

УДК 58.085.2:582.542.11:631.811.98

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РЕГЕНЕРАЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ КАЛЮСУ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ СОРТУ ЗИМОЯРКА

І.Р. ГОРБАТЮК¹, І.С. ГНАТЮК¹, М.О. БАННИКОВА¹, А.М. ТАРАНЕНКО¹,
Б.В. МОРГУН^{1,2}

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Досліджували залежність морфогенетичних реакцій калюсних тканин пшениці (утворення первинних меристематичних кластерів, регенерантів, коренів) від вмісту в поживному середовищі синтетичних регуляторів росту ауксинової природи (піклорам, дикамба) та 6-бензиламінопурина (БАП). Первинними експлантатами для калюсогенезу слугували апікальні меристеми пшениці *Triticum aestivum*. Для встановлення впливу регуляторів росту на частоту регенерації використано поживне середовище МС, доповнене різними концентраціями дикамби (0,2, 0,4, 0,6 мг/л), піклораму (0,15, 0,25, 0,5 мг/л) і БАП (0,5, 0,75, 1 мг/л). За концентрацій піклораму 0,15 мг/л і БАП 0,5 мг/л утворювалась найбільша кількість (до 70 %) калюсів з морфогенними осередками. Найефективнішим для отримання регенерантів (до 35 %) виявилось середовище МСРП4 (0,5 мг/л БАП і 0,15 мг/л піклораму). Також для отримання регенерантів ефективно поєднувати 0,2 мг/л дикамби та 1 мг/л БАП (до 15 %). Пагони, одержані з калюсу, утворювали корені *in vitro* й адаптувалися до нестерильних умов. Рослини-регенеранти за культивування в умовах теплиці виявляли високу життєздатність і досягали генеративної стадії розвитку.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, регулятори росту, піклорам, дикамба, БАП, культура *in vitro*.

Пшениця — одна з найцінніших сільськогосподарських культур світу. Нагальним завданням є розробка методів регенерації *in vitro* як біотехнологічного інструменту для створення її нових форм.

Процес добору оптимального поживного середовища — основа біотехнології рослин, тому в багатьох лабораторіях проводять оптимізацію умов культивування *in vitro* злакових і зокрема пшениці [34]. Результатом оптимізації поживних середовищ варіюванням елементів живлення та натуральних і синтетичних регуляторів росту є створення технології культивування певного виду, сорту, гібриду рослин *in vitro*.

На процесі регенерації ґрунтується більшість методів культури клітин і тканин, але регенерація в однодольних рослин ускладнена. Низька ефективність регенерації однодольних рослин часто унеможливорює отримання фертильних рослин [8, 9, 11, 32].

Як стимулятори калюсо- й ризогенезу зазвичай використовують ауксиноподібні регулятори росту [14, 25, 33]. Провідну роль у регенерації

пагонів із калюсу відіграють цитокініни, але цей процес неможливий без участі ауксинів [18, 21, 27]. Вважають, що гормональна взаємодія між ауксинами і цитокінінами здійснюється через контроль метаболізму цих груп фітогормонів у рослині. Спричинений ними процес залежить від стану диференціації клітини, тобто від набору активних, здатних або нездатних до активування експресії генів [2, 3, 10]. Тому для ініціації морфогенетичних процесів у культурі рослин *in vitro* важливим є співвідношення концентрацій ауксинів і цитокінінів у поживних середовищах [16, 23, 24, 35].

Для стимуляції утворення пагонів використовують різноманітні комбінації фітогормонів. Як відомо, бензиламінопурин стимулює регенерацію у більшості рослин, а піклорам і дикамба (синтетичні регулятори росту ауксинової природи) слугують допоміжними компонентами при регенерації злакових [5, 17, 20, 22].

Метою дослідження було встановлення залежності морфогенних реакцій калюсних тканин пшениці (прямої й непрямої регенерації, ризогенезу) від вмісту в поживному середовищі регуляторів росту (піклораму, дикамби, бензиламінопурину).

Методика

Більшість дослідників як первинні експлантати для калюсогенезу використовують незрілі зародки, проте застосування такого типу експлантатів обмежене сезонністю їх отримання [4, 19, 31]. З огляду на це ми використовували апікальні меристеми пшениці *T. aestivum* сорту-дворучки Зимоарка. Такий вибір вихідного культивацийного матеріалу зумовлений його доступністю у великих кількостях упродовж року [34].

Введення в культуру *in vitro* здійснювали за модифікованою нами стандартною методикою [17]. Для отримання асептичних проростків-донорів апікальних меристем насіння послідовно стерилізували 1 %-м розчином KMnO_4 протягом 3 хв, 1 %-м розчином AgNO_3 — 2 хв, 96 %-м етанолом — 1 хв і тричі промивали стерильною дистильованою водою [7, 8]. Після стерилізації насіння пророщували за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду на безгормональному середовищі МС [26] протягом 3 діб.

Апікальні меристеми виділяли з тридобових проростків і культивували на модифікованому агаризованому поживному середовищі МСК для калюсоутворення (табл. 1) за 26 °C у темряві впродовж 18 діб (рис. 1).

Сформований 18-добовий калюс переносили на модифіковане поживне агаризоване середовище МС (див. табл. 1), доповнене різними концентраціями регуляторів росту: дикамбою — 3,6-дихлоро-2-метоксибензойною кислотою («Duchefa Biochemie»), піклорамом — 4-аміно-3,5,6-трихлор-2-піридинкарбоксільною кислотою («Duchefa Biochemie») та БАП — 6-бензиламінопурином («Sigma»).

Експлантати культивували в чашках Петрі (по 50 у чашці) за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду. Кількість зразків морфогенного калюсу визначали на 15-ту добу культивування на модифікованому середовищі МС, доповненому різними регуляторами росту. Утворені регенеранти підраховували з 20-ї до 35-ї доби з інтервалом у 5 діб. Відсоток пагоноутворення визначали як відношення числа експлантатів, які утворили регенеранти, до загального їх числа.

Регенеранти відокремлювали від калюсу й для ініціації ризогенезу висаджували на поживне середовище МСКП (див. табл. 1). Укорінення тривало 2 тижні за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду. Регенеранти з добре розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних

ТАБЛИЦЯ 1. Модифіковані поживні середовища, використані у дослідженні

Середовище	Базовий склад	Вітаміни	Додатковий компонент	Регулятор росту
МСК	МС	За Гамборгом [15]	Калюсогенез 10 мг/л AgNO ₃	2 мг/л 2,4-Д
МСРП1	МС	За Гамборгом	Регенерація 10 мг/л AgNO ₃	1 мг/л БАП; 0,2 мг/л дикамба
МСРП2	МС	Те саме	Те саме	1 мг/л БАП; 0,4 мг/л дикамба
МСРП3	МС	"-	"-	1 мг/л БАП; 0,6 мг/л дикамба
МСРП4	МС	"-	"-	0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам
МСРП5	МС	"-	"-	0,5 мг/л БАП; 0,25 мг/л піклорам
МСРП6	МС	"-	"-	0,5 мг/л БАП; 0,5 мг/л піклорам
МСРП7	МС	"-	"-	0,15 мг/л піклорам; 0,5 мг/л БАП
МСРП8	МС	"-	"-	0,15 мг/л піклорам; 0,75 мг/л БАП
МСРП9	МС	"-	"-	0,15 мг/л піклорам; 1 мг/л БАП
МСРП10	МС	"-	"-	0,2 мг/л дикамба; 0,5 мг/л БАП
МСРП11	МС	"-	"-	0,2 мг/л дикамба; 0,75 мг/л БАП
МСРП12	МС	"-	"-	0,2 мг/л дикамба; 1 мг/л БАП
МСПК1	МС	"-	Контроль "-	1 мг/л БАП
МСПК2	МС	"-	"-	0,5 мг/л БАП
МСПК3	МС	"-	"-	0,2 мг/л дикамба
МСПК4	МС	"-	"-	0,15 мг/л піклорам
МСПК	1/2МС	Мореля	Ризогенез —	0,1 мг/л НОК

умов. Пристосовані до нестерильних умов регенеранти культивували в умовах теплиці за природного освітлення й температури 22–28 °С.

Результати оброблено статистично за програмою MS Excel. Для підтвердження їх вірогідності дослідження повторювали тричі й розраховували найменшу істотну різницю (НІР), яка за $P < 0,05$ становила 3,23. Відносна похибка досліду — 5,4 %.

Результати та обговорення

Морфогенетичний потенціал рослинної клітини у системах *in vitro* виявляється в ширшому діапазоні, ніж у природних умовах, завдяки

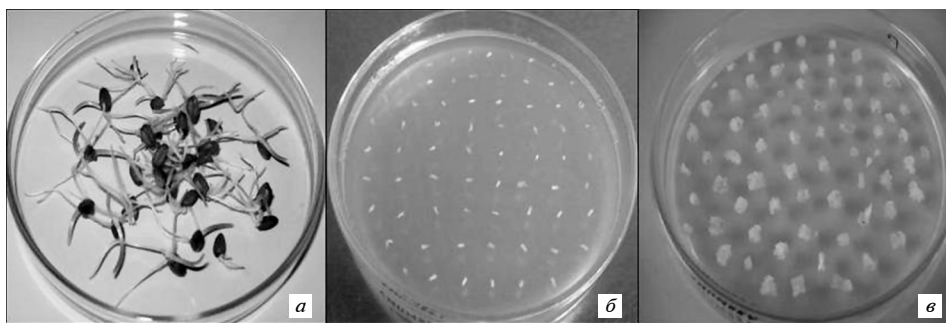


Рис. 1. Проростки пшениці сорту Зимоярка на 3-тю добу пророщування (а), виділені з них апікальні меристеми (б) та 18-добовий калюс (в)

еволюційно зумовленій здатності до регенерації. Порушення цілісності організму — основна умова ініціації регенераційних програм, які здійснюються під впливом різноманітних чинників, зокрема в результаті доповнення поживних середовищ фізіологічно активними сполуками.

На ранніх етапах культивування калюсної тканини переважають клітини у G_1 -фазі, що зумовлює її перехід до диференціації [28]. Тому для індукції морфогенезу доцільно використовувати молодий калюс, клітини якого активно діляться, і який має достатньо великий розмір (5—7 мм). За таких умов максимально реалізується регенераційний потенціал пшениці. Доведено, що регенерація з калюсу м'якої пшениці можлива тільки за наявності в калюсній тканині щільних ділянок (морфогенних зон), утворених меристемоїдними клітинами [1, 8, 13].

У наших досліджах на 15-ту добу культивування на модифікованому середовищі МС за умов освітлення в первинній калюсній культурі, отриманій з апікальних меристем, з'являлись зелені осередки. Пізніше частина з них утворювала регенеранти. Розвиток пагонів починався на 3-й тиждень (з 20-ї доби) культивування первинного калюсу на модифікованому середовищі МС, доповненому регуляторами росту.

Для стимуляції утворення пагонів у пшениці *T. aestivum* використовують різноманітні комбінації фітогормонів. Найчастіше як екзогенний регулятор росту для злакових застосовують 2,4-Д [6], БАП [1, 29], а також дикамбу і піклорам як допоміжні компоненти. Показано [5, 20], що в разі внесення в поживне регенераційне середовище 4 мг/л піклорама він ефективніше індукує морфогенетичні процеси у пшениці, ячменю та тритордеуму, ніж 2,4-Д. Високі концентрації дикамби (2 мг/л) зазвичай використовують для отримання калюсної культури. Проте пагони можуть утворюватись і за значно меншої кількості цього фітогормону (0,2 мг/л), але в поєднанні з цитокінінами [30, 36].

Нашим завданням був добір оптимального середовища для регенерації пшениці з первинного калюсу апікального походження з використанням як регуляторів росту БАП, піклорама й дикамби.

Проведено дві серії експериментів зі з'ясування впливу БАП у поєднанні з дикамбою чи піклорамом на регенерацію пагонів із первинного калюсу пшениці. В першій серії визначали вплив різних концентрацій дикамби (0,2; 0,4; 0,6 мг/л) або піклорама (0,15; 0,25; 0,5 мг/л) за сталої концентрації БАП. Згідно з попередніми даними, при тестуванні дикамби краще застосовувати 1 мг/л БАП, піклорама — 0,5 мг/л БАП [17], що було підтверджено в другій серії експериментів.

У другій серії експериментів ми тестували різні концентрації БАП (0,5; 0,75; 1 мг/л) за сталих концентрацій дикамби (0,2 мг/л) чи піклорама (0,15 мг/л). Загалом було протестовано 12 варіантів модифікованого середовища МС, доповненого регуляторами росту різних концентрацій. Дослідження повторювали тричі, відмінностей між показниками регенерації не виявлено.

При вивченні впливу дикамби контрольним було середовище МСПК1; при вивченні впливу піклорама — МСПК2; при вивченні впливу БАП — МСПК3 або МСПК4.

Загалом було проаналізовано 325 зразків первинного калюсу при вивченні впливу дикамби, 327 зразків при вивченні впливу піклорама, 1800 зразків при вивченні впливу БАП.

В експерименті з визначення впливу дикамби на регенераційну здатність калюсу пшениці з'ясувалося, що досліджуваний регулятор росту в поєднанні з 1 мг/л БАП сприяє утворенню регенерантів.

За внесення в середовище 0,2 мг/л дикамби (середовище МСРП1, див. табл. 1) швидко утворювались морфогенні острівці та пагони-регенеранти, причому за такої концентрації дикамби формувалась найбільша кількість регенерантів. Упродовж усього періоду культивування некрозу не спостерігали, постійно з'являлися нові пагони, тобто калюс зберігав морфогенну здатність (рис. 2). На пізніших етапах дослідження (30—35-та доба) кількість новоутворених регенерантів поступово зменшувалась, а калюс втрачав здатність до морфогенезу.

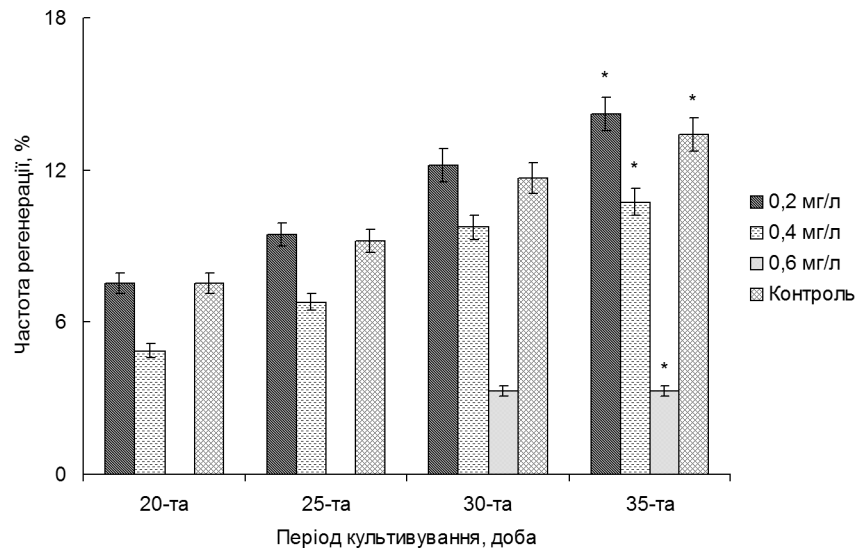


Рис. 2. Вплив різних концентрацій дикамби в поєднанні з 1 мг/л 6-бензиламінопурину на регенераційну здатність калюсних культур пшениці сорту Зимоярка (контроль — модифіковане поживне середовище для регенерації МСРП1)

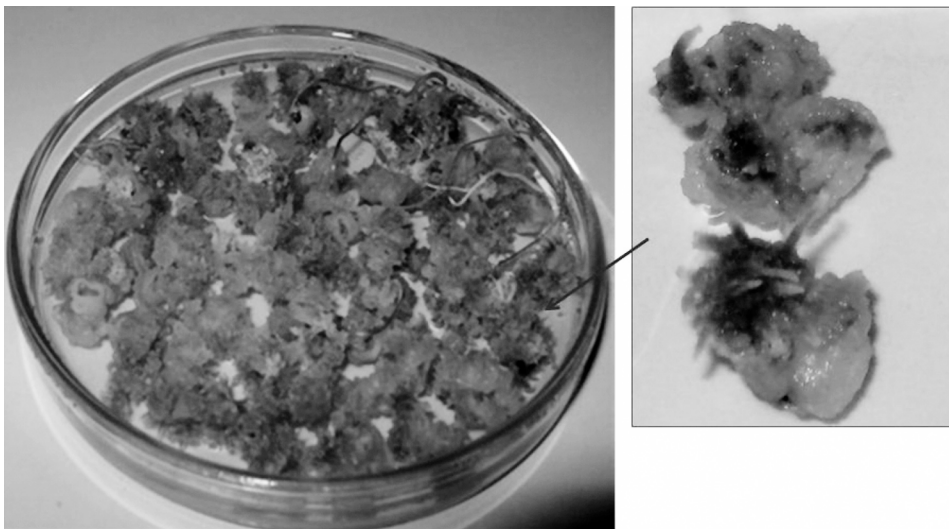


Рис. 3. Органогенез культивованих калюсів пшениці на середовищі для регенерації МСРП2

За додавання в модифіковане поживне середовище 0,4 мг/л дикамби (середовище МСРП2, див. табл. 1) утворювалась велика кількість морфогенних ділянок, проте органогенез відбувався переважно за типом ризогенезу (рис. 3). Кількість сформованих пагонів поступово збільшувалась протягом перших 15 діб, а на 30—35-ту добу число новоутворень помітно зменшувалось.

За високого вмісту дикамби (0,6 мг/л) у поживному середовищі (МСРП3, див. табл. 1) ріст калюсу сповільнювався, частота утворення морфогенних зон і регенерації знижувалась, що не спостерігалось за додавання менших її концентрацій (табл. 2). Слід зазначити, що в разі внесення 0,6 мг/л дикамби регенерація розпочиналась значно пізніше — на 30-ту добу (див. рис. 2).

Середовище МСРП1 (див. табл. 1) придатне для роботи з калюсною культурою пшениці *T. aestivum*, оскільки, згідно з отриманими даними, саме на ньому спостерігався найвищий відсоток пагоноутворення ($15,1 \pm 0,9$).

Далі ми вивчали вплив різних концентрацій піклорама (за сталої кількості БАП — 0,5 мг/л) на регенерацію з морфогенного калюсу. Вста-

ТАБЛИЦЯ 2. Частота утворення калюсу з морфогенними осередками та регенерації пагонів

0,5 мг/л БАП + піклорам			1 мг/л БАП + дикамба		
Концентрація, мг/л	Морфогенез, %	Регенерація, %	Концентрація, мг/л	Морфогенез, %	Регенерація, %
0,15	72,7±4,2*	35,5±2,0*	0,2	91,4±4,3*	15,1±0,9*
0,25	60,0±1,7	25,1±1,1	0,4	89,1±4,0*	12,1±1,0*
0,5	40,4±1,9	25±1,1	0,6	25±1,2	3,7±0,2

П р и м і т к а. Середня частота регенерації у відсотках (разом із похибкою) по кожній концентрації досліджуваних регуляторів росту. В разі додавання в модифіковане поживне середовище МС дикамби чи піклорама без додавання БАП регенерація не відбувалась.

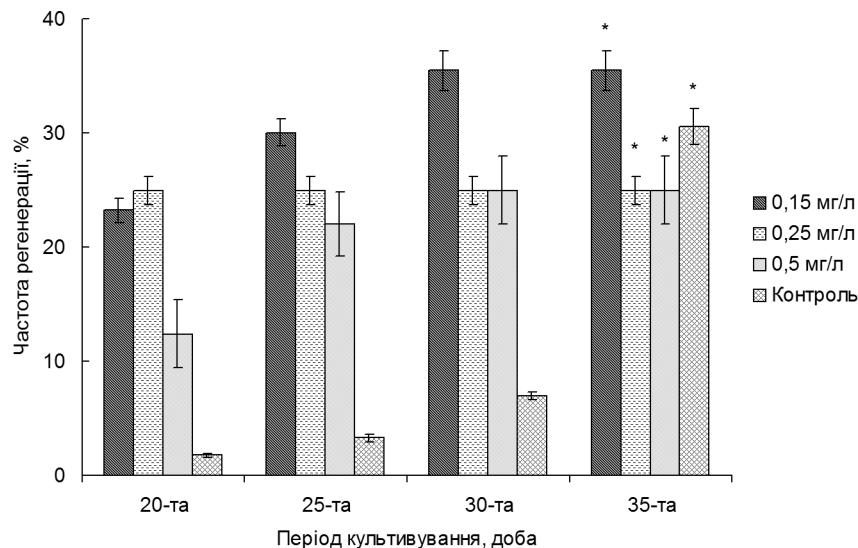


Рис. 4. Частота регенерації рослин із калюсу на поживному середовищі МС, доповненому різними концентраціями піклорама в поєднанні з 0,5 мг/л 6-бензиламінопурина (контроль — модифіковане поживне середовище для регенерації МСПК2)

новлено, що за добавляння в регенераційне середовище піклораму в низьких концентраціях у поєднанні з 0,5 мг/л БАП морфогенетичні процеси в калюсі пшениці стимулюються. За найнижчої з досліджених концентрацій (0,15 мг/л) піклораму (середовище МСРП4, див. табл. 1) утворювалась найбільша кількість морфогенних зон, а також регенерантів на 30—35-ту добу культивування (рис. 4).

Слід зазначити, що після 30-ї доби культивування морфогенного калюсу нові регенеранти не з'являлись. На наш погляд, це є наслідком вичерпуванням регенераційного потенціалу калюсу пшениці.

За збільшення концентрації піклораму до 0,25 й 0,5 мг/л (середовище МСРП5 та МСРП6) кількості морфогенних зон порівняно з нижчою концентрацією зменшувались відповідно на 10 і 36,4 %. Спостерігались також некроз калюсу та зниження регенераційної активності. Отже, підвищення концентрації піклораму в регенераційному середовищі понад 0,15 мг/л загалом негативно впливає на морфогенетичну здатність калюсу та регенерацію пагонів пшениці.

Для підтвердження позитивного ефекту обраної концентрації піклораму (0,15 мг/л) досліджено здатність до морфогенезу не тільки «молодого» (18-добового) калюсу, а й «старого» (30-добового). У 30-добовому калюсі активно утворювались меристематичні зони, проте частота його регенерації була нижчою порівняно з 18-добовим (рис. 5).

На основі наведених вище даних встановлено, що найефективнішим є регенераційне середовище МСРП4 (див. табл. 1). Частота регенерації на ньому була вищою за частоту регенерації на середовищі МСРП1 (рис. 6).

Крім активного утворення меристематичних зон, регенерації пагонів і коренів на зазначеному середовищі фізіологічний стан калюсу впродовж усіх етапів експерименту був задовільний. Важливо, що на пізніх етапах культивування (30—35 дб) ці показники залишалися стабільно високими.

За наявності в поживному середовищі дикамби порівняно з піклорамом відсоток регенерації і кількість морфогенних зон знижувались (див. табл. 2). Значна частина калюсу залишалася неморфогенною, переходила у стаціонарну фазу росту й виявляла ознаки старіння.

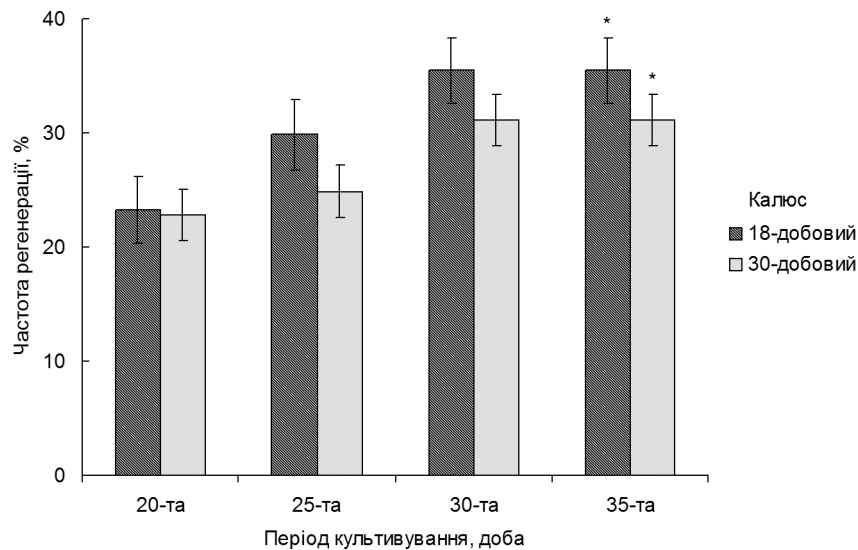


Рис. 5. Утворення регенерантів з 18- і 30-добового калюсу на середовищі МСРП4

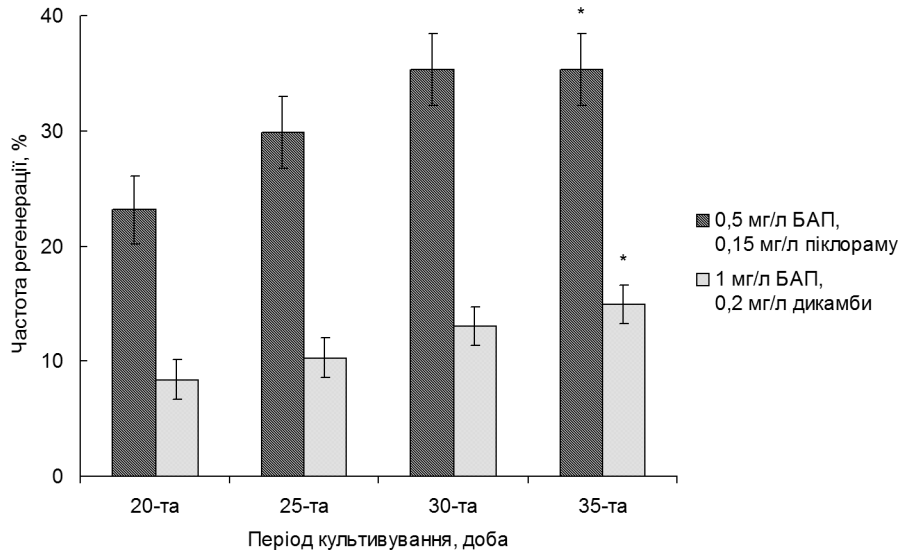


Рис. 6. Порівняльна характеристика регенераційної здатності калюсу на поживних середовищах МСРП4 та МСРП1

Наступну частину експериментів ми присвятили визначенню впливу різних концентрацій БАП за сталого вмісту дикамби (0,2 мг/л) і піклораму (0,15 мг/л), спираючись на отримані вище результати.

У разі внесення 1 мг/л БАП у поживне регенераційне середовище МС, доповнене 0,2 мг/л дикамби (середовище МСРП12, див. табл. 1), на 35-ту добу культивування спостерігали найвищу частоту регенерації (рис. 7). Калюс вирізнявся високим відсотком морфогенезу (81,3 %) і задовільним фізіологічним станом. Зі зменшенням вмісту досліджуваного регулятора росту до 0,75 мг/л (середовище МСРП11, див. табл. 1) кількість утворених пагонів помітно зменшувалася, проте морфогенних

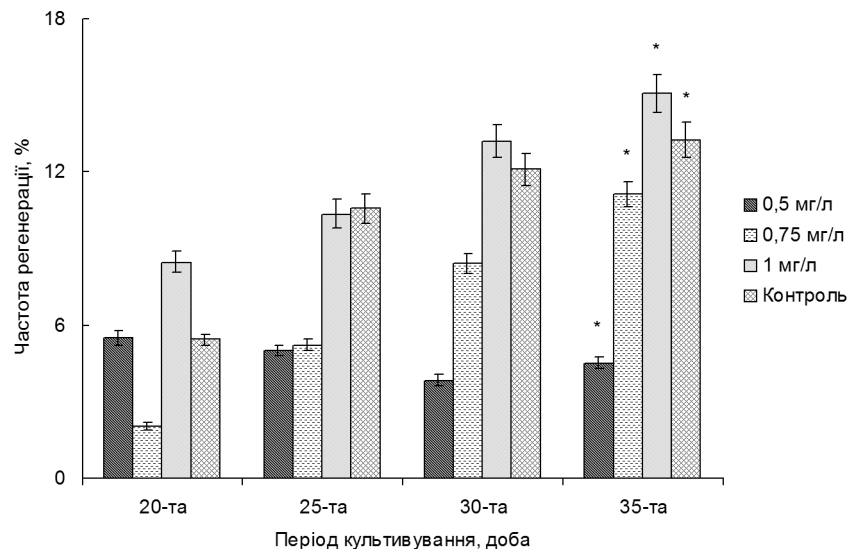


Рис. 7. Залежність морфогенетичних процесів від вмісту в поживному середовищі різних концентрацій 6-бензиламінопурину в поєднанні з 0,2 мг/л дикамби (контроль — модифіковане середовище для регенерації МСПК3)

кластерів залишалося багато (77,5 %) (табл. 3). Мінімальна кількість регенерантів спостерігалася на регенераційному середовищі МСРП10 (див. рис. 7).

У разі внесення 0,5 мг/л БАП у поживне модифіковане середовище МС, доповнене піклорамом (0,15 мг/л) — середовище МСРП7 (див. табл. 1) спостерігали максимальні відсотки пагоноутворення порівняно з контролем та відсотками регенерації на середовищах, які містили інші концентрації БАП (див. рис. 4, 8, табл. 3). Підвищення вмісту цього фітогормону (середовища МСРП8 та МСРП9, див. табл. 1) призводило до зниження регенераційної активності, проте позитивно впливало на морфогенетичні процеси у калюси пшениці (див. табл. 3). Отримані результати підтвердили ефективність і доцільність використання регенераційного середовища МСРП4 (див. табл. 1) за роботи з культурою калюсної тканини пшениці *T. aestivum* in vitro.

Нами показано, що пагони-регенеранти здатні утворювати корені in vitro й адаптуватися до нестерильних умов. Регенеранти з добре розвинутою кореневою системою адаптували до нестерильних умов із використанням як первинного адаптаційного субстрату сфагнового моху. Рослини поступово гартували, збільшуючи експозицію на відкритому повітрі від

ТАБЛИЦЯ 3. Частота морфогенезу та регенерації на поживних середовищах із різним вмістом 6-бензиламінопурину

Концентрація БАП, мг/л	0,15 мг/л піклорама + БАП		0,2 мг/л дикамби + БАП	
	Морфогенез, %	Регенерація, %	Морфогенез, %	Регенерація, %
0	71,7±1,4	28,3±1,6	71,7±1,4	13,3±1,6
0,5	72,7±1,6	30,7±0,6	65,6±1,3	4,5±0,4
0,75	63,5±1,4	15,0±0,5	77,5±1,6	11,1±1,1
1	70,0±1,5	20,6±0,9	81,3±1,8	15,1±0,6

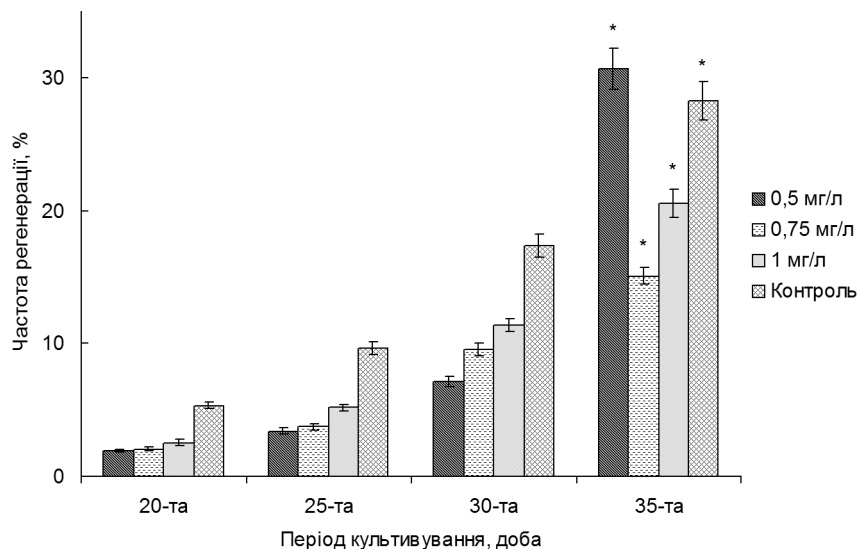


Рис. 8. Вплив різних концентрацій 6-бензиламінопурину на регенераційний потенціал калюсної тканини пшениці за використання поживного середовища для регенерації МС, доповненого 0,15 мг/л піклорама (контроль — модифіковане поживне середовище для регенерації МСРК4)

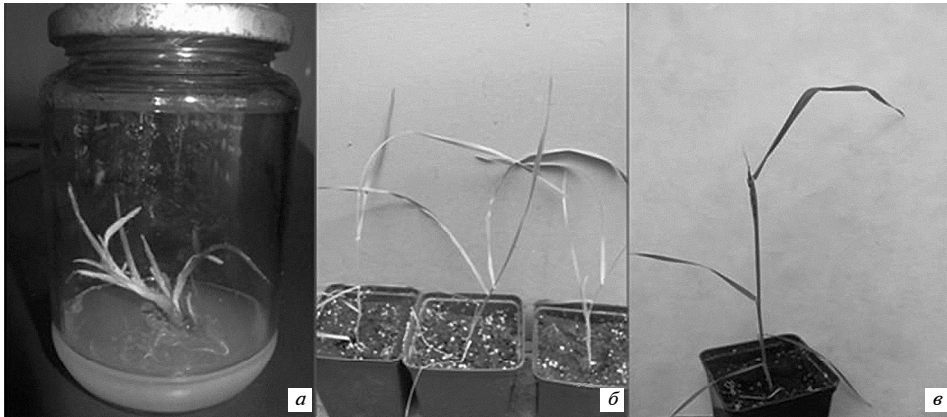


Рис. 9. Укорінення (а) та адаптація до ґрунтових умов рослин-регенерантів (б, в)

20 хв до цілодобового перебування протягом 2 тижнів. Пристосовані до нестерильних умов рослини-регенеранти пересаджували у ґрунтосуміш із торфу, дернового ґрунту та піску (2 : 1 : 1) і культивували в умовах теплиці за природного освітлення й температури 22–28 °С [2].

Адаптовані рослини-регенеранти за культивування в умовах захищеного ґрунту виявляли високу життєздатність (понад 75 %) і досягли генеративної стадії розвитку (рис. 9).

Отже, згідно з отриманими даними, найвищу здатність до морфогенезу має каллус із компактною структурою й повільним темпом наростання. Саме такий каллус ми рекомендуємо для біотехнологічних досліджень з метою отримання найбільшого відсотка рослин-регенерантів.

Встановлено, що для активного утворення морфогенних зон та ефективної регенерації пагонів і коренів доцільно використовувати поживне середовище МСРП4 (0,5 мг/л БАП і 0,15 мг/л піклораму). Саме на такому середовищі утворюється найбільша кількість рослин-регенерантів, які добре адаптуються до нестерильних умов.

За наявності в поживному середовищі дикамби утворюється менше регенерантів, оскільки значна частина калюсу залишається неморфогенною, переходить у стаціонарну фазу росту і виявляє ознаки старіння.

1. *Бавол А.В.* Дослідження впливу тидіазурону на частоту утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів у культурі *in vitro* м'якої пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2010. — Т. 9. — С. 129–133.
2. *Ботаника.* Учебник для вузов: в 4 т.: / П. Зумме, Э.В. Вайлер, Й.В. Кадепайт, А. Брезински, К. Кернер; на основе учебника Э. Страсбургенра и др.; пер. с нем. О.В. Артемьевой, Т.А. Власовой, И.Г. Карнаухова, Н.Б. Колесовой, М.Ю. Чердниченко. — М.: Издательский центр «Академия», 2008. — Т. 2. — 496 с.
3. *Журавлев Н.Ю., Омелько М.А.* Морфогенез у растений *in vitro* // Физиология растений. — 2008. — 55, № 5. — С. 643–664.
4. *Arzani A., Mirodjagh S.-S.* Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress // Plant Cell, Tissue Organ Cult. — 1999. — 58. — P. 67–72.
5. *Barro F., Martin A., Lazzeri P.A., Barcelo P.* Medium optimisation for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum // Euphytica. — 1999. — 108. — P. 161–167.
6. *Bavol A.V., Dubrovna O.V., Lialko I.I.* Regeneration of plants from shoot tips explants of wheat sprouts // Visnyk Ukrainського товариства генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, N 1–2. — P. 3–10. (In Ukrainian).
7. *Bavol A.V., Dubrovna O.V., Lialko I.I., Zinchenko M.* Effect of thidiazuron on the processes of morphogenesis in culture *in vitro* wheat // Физиология и биохимия культурных растений. — 2011. — 43, N 5. — P. 412–418. (In Ukrainian).

8. *Becher T., Haberland G., Koop H.* Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Plant Cell Rep.* — 1992. — **11**. — P. 39–43.
9. *Chen Jun-Ying, Yue Run-Qing, Xu Hai-Xia, Chen Xin-Jian.* Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture // *Agricult. Sci. China.* — 2006. — **5**, N 8. — P. 572–578.
10. *Coenen C., Lomax T.L.* The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato // *Plant Physiol.* — 1998. — **117**. — P. 63–72.
11. *Curtis I.S., Nam H.G.* Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) by floral-dip method — plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // *Transg. Res.* — 2001. — **10**. — P. 363–371.
12. *Dodds H. John, Roberts L.* Experiments in Plant Tissue Culture // John H. Dodds — International Potato Center, 1985. — P. 232.
13. *Eudes F., Achatya 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, Tissue Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 2. — P. 147–157.
14. *Fazeli-Nasab B., Omidi M., Amiritokaldani M.* Callus induction and plant regeneration of wheat mature embryos under abscisic acid treatment // *Int. J. Agricult. Crop Sci.* — 2012. — **4**. — P. 17–23.
15. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* — 1968. — **46**, N 5. — P. 417–421.
16. *Gopitha K., Lakshmi Bhavani A., Senthilmanickam J.* Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane // *Int. J. Pharma Bio Sci.* — 2010. — **1**. — P. 1–7.
17. *Gorbatyuk I.R., Baval A.V., Holubenko A.V., Morgun B.V.* Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka // *Biotechnol. acta.* — 2015. — **8**, N 1. — P. 56–62.
18. *Holubenko A.V.* Studies of morphogenesis *Gentiana macrophylla* Pall. in sterile culture conditions // *Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu «Introduktsiia ta zberezhennia roslynnoho riznomanittia».* — 2004. — **7**. — P. 52–53. (In Ukrainian).
19. *Kachhwaha S., Varshney A., Kothari S.L.* Somatic embryogenesis and long term high plant regeneration from barley (*Hordeum vulgare* L.) using picloram // *Cereal Res. Comm.* — 1997. — **25**. — P. 117–126.
20. *Keresa S., Baric M., Sarcevic H., Marchetti St.* Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos and immature inflorescences of eight Croatian winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) // *Die Bodenkultur.* — 2003. — **54**, N 3. — P. 155–161.
21. *Khatun M.R.* Effect of callus induction media and phytohormones on regeneration of shoots in spring wheat // *J. Agrofor. Environ.* — 2013. — **7**, N 1. — P. 93–96.
22. *Kotchoni S., Noumavo P., Adjanohoun A., Russo D., Dell'Angelo J., Gachomo E., Baba-Moussa L.* A simple and efficient seed-based approach to induce callus production from B73 maize genotype // *Amer. J. Mol. Biol.* — 2012. — **2**. — P. 380–385.
23. *Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zaitsev D., Katasonova A.A.* Biotechnological evaluation of explants for obtaining regenerated in vitro plants of spring wheat in order adaptive selection in the conditions of the Southern Urals // *Izv. Chelyab. NCUrO RAN.* — 2006. — **2**, N 32. — P. 94–98. (In Russian).
24. *Kruglova N.N., Dubrovnaya O.V.* Morphogenesis of cereal androclinal calluses in vitro // *Fiziologiya i biokhimiya kulturnykh rastenii.* — 2011. — **43**, N 1. — P. 15–25. (Russian).
25. *Maksimov I.V., Yarullina L.G., Surina O.B.* The effect of exogenous phytohormones on resistance of wheat calluses to *Tilletia caries* (D.C.) Tul. & C. Tul // *Amer. J. of Plant Sci.* — 2014. — **5**. — P. 1745–1754.
26. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**, N 3. — P. 473–497.
27. *Murray J.A.H., Jones A., Godin C., Traas J.* Systems analysis of shoot apical meristem growth and development: integrating hormonal and mechanical signaling // *Plant Cell.* — 2012. — **24**. — P. 3907–3919.
28. *Musienko M.M., Paniuta O.O.* Plant biotechnology. Tutorial. — Kyiv: Vyd.-polihraf. Tsentr «Kyivskiy universytet», 2005. — 114 p. (In Ukrainian).
29. *Nonda R., Rout G.* In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica* // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* — 2003. — **73**, N 2. — P. 131–135.
30. *Papenfuss J.M., Carman J.G.* Enhanced regeneration from wheat callus cultures using dicamba and kinetin // *Crop Sci.* — 1987. — **27**. — P. 588–593.
31. *Przetakiewicz 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**. — P. 245–256.
32. *Rashid U. et al.* Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars // *Electronic J. of Biotechnol.* — 2009. — **12**. — P. 4–5.

33. *Sassi M., Ali O., Boudon F. et al.* An auxin-mediated shift toward growth isotropy promotes organ formation at the shoot meristem in *Arabidopsis* // *Current Biol.* — 2014. — **24**. — P. 1–8.
34. *Sharma V.K., Hansch R., Mendel R.R., Schulze J.* Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments // *Plant Breed.* — 2005. — **124**. — P. 242–246.
35. *Ying-Hua Su, Yu-Bo Liu, Xian-Sheng Zhang.* Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development // *Mol. Plant.* — 2011. — **4**, N 4. — P. 616–625.
36. *Zamora A.B., Scott K.J.* Callus formation and plant regeneration from wheat leaves // *Plant Sci. Lett.* — 1983. — **29**. — P. 183–189.

Отримано 26.10.2015

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА РЕГЕНЕРАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ
КАЛЛЮСА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СОРТА ЗИМОЯРКА*И.Р. Горбатюк¹, И.С. Гнатюк¹, М.А. Банникова¹, А.Н. Тараненко¹, Б.В. Моргу^{1,2}*¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовали зависимость морфогенетических реакций каллюсных тканей пшеницы (образование первичных меристематических кластеров, регенерантов, корней) от содержания в питательной среде синтетических регуляторов роста ауксиновой природы (пиклорам, дикамба) и 6-бензиламинопурина (БАП). Первичными эксплантатами для каллюсогенеза служили апикальные меристемы пшеницы *Triticum aestivum*. Для определения влияния регуляторов роста на частоту регенерации использована модифицированная питательная среда МС, дополненная различными концентрациями дикамбы (0,2; 0,4; 0,6 мг/л), пиклорама (0,15; 0,25; 0,5 мг/л) и БАП (0,5; 0,75; 1 мг/л). При концентрациях пиклорама 0,15 мг/л и БАП 0,5 мг/л образовывалось наибольшее количество (до 70 %) каллюсов с морфогенными очагами. Наиболее эффективной для получения регенерантов (до 35 %) оказалась среда МСРП4 (0,5 мг/л БАП и 0,15 мг/л пиклорама). Также для получения регенерантов эффективным является сочетание 0,2 мг/л дикамбы и 1 мг/л БАП (до 15 %). Побеги, выращенные из каллюса, образовывали корни *in vitro* и адаптировались к нестерильным условиям. Растения-регенеранты при культивировании в условиях теплицы проявляли высокую жизнеспособность и достигали генеративной стадии развития.

EFFECT OF SYNTHETIC AUXIN-LIKE GROWTH REGULATORS ON CALLUS
REGENERATIVE ABILITY OF COMMON WHEAT CV. ZYMOYARKA*I.R. Gorbatyuk¹, I.S. Gnatyuk¹, M.O. Bannikova¹, A.M. Taranenko¹, B.V. Morgun^{1,2}*¹Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Acad. Zabolotnogo, Kyiv, 03143, Ukraine²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The dependency between the morphogenetic reactions of wheat callus tissue (formation of primary meristematic clusters, regenerants, roots) and the content of synthetic auxin-like growth regulators (picloram, dicamba) along with 6-benzylaminopurine (BAP) in nutrient medium has been studied. Apical meristems of wheat (*Triticum aestivum*) were used as primary explants for callusogenesis. Modified MS nutrient medium, supplemented with different concentrations of dicamba (0.2; 0.4; 0.6 mg/l), picloram (0.15; 0.25; 0.5 mg/l) and BAP (0.5; 0.75; 1 mg/l), was used to find out influence of growth regulators on regeneration frequency. Formation of the greatest number (up to 70 %) of calli with morphogenic zones was detected at 0.15 mg/l concentration of picloram and 0.5 mg/l of BAP. The MS medium with that content turned out to be the most efficient to produce regenerants (up to 35 %) as well as the one combining 0.2 mg/l dicamba and 1 mg/l BAP (up to 15 %). The shoots derived from callus were able to form roots *in vitro* and to adapt to septic conditions. The regenerants demonstrated high viability and reached generative stage of growth during cultivation in greenhouse.

Key words: *Triticum aestivum*, growth regulators, picloram, dicamba, BAP, *in vitro* culture.