

# CALLUS INDUCTION AND REGENERATION EFFICIENCY FROM IMMATURE EMBRYOS OF BARLEY CULTIVARS

## INDUKČNÍ A REGENERAČNÍ SCHOPNOST KALUSŮ ODVOZENÝCH Z NEZRALÝCH EMBRYÍ GENOTYPŮ JEČMENE

**Šerhantová V.**

Ústav pěstování a šlechtění rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: veser@seznam.cz

### ABSTRACT

Limited regeneration efficiency of the cell cultures derived from certain barley genotypes restricts their use for transformation experiments. Immature zygotic embryos are often used to initiate *in vitro* cultures for the genetic transformation. Eleven selected genotypes of spring barley (Czech varieties; varieties registered in the CR and the variety Golden Promise) were used to study the effect of the synthetic auxins 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), dicamba and picloram on regeneration efficiency. Scutella separated from immature embryos were axenically cultured on CI medium (Wang and Lemaux, 1994) with varied concentrations of auxins: 2,4-D (2.5 mg l<sup>-1</sup>), dicamba (2.5 mg l<sup>-1</sup>) and picloram (2.0 mg l<sup>-1</sup>) in the dark. After 4 wk, healthy calluses were transferred to FW regeneration medium (Harwood et al., 1995) and cultivated in the light at 25°C. The frequency of callus induction depended on genotype and auxin used and ranged from 85% to 100%. The number of green regenerants was influenced significantly by both genotype and auxin concentration. The highest average number of regenerants (2.7 plants per scutellum) was obtained with Golden Promise. Compared to this variety, the variety Scarlett had significantly lower number of regenerants (1.53 plants per one cultivated scutellum). The varieties Orthega (1.05), SG-S-261 (1.04), Viktor (0.97) and Granát (0.9) varied statistically by the average number of the regenerated plants per one cultivated scutellum from the varieties with the lowest number of the regenerated plant, i.e. Nordus (0.42), Amulet (0.45), Akcent (0.51). The most of genotypes produced the most regenerants when the calluses induced on medium that contained 2,4-D.

**Keywords:** callus induction, regeneration, auxin, barley

### ABSTRAKT

Nízká regenerační schopnost buněčných kultur ječmene do značné míry omezuje genetické manipulace. Nezralá zygotická embrya jsou nejčastěji používána pro iniciaci buněčných kultur *in vitro* i pro genetické transformace. U jedenácti genotypů jarního ječmene (české odrůdy, novošlechtění, odrůdy registrované v ČR a Golden Promise) byl sledován vliv tří syntetických auxinů (kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové, dicamby a picloramu) na indukci kalusu a regeneraci

rostlin. Izolované štítky nezralých zygotických embryí byly kultivovány *in vitro* ve tmě na médiu CI (Wang a Lemaux, 1994) s různou koncentrací auxinů: 2,4-D ( $2.5 \text{ mg l}^{-1}$ ), dicamba ( $2.5 \text{ mg l}^{-1}$ ) a picloram ( $2.0 \text{ mg l}^{-1}$ ). Po čtyřech týdnech byly zdravé kalusy přeneseny na regenerační médium FW (Harwood a kol., 1995) a kultivovány na světle. Frekvence tvorby kalusů závisela na genotypu a použitém auxinu a pohybovala se od 85 % do 100 %. Počet zelených regenerantů byl signifikantně ovlivněn jak genotypem tak auxinem. Nejvyšší průměrný (ze všech tří auxinů) počet regenerantů (2.7 rostliny na jeden kultivovaný štítek) byl získán u odrůdy Golden Promise. V porovnání s touto odrůdou měla signifikantně nižší počet regenerantů odrůda Scarlett (1.3). Odrůdy Orthege (1.05), novošlechtění SG-S-261 (1.04), Viktor (0.97), Granát (0.9) s vyšším průměrným počtem regenerovaných rostlin se statisticky vysoce významně lišily od odrůd s nejnižším počtem regenerovaných rostlin Nordus (0.42), Amulet (0.45), Akcent (0.51) a novošlechtění SG-S-252 (0.58). Většina genotypů produkovala nejvíce zelených rostlin po indukci kalusu na médiu s 2,4-D.

**Klíčová slova:** indukce kalusu, regenerace, 2,4-D, auxin, ječmen

## ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) je nejen hospodářsky významnou obilninou, ale také vhodným materiálem pro genetické a fyziologické experimenty. *In vitro* jsou studovány indukční a regenerační systémy, které jsou pak využívány pro genetické transformace. Nízká regenerační schopnost buněčných kultur jednoděložných rostlin však do značné míry genetické manipulace omezuje. Kalus je nejčastěji indukován z pletiva nezralých zygotických embryí (Kachhawaha a Kothari, 1996), která se používají i pro genetické transformace (Harwood a kol., 2000). Jedny z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují indukční a regenerační schopnost *in vitro* kultury ječmene jsou genotyp a složení média (Goldstein a Kronstad, 1986; Bregitzer, 1992). Důležitou složkou kultivačního média jsou fytohormony – auxiny, které jsou nezbytné pro indukci kalusu (Bregitzer a kol., 1995).

## MATERIÁL A METODY

### Rostlinný materiál

Pro testování indukční a regenerační schopnosti bylo vybráno jedenáct genotypů jarního ječmene, české odrůdy – Akcent, Amulet, Granát, Orbit, Viktor, novošlechtění – SG-S-252, SG-S-261, odrůdy registrované v ČR – Nordus, Orthege, Scarlett a odrůda Golden Promise.

Donorové rostliny byly pěstovány v kultivační komoře při 16 hodinové fotoperiodě s hladinou světla  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  a při teplotním režimu den/noc – 19/17 °C.

### Indukce a kultivace kalusů

Klasy ječmene byly odebrány 10 - 15 dní po opylení, kdy nezralá zygotická embrya byla velká 1,5 - 2,0 mm. Zrna byla povrchově sterilizována nejprve minutu v 70 % ethanolu, potom 20 minut v 6 % roztoku chlornanu sodného a následně byla třikrát promyta sterilní vodou. Pod

binokulární lupou byla z obilek extirpována nezralá zygotická embrya, u každého z embryí byl odstraněn axis. Štítky embrya byly kultivovány na médiu pro indukci kalusu CI (Wang a Lemaux, 1994) s přidavkem auxinů. Sledován byl vliv tří syntetických auxinů: 2,4-D (2,4-dichlorphenoxyoctová kyselina) v koncentraci 2,5 mg.l<sup>-1</sup>, dicamby (3,6-dichloro-2-methoxybenzoová kyselina) v koncentraci 2,5 mg.l<sup>-1</sup> a picloramu (4-amino-3,5,6-trichloropicolinová kyselina) v koncentraci 2,0 mg.l<sup>-1</sup> na indukční a regenerační schopnost ječmene.

Explantáty byly kultivovány čtyři týdny ve tmě při teplotě 25 °C. Po 14 dnech se na povrchu kultivovaného pletiva začal vytvářet kalus a somatická embrya. Explantáty byly rozděleny na menší části a pasážovány na čerstvé indukční médium. Po indukci ve tmě byly zdravé kalusy přeneseny na regenerační médium FW (Harwood a kol., 1995), které již neobsahovalo auxiny a kultivace probíhala na světle při 16 h světelné fotoperiodě při teplotě 25°C. Regenerační schopnost kalusů byla hodnocena za 4 až 6 týdnů.

### Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit program UNISTAT. Experimentální údaje byly hodnoceny vícefaktorovou analýzou variance. Statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ) byly zjišťovány pomocí Tukeyova testu.

### VÝSLEDKY A DISKUZE

Indukce kalusů byla hodnocena za 4 týdny od začátku kultivace. Frekvence tvorby kalusů byla ovlivněna jak použitým auxinem tak i genotypem a pohybovala se v rozmezí od 85 % do 100 %. Rovněž struktura kalusu byla rozdílná od tvrdého, kompaktního, sytě žlutého až po měkký, vodnatý, drobný, rozpadavý, smetanově bílý až průhledný a měnila se v závislosti na genotypu a použitém auxinu.

Počet zelených regenerovaných rostlinek byl také statisticky významně ovlivněn jak genotypem tak použitým auxinem. Rovněž interakce genotypu a auxinu byly statisticky významné (tab. 1).

Tab. 1: Analýza rozptylu

Zdroj variability	n	SS	MS
Genotyp	10	647,538	64,754***
Auxin	2	339,778	169,889***
Genotyp x auxin	20	297,446	14,872***
Chyba	1617	3021,15	1,868
Celkem	1649	4305,877	2,611

\*\*\*  $P \leq 0,001$

Nejvyšší průměrný počet (ze všech tří auxinů) regenerantů (2,70 rostlinek/štítek) byl získán u odrůdy Golden Promise. Statisticky významně nižší počet regenerovaných rostlin v porovnání s touto odrůdou měly odrůdy Scarlett (1,53), Orhega (1,05) a novošlechtění SG-S-261 (1,04). Ve srovnání s těmito odrůdami byl signifikantně nejnižší průměrný počet zelených regenerantů u odrůd Nordus (0,42), Amulet (0,45), Akcent (0,51), Orbit (0,64) a novošlechtění SG-S-252 (0,58), tab. 2.

Tab. 2. Průměrný počet (ze všech tří auxinů) regenerovaných rostlin získaný u jednotlivých genotypů

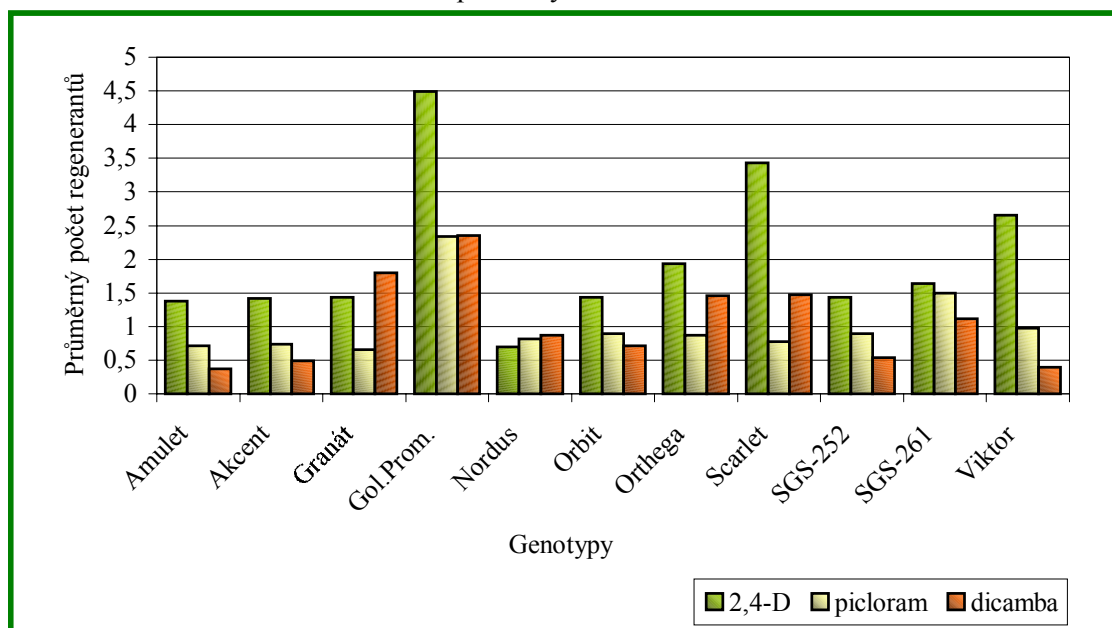
Genotyp	Průměrná hodnota	Významnost
Nordus	0,42	a
Amulet	0,45	a
Akcent	0,51	a
SG-S-252	0,58	a
Orbit	0,64	ab
Granát	0,90	bc
Viktor	0,97	bc
SG-S-261	1,04	c
Orhega	1,05	c
Scarlett	1,53	d
Golden Promise	2,70	e

Poznámka: Průměry označené odlišnými písmeny jsou statisticky významně odlišné

U většiny genotypů rostliny nejvíce regenerovaly po indukci kalusu na médiu s 2,4-D: Golden Promise (4,50 rostlinek/štítek), Scarlett (3,43), Viktor (2,66), tento počet byl statisticky významný v porovnání s počtem regenerantů získaných po indukci kalusu na médiu s dicambou nebo picloramem. Pouze odrůda Granát (1,80) tvořila signifikantně více zelených regenerantů po indukci kalusu na médiu s dicambou (graf 1, tab.3).

Auxiny a kombinace auxinů také testovali Przetakewicz a kol. (2003). U sedmi z osmi odrůd nejvíce rostlin regenerovalo po indukci kalusu na médiu s dicambou v kombinaci s 2,4-D, nebo na médiu které obsahovalo pouze dikambu. Nejnižší počet regenerantů byl získán na médiu s přídavkem picloramu i v kombinaci s 2,4-D. Podobné výsledky uvádí Castillo a kol. (1998) pro odrůdy pěstované ve Španělsku. Lühns a Lörz (1978) hodnotili indukci embryonálního kalusu na médiu s přídavkem 2,4-D, dicambou, picloramem a 2,4,5-T. Podle těchto autorů především závisí na koncentraci jednotlivých auxinů obsažených v indukčním médiu.

Graf 1: Průměrný počet regenerantů získaných z jednoho nezralého štítku po indukci na médiu s příslušným auxinem



Tab. 3: Průměrný počet regenerovaných rostlin z kalusů indukovaných na médiu s auxinem

Genotype	Auxin					
	2,4-D		Picloram		Dicamba	
Amulet	1,38	<b>b</b>	0,72	<b>a</b>	0,38	<b>a</b>
Akcent	1,42	<b>b</b>	0,74	<b>a</b>	0,50	<b>a</b>
Granát	1,44	<b>b</b>	0,66	<b>a</b>	1,80	<b>b</b>
Golden Promise	4,50	<b>b</b>	2,34	<b>a</b>	2,36	<b>a</b>
Nordus	0,70	<b>a</b>	0,82	<b>a</b>	0,88	<b>a</b>
Orbit	1,44	<b>b</b>	0,90	<b>a</b>	0,72	<b>a</b>
Orthega	1,94	<b>c</b>	0,88	<b>a</b>	1,46	<b>b</b>
Scarlet	3,43	<b>c</b>	0,78	<b>a</b>	1,48	<b>b</b>
SGS-252	1,44	<b>b</b>	0,90	<b>a</b>	0,54	<b>a</b>
SGS-261	1,64	<b>b</b>	1,50	<b>ab</b>	1,12	<b>a</b>
Viktor	2,66	<b>b</b>	0,98	<b>a</b>	0,40	<b>a</b>

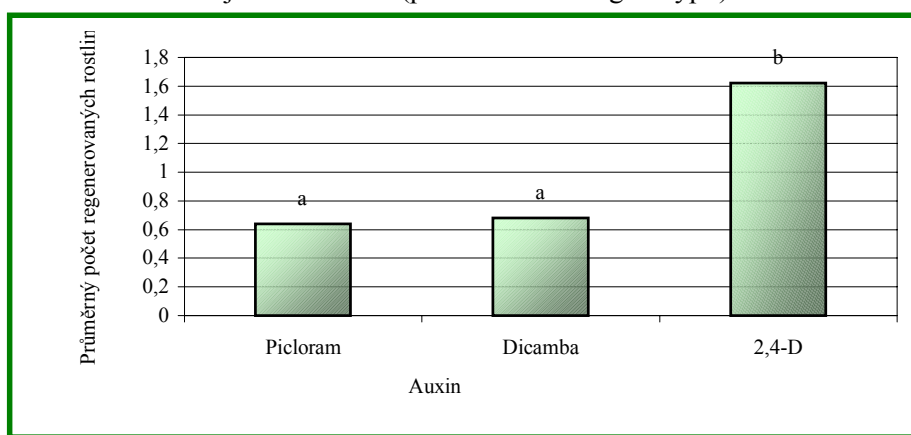
Rovněž průměrné hodnoty počtu regenerantů (ze všech genotypů) ukazují, že signifikantně nejvíce rostlin regenerovalo po indukci kalusu na médiu s přidávkem 2,4-D (graf 2).

## ZÁVĚR

Byl sledován vliv tří syntetických fytohormonů - auxinů (2,4-D, picloram, dicamba) na indukci kalusu a regeneraci rostlin. Kalus byl odvozen ze štítků nezralých zygotických embryí ječmene. U většiny testovaných genotypů byl nejvyšší průměrný počet regenerovaných zelených rostlin získán po indukci kalusu na médiu s 2,4-D. Nejvíce rostlin regenerovalo u odrůdy Golden Promise, Scarlett a Viktor. Tyto odrůdy u nichž byla získána nejvyšší regenerační schopnost by proto mohly být vhodným materiálem pro následné genetické transformace.

Kvalita a kvantita kalusů i počet regenerantů závisí na genotypu a na použitém auxinu, jak dokazují získané výsledky.

Graf 2: Vliv auxinu v indukčním mediu na počet rostlin regenerovaných z jednoho štítku (průměr ze všech genotypů)



## POUŽITÁ LITERATURA

- Bregitzer, P.: Crop Sci. 32: 1108-1112, 1992.
- Bregitzer, P., Robert D.C., Ying, W.: Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 43: 229-235, 1995.
- Castillo, A.M., Egana, B., Sanz, J.M., Cistué, L.: Pl. Cell Reports 17: 902-906, 1998.
- Goldstein, C. S., Kronstad, W. E.: Theor. Appl. Genet. 71: 631-636, 1986.
- Harwood, W.A., Bean, S.J., Chen, D-F., Mullineaux, P.M., Snape, J.W.: Euphytica 85:113-118, 1995.
- Harwood, W.A., Ross, S.M., Cilento, P., Snape, J.W.: Euphytica 111: 67-76, 2000.
- Kachhwaha, S., Kothari, S. L.: Cereal Res.Comm. 24 (1): 27-32, 1996.
- Lühns, R., Lörz, H.: Theor. Appl. Genet. 75: 16-25, 1987.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A.: Plant Cell, Tiss. Org. Cult.: 73: 245-256, 2003.
- Wan Y., Lemaux P.G.: Plant Physiol. 104: 37-48, 1994.