассажи каллусных культур проводили каждые 3–4 нед до начала индукции регенерации растений, которая наблюдалась на упомянутой среде на 50–60-е сутки культивирования каллуса. Поскольку регенерация происходила двумя путями (органогенез и соматический эмбриогенез), то оценивали частоты образования как побегов без корней, так и частоту регенерации растений, формирующих в культуре четкую ось «побег – корень». Частоту регенерации побегов определяли как соотношение количества регенерировавших побегов без корней к общему количеству высаженных эксплантов ячменя. После того как регенеранты достигали размеров 4–5 см в длину, их высаживали для дальнейшего укоренения на ту же питательную среду, но без 2,4-Д. Частоту регенерации полноценных растений определяли сходным образом. В экспериментах использовали по 100 эксплантов каждого сорта. Впоследствии растения-регенеранты размером 7–8 см переносили в стерильную почву

и выращивали в условиях повышенной влажности для дальнейших морфологических анализов.

Корни растений, регенерировавших в культуре *in vitro*, фиксировали как описано нами ранее [23]. Окрашивание клеток ацетоорсеином (в течение 2 сут) проводили также согласно описанному нами методу [23]. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом («Carl Zeiss», Германия).

Полученные данные статистически обрабатывали согласно методу Лакина [24].

Результаты исследований и их обсуждение. У всех сортов ячменя, используемых в работе (Гетьман, Табора, Адажио, Галактик, Европрестиж, Корона, Невада и Сталкер), наблюдали формирование каллуса из зрелых зародышей после введения в культуру *in vitro* (рис. 1, см. вклейку в конце номера). После высадки эксплантов на питательную среду для индукции каллусообразования, как правило, на 3-и сутки происходило сначала прорастание зародыша, после чего его отделяли от щитка и продолжали дальше культивирование на той же среде. Интенсивное образование каллуса происходило на раневой поверхности тканей зародыша спустя 4–6 сут, т.е. на 7–9-е сутки после высадки эксплантов. Эти данные полностью соответствуют полученным ранее результатам по индукции каллусообразования у зрелых зародышей четырех сортов ячменя болгарской селекции – Ruen, Emon, PV 101, Panagon [19].

В наших экспериментах показатели частоты каллусообразования у высаженных эксплантов восьми генотипов варьировали в пределах от $65 \pm 3,4$ до 100 % (таблица). Так, к сортам с высоким уровнем каллусообразования отнесены сорта Корона ($88 \pm 2,8$ %), Европрестиж ($89 \pm 6,5$ %), Табора ($93 \pm 3,4$ %), Гетьман ($99 \pm 0,8$ %) и Невада (100 %). Незначительно ниже частота каллусообразования была у сорта Сталкер ($75 \pm 7,5$ %) и самая низкая характерна для сорта Галактик ($65 \pm 3,4$ %). Сходные данные по частоте каллусообразования из зрелых зародышей ячменя (от $75,4 \pm 1,2$ % до $97,3 \pm 0,23$ %) получены и болгарскими коллегами [19].

Каллус, формируемый зрелыми зародышами, фенотипически разделяли на две морфологические категории: каллус I типа – водянистый, неморфогенный; каллус II типа – компактный, структурированный, кремового цвета (рис. 1 и таблица). Вначале на эксплантах всех сортов шло формирование каллуса I типа, который при дальнейшем культивировании либо так и оставался первичным каллусом, либо преобразовывался в каллус II типа. Частота формирования каллуса I типа у исследуемых генотипов ячменя, который в процессе культивирования *in vitro* не менял своей структуры, составляла, как было установлено, $30 \pm 5,9$ – $65 \pm 9,1$ % (таблица). Для первичного неморфогенного каллуса была характерна низкая интенсивность деления клеток, что приводило в дальнейшем к его медленному развитию и частичному отмиранию, хотя в не-

Особенности каллусообразования и регенерации растений исследуемых сортов ячменя

Сорт	Частота индукции каллусообразования	Образование разных типов каллуса при культивировании		Частота образования каллуса с корнями	Частота регенерации		
		I	II		побегов путем органогенеза	растений путем эмбриогенеза	суммарный показатель
Табора	$93 \pm 3,4$	$43 \pm 9,1$	$50 \pm 5,7$	$3 \pm 0,38$	$28 \pm 6,3$	$18 \pm 4,6$	$46 \pm 10,9$
Сталкер	$75 \pm 7,5$	$64 \pm 6,3$	$12 \pm 0,6$	$1 \pm 0,8$	$8 \pm 1,2$	$4 \pm 0,0$	$12 \pm 1,2$
Корона	$88 \pm 2,8$	$44 \pm 13,8$	$44 \pm 11,0$	$2 \pm 1,4$	$15 \pm 8,3$	$2 \pm 1,4$	$17 \pm 9,7$
Галактик	$65 \pm 3,4$	$50 \pm 3,2$	$16 \pm 3,2$	$10 \pm 2,3$	$3 \pm 1,8$	$3 \pm 2,8$	$6 \pm 4,6$
Европрестиж	$89 \pm 6,5$	$30 \pm 5,9$	$60 \pm 7,8$	$7 \pm 5,0$	$11 \pm 2,6$	$9 \pm 3,2$	$20 \pm 5,8$
Невада	$100 \pm 0,0$	$65 \pm 9,1$	$35 \pm 6,3$	$8 \pm 1,6$	$17 \pm 6,5$	$14 \pm 3,8$	$31 \pm 10,3$
Адажио	$82 \pm 1,6$	$57 \pm 2,6$	$25 \pm 2,2$	–	$18 \pm 2,6$	$10 \pm 1,6$	$28 \pm 4,2$
Гетьман	$99 \pm 0,8$	$42 \pm 6,3$	$57 \pm 7,5$	$2 \pm 1,2$	$46 \pm 3,8$	$4 \pm 1,2$	$50 \pm 5,0$

которых случаях показано, что именно такой тип каллуса у ячменя развивается и растет намного быстрее, чем структурированный [19].

Для каллуса II типа в культуре было характерно наличие белых плотных, компактных структур, которые, как правило, являются индикатором соматического эмбриогенеза, а также зеленых почек, из которых в дальнейшем развивались растения-регенеранты. Частота формирования такого типа каллуса у исследуемых сортов ячменя варьировала в пределах от $12 \pm 0,6$ % (для сорта Сталкер) до $60 \pm 7,8$ % (для сорта Европрестиж) (таблица). Полученные нами данные сопоставимы с результатами немецких исследователей, которые изучали частоту индукции образования первичного и эмбриогенного каллуса из зрелых зародышей восьми коммерческих сортов ячменя и модельного сорта Golden Promise [25]. Ими было показано, что первичный каллус образовывался с частотой от $41,3 \pm 7,5$ до $74,6 \pm 4,9$ %, а эмбриогенный каллус возникал с частотой от $22,3 \pm 4,1$ до $55,1 \pm 2,1$ % [25], хотя ранее ряд авторов были менее успешны в экспериментах по индукции первичного и эмбриогенного типов каллуса из зрелых зародышей ячменя [14, 26]. Так, например, Lupotto [26], работая только с одним сортом ячменя – Maxima, получил оба типа каллуса из зрелых зародышей, из которых первичный каллус не способен был продуцировать какие-либо регенеранты, и только из структурированного каллуса удалось регенерировать всего лишь два растения. Akula et al. [14] также наблюдали формирование каллусных тканей I типа из зрелых зародышей девяти сортов ячменя в пределах 80–95 %, но только у четырех сортов происходило формирование плотного, структурированного каллуса II типа, в то время как все изученные в нашей работе сорта были способны к образованию каллуса этого типа.

Для структурированного каллуса также характерна высокая интенсивность пролиферации клеток, а у таких сортов, как Галактик и Сталкер, каллус нарастал очень высокими темпами (рис. 2, см. вклейку в конце номера). Однако, как было установлено позже, для этих двух генотипов высокая интенсивность деления клеток структурированного каллуса не

коррелировала впоследствии с высокой частотой регенерации растений (таблица). Хотя раньше и было показано, что только низкий уровень образования каллусной ткани является одной из ключевых причин низкого регенерационного потенциала генотипов ячменя [27], интенсивность деления и роста клеток каллусной ткани у сортов Невада и Гетьман находилась на среднем уровне по сравнению с Галактик и Сталкер.

Регенерация растений из каллуса ячменя. Как отмечалось нами ранее, использование в качестве эксплантов зрелых зародышей ячменя позволяет интенсифицировать работу по введению в культуру *in vitro*, каллусообразованию и регенерации растений этого вида злаковых. И хотя впервые индукция каллуса из этого типа эксплантов описана уже очень давно [28], проблема регенерации растений ячменя в культуре *in vitro* путем либо органогенеза [14, 26, 29, 30], либо соматического эмбриогенеза [31] оставалась длительное время достаточно острой из-за крайне низкой частоты регенерации. В нашем случае правильный подбор условий и питательных сред позволил получить растения-регенеранты у всех исследуемых коммерческих генотипов (таблица). Более того, при длительном пассировании прямую регенерацию наблюдали даже в культуре каллуса I типа, что может не всегда достигаться в работе с ячменем [26].

Наиболее интенсивно регенерация растений всех исследуемых генотипов шла в каллусе II типа. Появление такого плотного структурированного каллуса с ярко-зелеными глобулярными участками происходило через 1–1,5 мес после начала культивирования эксплантов. Регенерационную способность у злаковых культур часто связывают с появлением в каллусной ткани именно этих плотных участков, образованных мелкими меристематическими клетками [32]. Однако нами отмечено, что при последующем культивировании часть из них была способна к формированию растений-регенерантов, тогда как остальная прекращала дифференцировку, темнела и впоследствии погибала.

В нашем случае регенерация растений на одной и той же питательной среде могла происходить как путем органогенеза, так и сома-

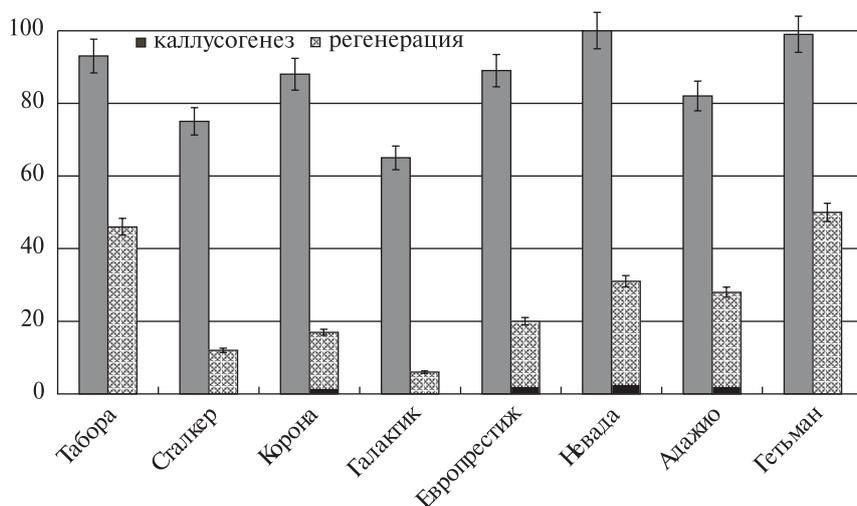


Рис. 3. Эффективность каллусогенеза и регенерации растений (по вертикали) яровых сортов ячменя *H. vulgare* (по горизонтали)

тического эмбриогенеза. Частота регенерации путем органогенеза составляла от $3 \pm 1,8 \%$ (сорт Галактик) до $46 \pm 3,8 \%$ (сорт Гетьман) (таблица). Все образовавшиеся побеги в дальнейшем были способны к укоренению на безгормональной среде. Частота образования растений путем соматического эмбриогенеза находилась в пределах от $2 \pm 1,4 \%$ (сорт Корона) до $18 \pm 4,6 \%$ (сорт Табора). Растения-регенеранты развивались в культуре эмбриогенного каллуса уже с корнями и не требовали дальнейшей дополнительной пересадки на безгормональную среду.

Суммируя показатели по частоте регенерации растений путем органогенеза и соматического эмбриогенеза, необходимо отметить, что самой высокой способностью к регенерации характеризовались сорта Табора ($49 \pm 10,9 \%$) и Гетьман ($50 \pm 5 \%$). Формирование растений-регенерантов у них можно было наблюдать уже через 3–4 нед после каллусообразования. Следовательно, регенерация этих сортов начиналась через 1,5–2 мес после высадки эксплантов на среду. Несмотря на высокую степень индукции эксплантами сорта Европрестиж плотного структурированного каллуса II типа ($60 \pm 7,8 \%$), регенерация растений была у него на среднем уровне ($20 \pm 5,8 \%$) (таблица). У сорта Гетьман наряду с высокой частотой формирования каллусов как I ($42 \pm 6,3 \%$), так и II типа ($57 \pm 7,5 \%$), регенерация растений шла в основном путем органогенеза ($46 \pm 3,8 \%$) (таблица). Для сорта Табора, у которо-

го были высокими показатели частоты образования каллуса как I ($43 \pm 9,1 \%$), так и II типа ($50 \pm 5,7 \%$), частота регенерации путем органогенеза составляла $28 \pm 6,3 \%$, а путем соматического эмбриогенеза – $18 \pm 4,6 \%$. Для всех сортов, кроме сорта Галактик, характерным было преобладание регенерации растений путем органогенеза (таблица). Наибольшей регенерационной способностью обладали сорта Табора и Гетьман (рис. 3). Высокие показатели регенерации также были характерны для сортов Корона, Европрестиж, Адажио и Невада. Только для двух остальных генотипов – Галактик и Сталкер – частота регенерации растений была на более низком уровне. Причиной этого, вероятней всего, является низкая способность к формированию каллуса II типа этими сортами.

В одной из наиболее ранних работ, посвященных исследованию влияния различных концентраций 2,4-Д на процессы каллусообразования и регенерации, показано, что эффективность регенерации растений из зрелых зародышей ярового сорта Maxima составляет всего лишь $1,2 \%$ [26]. Другой группе авторов удалось регенерировать побеги из каллуса, индуцированного из зрелых зародышей, только у 14 генотипов из 203 протестированных [29]. К сожалению, в этой работе не был представлен протокол регенерации растений. Akula et al. [14] получили регенерацию растений из зрелых зародышей только у трех сортов ячменя из девяти, взятых для экспериментов. В этой

работе продемонстрировано, что эффективность формирования побегов составляла 49 % для сорта Tallon, 57 % для сорта Grimmitt, 60 % для сорта Sloop. Наши данные хорошо сопоставимы с ранее полученными на болгарских сортах ячменя результатами, которые свидетельствуют о том, что именно зрелые зародыши являются наиболее подходящим материалом для подобного рода манипуляций в культуре *in vitro* по сравнению с незрелыми зародышами и способны продуцировать с высокой частотой растения-регенеранты (способность к регенерации эмбрионного каллуса для всех сортов составляла $49 \pm 1,20 - 70,2 \pm 0,59$ %; эффективность регенерации – от $5,4 \pm 0,84$ до $1,3 \pm 0,39$ % на эмбриокультуру) [19].

Необходимо отметить, что в нашем случае для эффективной и успешной индукции каллусообразования и последующей регенерации путем органогенеза или соматического эмбриогенеза у восьми коммерческих сортов ячменя достаточно было использовать одну питательную среду. Только в случае регенерации побегов путем органогенеза для последующего их укоренения использовали среду того же состава, но лишенную фитогормонов. В то же время в работе Adumhadi et al. [19], где описан успешный метод индукции каллуса и регенерации растений ячменя, предполагалось использование нескольких сред: одной – непосредственно для каллусообразования, другой – для регенерации побегов и третьей – для их дальнейшего укоренения.

Эффективность регенерации растений ячменя в культуре *in vitro* также значительно может снижаться за счет появления хлорофилл-дефектных регенерантов. Появление подобных растений отмечали многие авторы при использовании в качестве первичных эксплантов незрелых зародышей [13, 17, 33, 34]. В ряде случаев в таких работах процент хлорофилл-дефектных регенерантов составлял от 1 [17] до 22,8 % [34] общего количества регенерантов. Однако ни в нашем исследовании, ни в других работах, где в качестве эксплантов использовались зрелые зародыши, вообще не наблюдали появления хлорофилл-дефектных растений на протяжении всего периода культивирования *in vitro*.

Наряду с полноценными растениями, имеющими листья и корни, в каллусной культуре

всех сортов, за исключением сорта Адажио, наблюдали образование корней без развития побегов (таблица). Самая высокая частота ризогенеза отмечена для сортов Невада ($8 \pm 1,6$ %) и Галактик ($10 \pm 2,3$ %). Возможно для такого сорта, как Галактик, который был менее пластичным по сравнению с другими сортами при заданных нами условиях культивирования, необходимо подбирать индивидуально условия и состав сред как для успешного каллусообразования, так и для эффективной регенерации растений.

Различалась и скорость развития регенерировавших растений ячменя. Несмотря на низкий показатель частоты регенерации у сорта Галактик, его растения отличались высокой интенсивностью развития. Так же хорошо и быстро развивались в культуре растения-регенеранты сорта Гетьман, обладающего наивысшим показателем регенерации растений (рис. 3). У сорта Невада, наоборот, при среднем показателе частоты регенерации рост и развитие растений шли очень медленно по сравнению с остальными сортами. Регенеранты, которые успешно образовывали корни и достигали размеров примерно 7–8 см, переносили в дальнейшем в стерильную почву и выращивали в условиях повышенной влажности. Растения, прошедшие этап адаптации, высаживали впоследствии в открытый грунт для проведения дальнейших морфологических анализов.

Поскольку сорт Гетьман использовали как один из наиболее перспективных генотипов для последующих экспериментов по развитию и усовершенствованию методов генетической трансформации, нами дополнительно проведен цитогенетический анализ клеток апикальной меристемы корней его регенерировавших растений для установления наличия или отсутствия цитогенетических нарушений (анеу-, полиплоидия и др.), которые могут возникать в процессе культивирования тканей ячменя в условиях *in vitro* [26] и зависеть от продолжительности пассирования каллуса в культуре [35]. Нами установлено, что клетки корней всех тестируемых растений-регенерантов содержат диплоидный ($2n = 14$) набор хромосом. Аналогичные данные были получены ранее [26], где также показано, что, невзирая на значительную вариабельность в ploидности (анеу-

и тетраплоидия) клеток каллуса, индуцированного из зрелых зародышей, диплоидный статус все же превалировал как в клетках самого каллуса, так и был характерен для клеток всех регенерировавших растений.

Таким образом, в результате проведенной работы в культуру *in vitro* введены восемь коммерческих сортов ярового ячменя (*H. vulgare*), районированных на территории Украины. Разработан эффективный протокол для индукции каллусообразования и регенерации из зрелых зародышей ячменя, а также выделены генотипы с высокой частотой каллусообразования и регенерации растений. Для наиболее перспективного сорта Гетьман, который отобран нами для дальнейшей работы по разработке эффективных методов генетической трансформации, проведен цитогенетический анализ клеток корневой меристемы всех его растений-регенерантов и установлено, что все растения являются морфогенетически нормальными и содержат диплоидный набор хромосом, характерный для родительского генома ($2n = 14$).

I.V. Tanasienko, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

ESTIMATION OF THE EFFICIENCY OF CALLUS FORMATION AND REGENERATION IN BARLEY SPRING VARIETIES ZONED IN UKRAINE

The data on *in vitro* culture establishment and on estimation of callus formation and plant regeneration for eight barley *Hordeum vulgare* varieties (Getman, Tabora, Adagio, Galactic, Europrestige, Corona, Nevada and Stalker) zoned in Ukraine is represented. Mature embryos of these genotypes were used to study the callus induction and plant regeneration. Using of this approach can rather simplify and intensify the work. Medium, that consists of MS salts supplemented with caseine hydrolysate (1 g/L), L-proline (690 mg/L), thiamine-HCl (1 mg/L), maltose (30 g/L), 2,4-D (2 mg/L), CuSO₄ (12.5 mg/L), myoinositol (250 mg/l), gerlite (3.5 g/L) pH 5,6–5,8 was used for both callus formation and plant regeneration. Formation of callus from mature embryos was observed in all studied varieties and showed high frequency (from 65 ± 3,4 % to 100 %). It was found that cultivars Corona (88 ± 2,8 %), Europrestige (89 ± 6,5 %), Tabora (93 ± 3,4 %), Getman (99 ± 0,8 %) and Nevada (100 %) had the highest regeneration potential. Organogenesis and somatic embryogenesis were the two ways of plant regeneration from callus tissues in barley. The highest general regeneration potential of cultivar Getman (50 ± 5 %) was observed. This cultivar was selected for the further work for development of effective genetic transformation protocol.

I.V. Tanasienko, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ КАЛУСОУТВОРЕННЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ ЯРИХ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ, РАЙОНОВАНИХ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Вісім комерційних сортів ярого ячменю *Hordeum vulgare* вітчизняної та зарубіжної селекції (Гетьман, Табора, Адажіо, Галактик, Європрестиж, Корона, Невада, Сталкер) були використані для введення в культуру *in vitro* та розробки ефективного протоколу індукції калусоутворення та регенерації рослин. Для цього як експланти використовували зрілі зародки насіння даних генотипів. Індукцію утворення калуса, пасаж культур і регенерацію рослин проводили на середовищі, яке містило солі Мурасиге і Скута [22], гідролізат казеїну (1 г/л), L-пролін (690 мг/л), тіамін-НСІ (1 мг/л), мальтозу (30 г/л), міоїнозитол (250 мг/л), джелрайт (3,5 г/л), 2,4-Д (2 мг/л), CuSO₄ (12,5 мг/л), рН 5,6–5,8. Здатність до калусоутворення спостерігали у всіх вивчених генотипах, показники частоти калусогенезу коливались від 65 ± 3,4 до 100 %. До сортів із високим рівнем калусоутворення відносили сорти Корона (88 ± 2,8 %), Європрестиж (89 ± 6,5 %), Табора (93 ± 3,4 %), Гетьман (99 ± 0,8 %) і Невада (100 %). Регенерація рослин із калуса у всіх сортів здійснювалась шляхом органогенезу та соматичного ембріогенезу. Найвищий загальний показник частоти регенерації рослин характерний для сорта Гетьман (50 ± 5 %). Цей сорт було відібрано нами для подальшої роботи із розробки ефективних методів генетичної трансформації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dahleen L.S., Manoharan M. Recent advances in barley transformation // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2007. – **43**. – P. 493–506.
2. Jacobsen J., Venables I., Wang M.B., Matthews P., Ayliffe M., Gubler F. Barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Meth. Mol. Biol.* – 2006. – **343**. – P. 171–183.
3. Ritala A., Wahlstrom E., Holkeri H., Malkelainrn K., Baez J., Makinen K., Nuutila A. Production of recombinant industrial protein using barley cell cultures // *Protein Exp. Purif.* – 2008. – **59**. – P. 274–281.
4. Dunwell J.M. Transgenic wheat, barley and oats: future prospects // *Meth. Mol. Biol.* – 2009. – **478**. – P. 333–345.
5. Lazzeri P.A., Jones H.D. Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization // *Meth. Mol. Biol.* – 2009. – **478**. – P. 3–20.
6. Shrawat A.K., Lörz H. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals a promising approach crossing barriers // *Plant Biotech. J.* – 2006. – **4**. – P. 575–603.
7. Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L.B., Cheng K.J. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile

- green cereal plants // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 2003. — **73**. — P. 147–157.
8. Bregitzer P. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium // Crop Sci. — 1992. — **32**. — P. 1108–1112.
 9. Wigel R., Hughes K. Long-term regeneration by somatic embryogenesis in barley (*Hordeum vulgare*) // Plant Cell Tiss. Organ Cult. — 1985. — **5**. — P. 151–162.
 10. Чернобровкина М.А., Караваев Ч.А., Харченко П.Н., Мелик-Саркисов О.С. Соматический эмбриогенез и морфогенный потенциал ярового ячменя *Hordeum vulgare* L.) в системе технологического процесса генетической трансформации // Изв. РАН. Биология. — 2004. — **31**(4). — С. 404–409.
 11. Šerhantová V., Ehrenbergerová J., Ohnoutková L. Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic // Plant Soil Environ. — 2004. — **50**. — P. 456–462.
 12. Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Sci. — 2006. — **172**. — P. 281–290.
 13. Tiidema A., Truve E. Efficient regeneration of fertile barley plants from callus cultures of several Nordic cultivars // Hereditas. — 2004. — **140**. — P. 171–176.
 14. Akula C., Akula A., Henry R. Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars // Biol. Plant. — 1999. — **42**. — P. 505–513.
 15. Zapata J.M., Sabater B., Martin M. Callus induction and *in vitro* regeneration from barley mature embryos // Biol. Plant. — 2004. — **48**(3). — P. 473–476.
 16. Vitanova Z., Vitanov V., Trifonova A., Savova D., Atanassov A. Effect of 2,4-D precultivation on regeneration capacity of cultivated barley // Plant Cell Rep. — 1995. — **14**. — P. 437–441.
 17. Dahleen L.S., Bregitzer P. An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars // Crop Sci. — 2002. — **42**. — P. 934–938.
 18. Cheng M., Hu T., Layton J., Liu C.N., Fry J. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 2003. — **39**. — P. 595–604.
 19. Abumhadi N., Kamenarova K., Todorovska E., Dimov G., Trifonova A., Gecheff K., Atanassov A. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordeum vulgare* L.) // Biotech. Biotechnol. Eq. — 2005. — **19**. — P. 32–38.
 20. Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation // Plant J. — 1997. — **11**. — P. 1369–1376.
 21. Wan Y., Lemaux P.G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plant // Plant Physiol. — 1994. — **104**. — P. 37–48.
 22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473–497.
 23. Yemets A., Stelmakh O., Kundelchuk O., Blume Ya.B. Obtaining and analysis of isopropyl-N-phenyl carbamate resistant line of *Nicotiana* species // Cell. Biol. Int. — 2003. — **27**. — P. 307–310.
 24. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
 25. Sharma V.K., Hänsch R., Mendel R.R., Schulze J. Mature embryo axis-based high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from multiple cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) // J. Exp. Bot. — 2005. — **417**. — P. 1913–1922.
 26. Lupotto E. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos // Ann. Bot. — 1984. — **54**. — P. 523–529.
 27. Jiang W., Cho M.J., Lemaux P.G. Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars // Plant Biotechnol. — 1998. — **15**. — P. 63–69.
 28. Bayliss M.W., Dunn S.D.M. Factors affecting callus formation from embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Sci. Lett. — 1979. — **14**. — P. 311–316.
 29. Taniguchi M., Enomoto S., Komatsuda, Varietal difference in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (*Hordeum vulgare*) // J. Breed. — 1991. — **41**. — P. 571–579.
 30. Ukai Y., Nishimura S. Regeneration of plants from calli derived from seeds and mature embryos in barley // Japan J. Breed. — 1987. — **37**. — P. 405–411.
 31. Rengel Z. Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultured *Hordeum vulgare* mature embryos // Plant Physiol. Biochem. — 1987. — **25**. — P. 43–48.
 32. Сидор Л.С., Орлов П.А. Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов // Цитология и генетика. — 2005. — **39**, № 5. — С. 28–34.
 33. Rikiishi K., Matsuura T., Maekawa M., Noda K., Takeda K. Barley lines showing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos // Plant Breed. — 2003. — **122**. — P. 105–111.
 34. Savaskan C., Szarejko I., Toker M. Callus production and plant regeneration from anther culture of some Turkish barley cultivars // Turk. J. Bot. — 1999. — **23**. — P. 359–365.
 35. Choi H.W., Lemaux P.G., Cho M.-J. Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants // Crop Sci. — 2000. — **40**. — P. 524–533.

Поступила 18.02.09