

<https://doi.org/10.15407/frg2020.06.528>
УДК: 581.143.6:58.085

ВПЛИВ ПІКЛОРАМУ НА МОРФОГЕНЕЗ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР СЕЛЕКЦІЙНО-ЦІННИХ ГЕНОТИПІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

О.В. ДУБРОВНА, Л.В. СЛИВКА

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

Досліджено вплив синтетичного ауксину — піклорама на частоту утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації селекційно-цінних генотипів озимої пшениці. Показано, що за наявності в поживному середовищі піклорама утворювався калюс більшої маси, здатний до тривалішого культивування в умовах *in vitro* порівняно з калюсом, утвореним на середовищі з 2,4-Д, і при цьому зберігаючи регенераційну здатність. У калюсів, отриманих на середовищі з 2,4-Д, було більше некрозів і тканини переходили до морфогенного стану на 3—5 діб пізніше, ніж калюси, отримані на середовищах із піклорамом. Максимальна кількість морфогенного калюсу в усіх досліджених генотипів утворювалась на середовищі з додаванням піклорама в концентрації 2 мг/л. Життєздатність морфогенного калюсу, отриманого на середовищі з піклорамом, перевищувала тривалість культивування калюсу, отриманого на середовищі з 2,4-Д, в середньому на 30 діб. Встановлено, що за наявності піклорама в середовищах для регенерації зростала частота утворення пагонів за генетичної трансформації пшениці. На середовищі з додаванням цього ауксину в концентрації 2 мг/л отримано найбільшу кількість регенерантів. За такої концентрації піклорама достовірно збільшувалось число рослин порівняно із середовищем, що містило ІОК. Регенераційний потенціал калюсів, отриманих на середовищі з 2,4-Д, після генетичної трансформації зберігався максимально протягом 2 пасажів, тоді як рослини-регенеранти з калюсу, що утворювався на середовищі з піклорамом, отримували протягом 3—4 пасажів.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, піклорам, морфогенез, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація.

Біотехнологічні методи широко використовують для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських культур, зокрема пшениці [1, 2]. Сьогодні біотехнологічні рослини пшениці, стійкі до стресових чинників довкілля, отримують, в основному, методами генетичної інженерії [3, 4]. Найпоширенішою є генетична трансформація з використанням *Agrobacterium tumefaciens* для перенесення екзогенних Т-ДНК у рослинну клітину, при цьому більшість сучасних методик з отримання генетично модифікованих рослин цієї

Цитування: Дубровна О.В., Сливка Л.В. Вплив піклорама на морфогенез калюсних культур селекційно-цінних генотипів озимої пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. *Фізіологія рослин і генетика*. 2020. 52, № 6. С. 528—537. <https://doi.org/10.15407/frg2020.06.528>

культури передбачає етап культивування тканин *in vitro*, що має чимало недоліків, основний з яких — залежність частоти генетичної трансформації від морфогенетичного потенціалу культивованих тканин. За *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці необхідно проводити кокультивацію калюсів з агробактерією, що також негативно впливає на подальшу регенерацію пагонів. Крім того, для елімінації агробактерії використовують високі дози антибіотика, що теж негативно діє на морфогенний потенціал калюсів, зменшує ймовірність регенерації й відповідно отримання трансгенних форм. У зв'язку з цим одним із завдань при проведенні робіт з генетичної трансформації в культурі *in vitro* є розробка методів підвищення частоти регенерації як біотехнологічного інструменту для створення нових форм пшениці [5, 6].

Слід зазначити, що злаки є складним об'єктом з погляду експериментальної біотехнології. Однією з причин, які зумовлюють складність отримання калюсної тканини у злаків порівняно з дводольними є нездатність до утворення калюсу в природних умовах. Для індукції калюсо- й морфогенезу необхідно модифікувати поживні середовища, змінювати співвідношення макро- і мікроелементів, використовувати нові біологічно активні речовини. Відсутність ефективних методів масової регенерації рослин із клітинних ліній — один з обмежувальних чинників для широкого впровадження біотехнологій у генетико-селекційний процес. Пшениця залишається складною культурою для проведення біотехнологічних робіт, оскільки процеси калюсогенезу та утворення пагонів в умовах *in vitro* великою мірою визначаються складом живильного середовища.

Для успішної трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* у культурі *in vitro* необхідна ефективна система культивування, що ґрунтується на використанні таких базових елементів, як компетентний генотип [7], тип експлантата [8—10], склад живильних середовищ [11—15]. З метою стимулювання процесів морфогенезу використовують різні біологічні добавки до середовищ культивування — синтетичні аналоги фітогормонів, амінокислоти, осморегулятори та інші сполуки [16, 17]. Відомо, що деякі антибіотики можуть виявляти гормональну активність і бути використані не тільки для елімінації агробактеріального забруднення, а й для підвищення рівня регенерації калюсів [18—21]. Незважаючи на велику кількість досліджень фізіологічно активних речовин в умовах *in vivo*, їх вплив на регенерацію рослин *in vitro* за генетичної трансформації вивчено недостатньо.

Для дедиференціації клітин злакових та індукції калюсогенезу традиційно використовують середовища з добавлянням 2,4-Д. Отримані калюси характеризуються повільним переходом до морфогенного стану, а період індукції рослин-регенерантів 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, ніж з'являються регенеранти. Можливим варіантом підвищення регенераційної здатності калюсів після проведення трансформації є заміна 2,4-Д на інші ауксини синтетичного походження [19, 22]. Є дані, що ці ауксини не тільки стимулюють калюсогенез, а й пришвидшують перехід

калюсів у морфогенний стан, істотно збільшують кількість меристематичних ділянок з яких у подальшому відбувається соматичний ембріогенез [23, 24]. У результаті регенераційні процеси відбуваються швидко, а вихід регенерантів збільшується.

Піклорам (4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота) — синтетичний ауксин, який входить у групу системних гербіцидів із типовою рістрегулювальною дією, що супроводжується посиленням накопиченням білка і нуклеїнових кислот [22]. Показано ефективність його використання як окремо, так і в поєднанні з цитокінінами для збільшення частоти калюсогенезу, росту калюсу [25], соматичного ембріодогенезу [26], регенерації рослин пшениці [25—27]. Застосування піклорама в умовах *in vitro* на пшениці, зокрема для отримання калюсу та підвищення регенераційної здатності, показало його вищу стимулювальну активність порівняно з 2,4-Д й ІОК [27—30]. Калюс, отриманий за допомогою піклорама, характеризувався ліпшим морфогенезом, ніж у разі застосування 2,4-Д, мав нижчий прояв фітотоксичності [27, 30]. При вирощуванні калюсу на світлі піклорам на відміну від 2,4-Д не пригнічував синтез хлорофілу, тому він придатніший для отримання морфогенних калюсних культур [31].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу піклорама на морфогенетичний потенціал калюсних культур селекційно-цінних генотипів озимої пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Методика

В дослідженнях використано 4 нових перспективних генотипи озимої м'якої пшениці (УК 065; УК 095; УК 209; УК 322). Для трансформації брали калюси, індуковані з апікальних меристем тридобових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*, розмір яких варіював у межах 1,5—2,0 мм [27]. Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3 %-м розчином NaOCl протягом 15 хв, 4 рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі за температури 24 °С на безгормональному середовищі МС. Вплив синтетичного ауксину на процеси калюсогенезу вивчали на модифікованому середовищі МС [28] з додаванням піклорама в концентрації 0,5; 1, 2 і 3 мг/л. Контролем слугувало те саме середовище з додаванням 2,4-Д в концентрації 2 мг/л, оскільки ця концентрація є оптимальною для калюсогенезу *Triticum aestivum* L. [32]. У кожному варіанті дослідження використовували по 200 експлантатів. Експлантати висаджували на живильне середовище й культивували при 27 °С в темряві протягом чотирьох тижнів. Сформовані калюси використовували для трансформації. Умови та процедура *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації описано в праці [33]. Після трансформації калюси переносили на середовище для регенерації, яке додатково містило 10 мг/л AgNO₃, 0,5 мг/л БАП і піклорам у різних концентраціях. Далі їх вирощували за освітлення 3—4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду.

Частоту індукції калюсу, утворення морфогенного калюсу та регенерацію рослин (у відсотках) визначали за співвідношенням числа експлантатів, які утворили калюс або рослини-регенеранти, до їх загального числа. Канаміциностійкими вважали рослини, які зберігали

зелене забарвлення на селективному середовищі. Достовірність різниці між показниками оцінювали за критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Тип експлантату є одним з основних чинників для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці, оскільки утворення морфогенного калюсу та індукція пагонів відбуваються з тканин із високою регенераційною здатністю й активним поділом клітин, що великою мірою визначає саме тип експлантату. Морфогенетичний потенціал первинних експлантатів залежить від типу тканини, з якої їх виділяють, та її фізіологічного стану. Для ініціації калюсів використовують різні типи експлантатів, проте їх ефективність значно відрізняється [34–37].

Вихідними експлантатами слугували апікальні меристеми пагонів як один із найперспективніших типів експлантатів для злакових культур [38]. Перевагою цього типу експлантату є можливість подолання генотипних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Протягом останнього десятиліття вчені успішно працюють з апексами пагонів проростків багатьох сільськогосподарських культур із метою розробки ефективних і менш залежних від генотипу систем регенерації зернових. Культуру апікальних меристем широко використовують як джерело калюсної тканини для генетичної трансформації злакових рослин, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, які активно діляться, та характеризуються високою частотою індукції калюсу — до 90 % [38].

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, а й підвищують морфогенний потенціал і стимулюють регенерацію. Слід зазначити, що 2,4-Д у високих концентраціях збільшує хромосомну нестабільність, що призводить до соматоклональних змін [39]. У зв'язку з цим інші сильні ауксини, в тому числі й піклорам, застосовують як його альтернативу.

Ми вивчали вплив двох синтетичних ауксинів — 2,4-Д та піклораму на частоту калюсоутворення у селекційно-цінних генотипів пшениці м'якої озимої. Калюсоутворення у наших дослідах розпочиналось уже на третю добу. Морфологічно калюси, отримані на середовищах з різними ауксинами, не відрізнялися, утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції. Концентрація піклораму 0,5–1,0 мг/л у середовищі виявилась недостатньою для утворення калюсу в більшості експлантатів досліджених генотипів (таблиця). Калюсогенез за такої концентрації хоч і відбувався, проте його частота була достовірно нижчою, ніж у контрольному варіанті, калюси росли повільно. Концентрація ауксину 2 мг/л виявилась оптимальною для різних генотипів — достовірних відмінностей за частотою калюсоутворення на середовищах з 2,4-Д та піклорамом не виявлено. Підвищення концентрації піклораму до 3,0 мг/л призводило до досто-

Вплив різних концентрацій піклорама на частоту калюсогенезу з апікальних меристем пагонів різних генотипів озимої пшениці

Генотип	Ауксин	Частота калюсогенезу, %, за концентрації ауксину, мг/л			
		0,5	1,0	2,0	3,0
УК 065	2,4-Д (контроль)	—	—	94,0±1,7	—
	Піклорам	15,5±2,4	40,5±3,5	91,0±2,0	70,0±3,2
УК 095	2,4-Д (контроль)	—	—	93,0±1,8	—
	Піклорам	20,0±2,8	44,0±3,5	93,0±1,8	77,0±3,0
УК 209	2,4-Д (контроль)	—	—	98,0±1,0	—
	Піклорам	29,5±3,0	50,0±3,5	96,0±1,7	75,0±3,1
УК 322	2,4-Д (контроль)	—	—	97,0±1,2	—
	Піклорам	24,0±3,0	47,5±3,5	98,0±1,0	73,0±3,1

вірною зменшення частоти утворення калюсу та збільшення числа некрозів.

Після того як калюси набували необхідного розміру (діаметр близько 5 мм) проводили генетичну трансформацію й висаджували калюси на регенераційні середовища. Згідно з результатами попередніх досліджень основною причиною загибелі рослинних клітин в умовах *in vitro*, особливо за кокультивування з *Agrobacterium*, як правило є некроз або апоптоз через надвироблення пероксиду водню, що різко зменшує регенераційний потенціал калюсних клітин. Для протидії цьому явищу до складу регенераційного середовища зазвичай вводять антиоксиданти, зокрема нітрат срібла, цистеїн та аскорбінову кислоту, чим можна істотно поліпшити регенерацію. Ми дослідили ефективність регенераційних середовищ — МС-51, яке додатково містило аспарагінову кислоту (100 мг/л), нітрат срібла (10 мг/л), глутамін (10 мг/л), цистеїн (20 мг/л), аскорбінову кислоту (100 мг/л), ІОК (0,5 мг/л) та БАП (1 мг/л), а також середовища МС-61, МС-62, МС-63, МС-64, які містили такі ж компоненти, але ІОК була замінена на піклорам у концентраціях відповідно 0,5; 1; 2 і 3 мг/л.

Після перенесення калюсів на регенераційні середовища на них утворювались глобулярні ділянки яскраво-зеленого або світло-жовтого кольору. Такі калюси вважали морфогенними. Результати досліджень підтвердили, що гормональний склад середовища під час індукції та росту калюсів впливає на подальший перехід до морфогенного стану після трансформації. Максимальна кількість морфогенного калюсу (до 26 % в УК 209) у всіх досліджених генотипів утворювалась на середовищі з додаванням піклорама в концентрації 2 мг/л (рис. 1).

У калюсів, отриманих на середовищі з 2,4-Д, було більше некрозів і перехід тканин до морфогенного стану відбувався на 3—5 діб пізніше порівняно з калюсами, отриманими на середовищах із піклорамам. У досліджах ми також оцінювали вплив піклорама та 2,4-Д на життєздатність калюсу після генетичної трансформації. За нашими спостереженнями, життєздатність морфогенного калюсу, отриманого на середовищі з піклорамам, перевищувала тривалість культивування калюсу, отриманого на середовищі з 2,4-Д, в середньому на 30 діб.

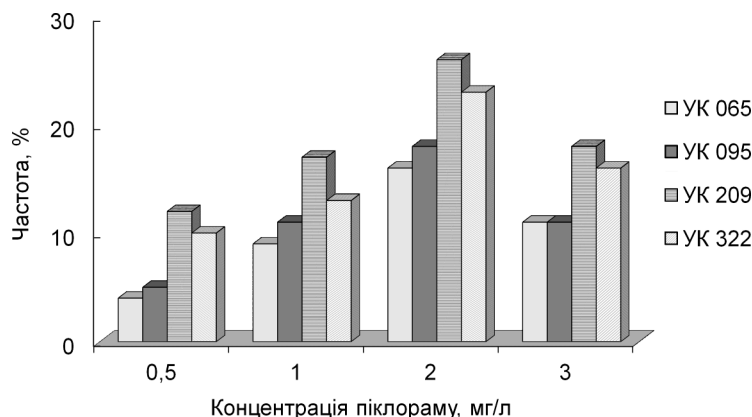


Рис. 1. Частота утворення морфогенного калюсу на живильних середовищах із різними концентраціями піклораму

Оскільки існує пряма кореляційна залежність між числом морфогенних калюсів і регенерантів на середовищі з додаванням піклораму в концентрації 2 мг/л, вдалося отримати й найбільшу кількість рослин. Виявлено істотну різницю між числом отриманих регенерантів на середовищі з ІОК та з піклорамом (рис. 2).

За концентрації піклораму 2 мг/л різниця була достовірною та число регенерантів збільшувалось в 1,5 раза. Підвищення регенераційної здатності калюсу, отримане в умовах експерименту, може бути пов'язане з менш негативним впливом піклораму на генетичний апарат калюсних клітин. Серед досліджених зразків найбільшою частотою регенерації характеризувалися генотипи УК 209 та УК 322.

Регенераційний потенціал калюсів, отриманих на середовищі з 2,4-Д, після генетичної трансформації зберігався максимально протягом 1—2 пасажів, а рослини-регенеранти з калюсу, що утворився на середовищі з піклорамом, отримували протягом 3 пасажів. Це можна пояснити повільним переходом у морфогенний стан та інгібуванням подальшої регенерації з калюсів, ініційованих на середовищі з 2 мг/л 2,4 Д. Унаслідок негативної дії антибіотиків та інфекції агробакте-

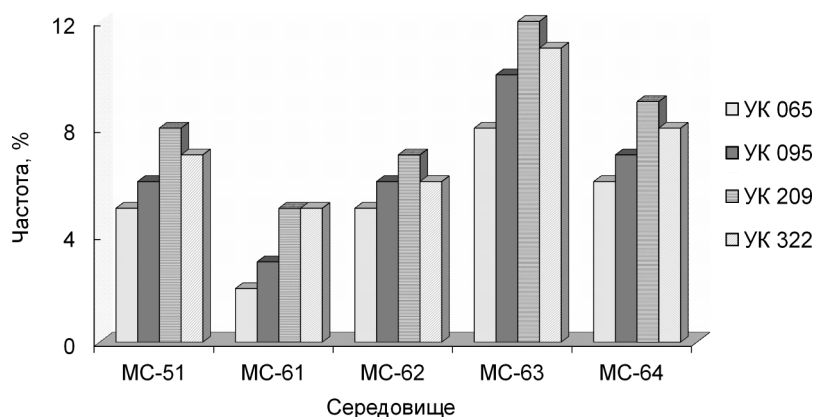


Рис. 2. Частота регенерації пагонів на живильних середовищах із різними концентраціями піклораму

рією калюси гинуть ще до того, як почнуться активні морфогенні процеси.

Неодноразово повідомлялося, що в культурі тканин зернових піклорам виявляє більшу ауксинову активність, ніж 2,4-Д [22, 25, 27]. Так, згідно з літературними даними, використання піклорама в концентрації 2 мг/л значно підвищує частоту регенерації пагонів [22, 25]. Аналогічний результат отримали й інші автори, які використовували піклорам у значно меншій дозі — 0,16 мг/л [30]. Такі розбіжності можна пояснити різним ендogenous рівнем ауксинів у досліджених генотипів, тобто різні генотипи пшениці можуть по-різному реагувати на вміст і концентрацію цієї речовини. У зв'язку з цим для оптимального результату для кожного конкретного сорту концентрацію ауксину потрібно добирати індивідуально.

Отже, застосування в середовищах для калюсогенезу й регенерації синтетичного ауксину піклорама підвищує регенераційну здатність калюсів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. Наявність у живильному середовищі піклорама сприяла утворенню калюсу більшої маси і зменшенню числа некрозів. Калюс, що утворився на середовищі з піклорамом, здатний до тривалішого культивування в умовах *in vitro*, при цьому він зберігає регенераційну здатність. У клітинних культур, які вирощували на середовищі з цим ауксином, виявлено достовірне збільшення частоти регенерації пагонів. Встановлено, що для кожного генотипу концентрацію піклорама слід добирати індивідуально.

REFERENCES

1. Abdul, R., Ma, Z. & Wang, H. (2010). Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L.): A Review. *Triticaceae Genomics and Genetics*, 1, No. 2, pp. 1-7.
2. Dubrovna, O.V., Morgun, B.V. & Bovol, A.V. (2014). *Biotechnology of wheat: cell selection and genetic engineering*. Kyiv: Logos [in Ukrainian].
3. Hiei, Y., Ishida, Y. & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Sci.*, 5, pp. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
4. Bhalla, P., Ottenhof, H. & Singh, M. (2006). Wheat transformation an update of recent progress. *Euphytica*, 149, pp. 353-366. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9087-6>
5. Ding, L. (2009). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Mol. Biol. Rep.*, 36, pp. 29-36. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9148-5>
6. Hayta, S., Smedley, M.A., Demir, S.U., Blundell, R., Hinchliffe, A., Atkinson, N. & Harwood, W.A. (2019). An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*, 15, 121. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0503-z>
7. Abid, N., Maqbool, A. & Malik, K. (2014). Screening commercial wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties for *Agrobacterium* mediated transformation ability. *Pakistan J. Agricult. Sci.*, 51, No. 1, pp. 83-89.
8. He, Y., Jones, H.D., Chen, S., Chen, X.M., Wang, D.W., Li, K.X., Wang, D.S. & Xia, L.Q. (2010). *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency. *J. Exp. Bot.*, 61, pp. 1567-1581.
9. Khurana, J., Chugh, A. & Khurana, P. (2002). Regeneration from mature and immature embryos and transient gene expression via *Agrobacterium*-mediated transformation in emmer wheat (*Triticum dicoccum* Schuble). *Indian J. Exp. Biol.*, 40, pp. 1295-1303.

10. Mahalakshmi, A. & Khurana, P. (1995). Agrobacterium-mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Biochem. and Biotechnol.*, 4, No. 2, pp. 55-59.
11. Tao, L., Du, L., Xu, H. & Ye, X. (2011). Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Agricult. Sci. in China*, 10, pp. 317-326.
12. Wang, Y., Xiao, X. & Zhang, A. (2002). Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genetica Sinica*, 29, No. 3, pp. 260-265.
13. Tamas, C., Szucs, P., Rakszegi, M., Tamas, L. & Bedo, Z. (2004). 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*, 79, pp. 39-44.
14. Ishida, Y., Tsunashima, M., Hiei, Y. & Komari, T. (2015). Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods Mol Biol.*, 1223, pp. 189-198. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_15
15. Sarker, R.H. & Biswas, A. (2002). In vitro plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture*, 12, No. 2, pp. 155-165.
16. Medvecká, E. & Harwood, W. (2015). Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using mature embryos. *Methods Mol. Biol.*, 1223, pp. 199-209. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_16
17. Tang, Z., Ren, Z., Wu, F., Fu, S., Wang, X. & Zhang, H. (2006). The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system. *Agricultural Sciences in China*, 5, pp. 417-424.
18. Tran, T.N. & Sanan-Mishra, N. (2015). Effect of antibiotics on callus regeneration during transformation of IR 64 rice. *Biotechnol. Rep.*, No. 7, pp. 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.06.004>
19. Goncharuk, O.M., Baval, A.V. & Dubrovna, O.V. (2014). Increase in frequency of wheat callus cultures regeneration for *Agrobacterium*-mediated transformation. <http://utgis.org.ua/journals/index.php/VisnykUTGiS/article/view/356/392>. *Bul. Ukr. Soc. Genet. Breeders*, 12, No. 2, pp. 159-165 [in Ukrainian].
20. Yu, Y. & Wei, Z. (2008). Influences of cefatoxime and carbenicillin on plant regeneration from wheat mature embryos. *Biologia Plantarum*, 52, pp. 553-556.
21. Dubrovna, O.V., Baval, A.V., Zinchenko, M.O., Goncharuk, O.M. & Lyalko, I.I. (2012). Influence of cefotaxime on morphogenesis in the culture of apical meristems and mature embryos of wheat. *Physiology and biochemistry of cult. plants*, 44, No. 3, pp. 218-224 [in Ukrainian].
22. Sharma, V., Hänsch, R. & Mendel, R. (2005). Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenicity using meristematic shoot segments. *Plant Breeding*, 124, No. 3, pp. 242-246. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01095.x>
23. Ren, J., Wang, X. & Yin, J. (2010). Dicamba and Sugar Effects on Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryo Culture of Wheat. *Agricultural Sciences in China*, 9, No. 1, pp. 31-37. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60064-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60064-X)
24. Baval, A.V., Dubrovna, O.V., Lyalko, I.I. & Zinchenko, M.O. (2011). The influence of thidiazuron on processes of morphogenesis in culture in vitro of bread wheat. *Physiology and biochemistry of cult. plants*, 43, No. 5, pp. 412-418 [in Ukrainian].
25. Mendoza, M. & Kaeppler, H. (2002). 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*, 38, No. 1, pp. 39-45.
26. Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P. & Barcel, P. (1999). Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*, 108, No. 3, pp. 161-167. <https://doi.org/10.1023/A:1003676830857>
27. Baval, A.V., Dubrovna, O.V. & Lyalko, I.I. (2007). Regeneration of plants from the explants of the top of wheat seedlings shoots. *Bul. Ukr. Soc. Genet. Breeders*, 5, No. 1-2, pp. 3-10 [in Ukrainian].

28. Baval, A.V., Dubrovna, O.V. & Lyalko, I.I. (2008). Regeneration of plants from different types of bread wheat explants. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 40, No. 2, pp. 150-156 [in Ukrainian].
29. Kumar, R., Mamrutha, H., Kaur, A., Venkatesh, K., Grewal, A., Kumar, R. & Tiwari, V. (2017). Development of an efficient and reproducible regeneration system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 23, No. 4, pp. 945-954. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0463-6>
30. Gorbatyuk, I.R., Baval, A.V., Holubenko, A.V. & Morgun, B.V. (2015). Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat. *Biotechnologia acta*, 8, No. 1, pp. 56-62. <https://doi.org/10.15407/biotech8.01.056>
31. Collins, G.B., Vian, W.E. & Phillips, G.C. (1978). Use of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci.*, 18, No. 2, pp. 286-288.
32. Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S. & Sancak C. (1996). Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed.*, 115, pp. 455-458.
33. Baval, A.V., Dubrovna, O.V., Goncharuk, O.M. & Voronova, S.S. (2014). Agrobacterium-mediated transformation of bread wheat using callus cultures. *Factors of experimental evolution of organisms*, 15, pp. 16-19 [in Ukrainian].
34. Vishnudasana, D., Patnaik, D. & Khurana, P. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Current science*, 91, pp. 307-317.
35. Ishida, Y., Tsunashima, M., Hiei, Y. & Komari, T. (2015). Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods Mol. Biol.*, 1223, pp. 189-198.
36. Wu, H., Doherty, A. & Jones, H. (2009). Agrobacterium-mediated transformation of bread and durum wheat using freshly isolated immature embryos. In: *Transgenic wheat, barley and oats* (pp. 93-103), New York: Humana Press.
37. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. & Jones, H. (2003). Factors influencing successful Agrobacterium-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*, 21, pp. 659-668. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0564-7>
38. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W. & Sticklen, M. (2002). Shoot apical meristem: in vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro Cellular & Developm. Biology - Plant*, 38, No. 2, pp. 163-167. <https://doi.org/10.1079/IVP2001267>
39. Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil, I.K., Thorpe, T.A. [et al.] *Plant cell and tissue culture*. (pp. 139-151), Kluwer Publ., Dordrecht.
40. Ying-Hua, S., Yu-Bo, L. & Xian-Sheng, Z. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant*, 4, No. 4, pp. 616-625.

Received 07.12.2020

INFLUENCE OF PICLORAM ON THE MORPHOGENESIS OF CALLI CULTURES OF SELECTION-VALUE GENOTYPES OF WINTER WHEAT UNDER *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION

O.V. Dubrovna, L.V. Slivka

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

The influence of synthetic auxin — picloram on the frequency of morphogenic callus formation and regeneration of shoots after *Agrobacterium*-mediated transformation of selection-valuable genotypes of winter wheat was studied. It was shown that the presence of picloram in the nutrient medium contributed to the formation of a callus of greater mass, which is capable to longer cultivation in vitro compared to callus formed on a medium with 2,4-D, while maintaining regenerative capacity. In calluses obtained on medium with 2,4-D, a relatively higher number of necrosis was observed and the transition of tissues to the mor-

phogenic state occurred 3–5 days later compared to calluses obtained on media with picloram. The formation of the maximum amount of morphogenic callus for all studied genotypes was observed on medium with the addition of picloram at a concentration of 2 mg/l. The viability of the morphogenic callus obtained on the medium with picloram exceeds the duration of cultivation of the callus obtained on the medium with 2,4-D, on average by 30 days. It is established that the use of picloram in regeneration media allows to increase the frequency of shoot formation during genetic transformation of wheat. On the medium with the addition of this auxin at a concentration of 2 mg/l it was able to obtain the largest number of regenerants. At this concentration of picloram it revealed a significant increase in the number of plants compared to the medium containing IOC. The regeneration potential of callus obtained on medium with 2,4-D after genetic transformation was maintained for a maximum of 2 passages, while regenerating plants from callus formed on medium with picloram were obtained for 3–4 passages.

Key words: *Triticum aestivum*, picloram, morphogenesis, *Agrobacterium*-mediated transformation.