

УДК: 581.143.6:58.085

## **КАЛЮСОГЕНЕЗ І РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРІ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ**

**С. Пикало**

*Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України  
с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл. 08853, Україна  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Досліджено процеси калюсогенезу та регенерації пагонів у культурі апікальних меристем 3-добових проростків 6 генотипів тритикале озимого. Встановлено, що всі досліджувані генотипи мали різну здатність до індукції калюсу та регенерації пагонів. У вивчених форм відмічено генотипову залежність процесів утворення пагонів у культурі *in vitro*. З індукованих калюсів отримано рослини-регенеранти, оптимізовано їх дорощування, укорінення та переведення в умови *in vivo*. Лінія 38/1296 характеризувалася найвищим регенераційним потенціалом і може бути рекомендована для подальших біотехнологій тритикале.

*Ключові слова:* тритикале озиме, генотип, апікальна меристема, морфогенний калюс, регенерація.

Тритикале є важливою продовольчою та кормовою культурою [2]. У програмах селекційного поліпшення тритикале великого значення набувають роботи з клітинної інженерії. Тому дослідження з оптимізації та підбору умов для успішної індукції калюсогенезу, субкультивування і регенерації рослин у культурі тканин тритикале лишаються досить актуальними [3, 7]. Відомо, що злаки є складним об'єктом з точки зору експериментальної біотехнології. Однією з причин, які обумовлюють складність отримання калюсної тканини у злаків порівняно з дводольними, є нездатність до утворення раневого калюсу в природних умовах [9].

Згідно з літературними джерелами, на процеси калюсогенезу й утворення пагонів у культурі *in vitro*, крім генотипу, також значно впливає тип експланта [11]. Однак досі не вирішена проблема його надійності, доступності в будь-яку пору року та здатності до індукції калюсу з високим регенераційним потенціалом, який зберігає морфогенну активність протягом тривалого часу [1]. Традиційним типом експланта для злакових, зокрема тритикале, є незрілі зародки. Проте їх використання має певні обмеження, оскільки ці зародки доступні досить короткий час протягом вегетаційного періоду [15]. Цей факт змусив біотехнологів шукати альтернативні типи експлантів: зрілі зародки, незрілі суцвіття, сегменти колеоптиля, мезокотилія та молодих листків [16].

Останнім часом значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найбільш перспективного експланта для злакових культур [8]. Перевагою даного типу експланта є можливість подолання генотипових особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час. Дослідники багатьох країн світу успішно працюють із апексами пагонів проростків кукурудзи, вівса, сорго, проса, пшениці, тритикале та ячменю для розробки ефективних і менш залежних від генотипу систем регенерації зернових [18]. Культуру апікальних меристем широко використовують як джерело калюсної тканини для

клітинної селекції та генетичної трансформації рослин, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться та характеризуються високою частотою індукції калюсу – до 90% [20].

Із літературних джерел відомо, що морфогенез *in vitro* характеризується багатьма аспектами, такими як фітогормональне сприйняття, дедиференціація диференційованих клітин для надбання компетентності до органогенезу, повернення спочиваючих клітин до клітинного циклу й організація поділу клітин для формування примордіїв певних органів і меристем [4, 19]. Попередні експерименти з культивованими клітинами пшениці показали, що не тільки склад живильних середовищ, умови культивування, тип тканин експланта, умови підготовки рослинного матеріалу до введення його в культуру, але й генотипові особливості впливають на результати роботи [18]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити особливості процесів калюсогенезу та регенерації рослин у культурі апікальних меристем пагонів різних генотипів тритикале озимого.

#### Матеріали та методи

Як об'єкт дослідження використано генотипи тритикале озимого: сорти Обрій, Миролан, АДМ 11, лінії 38/1296, 1324 та гібрид F<sub>2</sub> 809, які були взяті з робочої колекції Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН України.

Для отримання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1%-ним розчином KMnO<sub>4</sub> протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували в 1%-ному розчині AgNO<sub>3</sub> і поміщали у 96%-ний етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було 3-разове промивання стерильною дистильованою водою. Отримане простерилізоване насіння пророщували на світлі при 24°C на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [17]. Донорні рослини культивували у скляному посуді об'ємом 200 мл, в який було розлито по 30 мл безгормонального середовища МС. Як експланти використовували апікальну меристему пагонів 3-добових стерильних проростків. Розмір експлантів варіював у межах 1,5–2 мм. Для кожного генотипу було взято по 160 експлантів (4 чашки Петрі по 40 експлантів).

Культуру калюсної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, AgNO<sub>3</sub> – 10 мг/л та 2,4-Д – 2 мг/л. Експланти культивували при 26°C у темряві впродовж трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді ще протягом двох тижнів. Наприкінці пасажу визначали частоту індукції калюсу (у відсотках) як співвідношення числа експлантів, що утворили калюс, до їх загального числа.

Для індукції морфогенезу калюси переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК. Отримані пагони в міру розвитку переносили на безгормональне середовище МС із половинним вмістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували у горщики зі спеціально підбраною ґрунтовою сумішшю і поміщали у вологу камеру на 7–14 діб. Добре укорінені рослини переносили у ґрунт.

Частоту морфогенезу та регенерації пагонів (у відсотках) по кожному варіанту визначали як співвідношення числа морфогенних калюсів або регенерантів до початкової кількості висаджених експлантів. Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу [5].

#### Результати і їхнє обговорення

У процесі роботи було виявлено, що досліджувані генотипи тритикале озимого характеризуються різною здатністю до індукції калюсу, яка варіює від 68,6% у сорту АДМ 11 до 95,4% у лінії 38/1296 (див. таблицю).

## Частота морфогенезу тритикале в культурі апікальних меристем пагонів

Генотип	Загальна кількість отриманих калюсів, %	Кількість отриманих морфогенних калюсів, %	Частота регенерації, %
Сорт Обрій	90,7±2,3	46,5±3,9	13,9±2,7
Сорт Миролан	80,4±3,1	49,7±4,0	12,7±2,6
Сорт АДМ 11	68,6±3,6	26,7±3,5	8,6±2,2
Лінія 38/1296	95,4±1,7	58,4±3,9	36,4±3,8
Лінія 1324	78,6±3,2	35,4±3,8	11,7±2,5
Гібрид F <sub>2</sub> 809	80,3±3,1	39,2±3,9	11,2±2,5

Ініціацію калусогенезу з утворенням прозорого світлого калюсу аморфної консистенції у наших дослідках спостерігали вже через 3–4 доби. Після 3–4 тижнів культивування було виявлено два типи калюсу, які розрізняли за морфофізіологічними властивостями: морфогенний калюс – щільний, жовтуватий, глобулярний, який виявився здатним на середовищі для регенерації індукувати розвиток морфогенних структур, та неморфогенний калюс – пухкий і водянистий (рис. 1).



а

б

Рис. 1. Типи індукованих калюсів тритикале: а – морфогенний; б – неморфогенний.

Через 2 тижні після перенесення калюсів на світло на поверхні частини з них відмічали появу щільних зелених ділянок. Протягом подальшого культивування частина таких морфогенних калюсів формувала рослини-регенеранти. Нами було виявлено, що всі досліджувані генотипи тритикале утворювали морфогенний калюс, однак із різною частотою. Найбільша частота його утворення виявлена у лінії 38/1296 (58,4%), а також у сортів Миролан (49,7%) і Обрій (46,5%). Найменшою ж частотою утворення морфогенного калюсу характеризувався сорт АДМ 11 – 26,7% (див. таблицю).

Після перенесення на регенераційне середовище на калюсах спостерігали утворення щільних зелених або світло-жовтих глобулярних ділянок. Такі калюси залучали до ембріогенних. Упродовж подальшого культивування відмічено формування регенерантів із глобулярних ділянок, тоді як на щільних зелених ділянках спостерігали інтенсивний ризогенез. На 7–11 добу культивування на регенераційному середовищі в калюсах відмічені такі шляхи морфогенезу: органогенез за типом геморизогенезу (формування бруньки та кореня) чи ризогенезу (формування кореня) та соматичний ембріогенез – формування соматичних зародків. Відомо, що соматичний ембріогенез біотехнологічно оптимальний,

оскільки в даному випадку формування рослини починається із проростання зародка, який має усі сформовані органи [13]. Найбільшу частоту утворення соматичних зародків було відмічено на 22–26 добу, а геморизогенних структур – на 26 добу культивування після пересадки калюсів на регенераційне середовище МС.

Зазначимо, що регенерацію пагонів відмічали у всіх досліджуваних генотипів. Однак серед них виявилися значні розбіжності у регенераційній здатності. Найбільшу частоту регенерації зелених пагонів мала лінія 38/1296 – 36,4%. Найменша ж частота була виявлена у сорту АДМ 11 – було отримано лише 8,6% регенерантів. Отримані рослини-регенеранти в подальшому розвивались подібно до інтактних рослин тритикале в умовах *in vivo*. Відзначали типові фенофази сходів, третього листка, кущіння. Рослини-регенеранти у фенофазі кущіння переносили в умови *ex vitro* у горщики з ґрунтовою сумішшю (рис. 2).

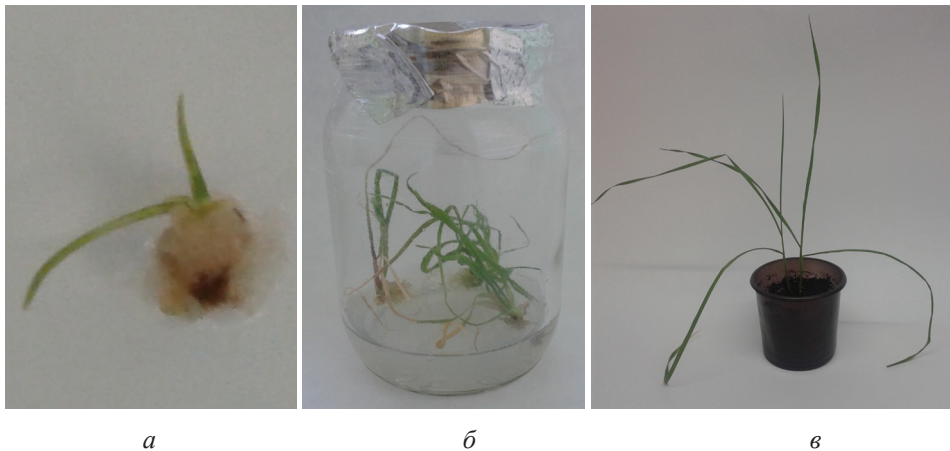


Рис. 2. Етапи морфогенезу та регенерації рослин тритикале озимого: *a* – початок регенерації пагонів; *б* – укорінення рослин-регенерантів; *в* – переведення рослин в умови ґрунту.

Одним із показників, який визначає ефективність регенерації, є кількість отриманих пагонів з одного калюса. Нами було виявлено, що з одного калюса утворювалося від 1 до 6 пагонів (рис. 3).

Як видно з рис. 3, спостерігався значний вплив генотипу на цей показник. Серед досліджуваних генотипів середня кількість пагонів з одного калюса коливалась від 1,8 у сорту АДМ 11 до 5,6 у лінії 38/1296, яка відрізнялась і найвищою частотою регенерації. А ось сорт Обрій, який характеризувався відносно високим регенераційним потенціалом, формує значну кількість регенерантів, ймовірно, за рахунок високої частки калюсів, які здатні до регенерації, оскільки кожен окремих калюс утворював у середньому 3,8 пагона. Сорт з низькою регенераційною здатністю АДМ 11 відрізнявся і найменшою кількістю пагонів, що утворювались з одного калюса, – 1,8.

Різна частота калюсоутворення, що спостерігається в наших дослідах, і значні відмінності між генотипами за частотою регенерації пагонів вказують на існування різних генетичних систем регуляції цих процесів. Деякі дослідники вважають, що такі ознаки, як здатність до індукції калюсу і регенераційний потенціал контролюються незалежними генетичними системами [6, 10]. За допомогою діалельного аналізу була доведена справедливості такого припущення для культури тканин незрілих зародків ячменю [14]. У деяких роботах також було продемонстровано вплив генотипу на регенераційну здатність культивованих тканин пшениці [4, 12].

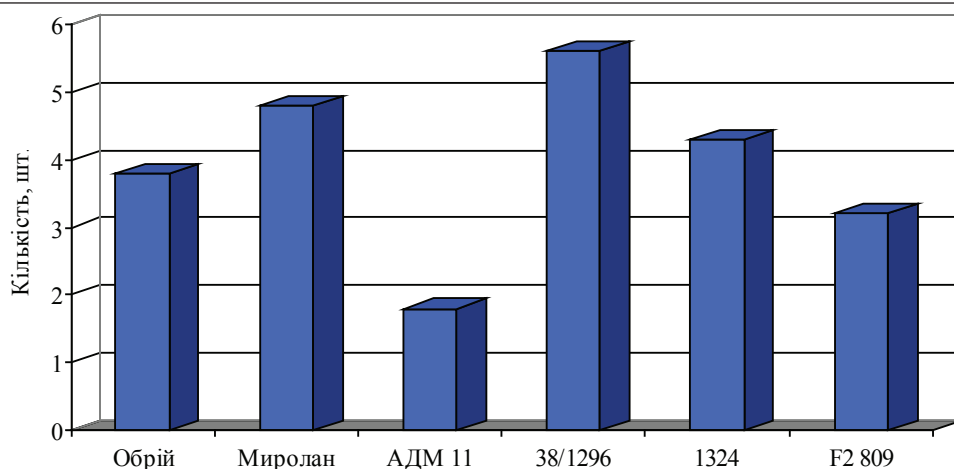


Рис. 3. Середня кількість пагонів, отриманих з одного калусу тритикале.

Таким чином, частота регенерації, досягнута в умовах дослідження за використання у ролі експланта апікальної меристеми пагонів проростків, певною мірою здатна задовольнити потреби сучасної біотехнології тритикале. Хоча регенераційний потенціал цього типу експланта трохи нижчий порівняно з незрілими зародками, його доступність у будь-який період року дає змогу протягом короткого проміжку часу отримувати значну кількість рослин-регенерантів. На основі проведених досліджень можна зробити висновок, що серед проаналізованих генотипів найбільшою частотою індукції калусу та регенерації пагонів характеризувалася лінія 38/1296, з експлантів якої було отримано найбільшу кількість рослин-регенерантів. Лінію 38/1296 можна рекомендувати для подальших робіт, пов'язаних з біотехнологіями тритикале, зокрема для генетичної інженерії та клітинної селекції.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Особливості процесів морфогенезу в культурі листкових експлантів озимої пшениці // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. праць. К.: Логос, 2007. Т. 2. С. 444–448.
2. Білітюк А. П., Гірко В. С., Каленська С. М., Андрушків М. І. Тритикале в Україні. К.: Арістей, 2004. 388 с.
3. Волощук С. І., Заліський О. О., Філонченко П. О., Волощук Г. Д. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаметоїдних ліній тритикале // НТБ МПП ім. В.М. Ремесла. 2012. Вип. 11–12. С. 320–334.
4. Гончарук О. М., Бавол А. В., Дубровна О. В. Морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 3. С. 245–251.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Омелянчук Н. А., Гвоздев А. В. Использование изогенных линий для изучения каллусообразования и регенерации // Использование изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах. Новосибирск, 1990. С. 96–98.
7. Пикало С. В., Волощук С. І. Вивчення стійкості до засолення генотипів тритикале озимого з використанням культури ізольованих мікроспор // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 3. С. 267–273.

8. *Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M.* Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 2002. Vol. 38. N 2. P. 163–168.
9. *Barro F., Martin A., Lazzeri P., Barcel P.* Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum // *Euphytica.* 1999. Vol. 108. N 3. P. 161–167.
10. *Galiba G., Kovacs G., Sutka J.* Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat // *Plant Breed.* 1986. Vol. 97. P. 261–263.
11. *Haliloglu K.* Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // *Biologia Plantarum.* 2006. Vol. 50. N 3. P. 326–330.
12. *Henry Y., Marcotte J., De Buyser J.* Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines // *Theor. Appl. Genet.* 1994. Vol. 89. P. 344–350.
13. *Immonen A. S. T.* Amino acid medium for somatic embryogenesis from immature triticale (*Triticosecale* Wittmack) embryos // *Cereal Res. Comm.* 1993. Vol. 21. N 1. P. 51–55.
14. *Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K.* Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // *J. Hered.* 1989. Vol. 80. P. 345–350.
15. *Lörz H., Göbel E., Brown P.* Advances in tissue culture and progress towards transformation of cereals // *Plant Breed.* 1988. Vol. 100. N 1. P. 1–25.
16. *Mendoza M., Kaeppler H.* Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2002. Vol. 38. N 1. P. 39–45.
17. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–479.
18. *Patnaik D., Khurana P.* Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // *Electronic J. Biotech.* 2001. Vol. 4. P. 74–102.
19. *Pizetakiwicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.* The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 2003. Vol. 73. N 3. P. 245–256.
20. *Zhang S., Zhang H., Sticklen H. B.* Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol.* 1996. Vol. 148. N 6. P. 667–671.

Стаття: надійшла до редакції 06.10.14

доопрацьована 03.03.15

прийнята до друку 27.03.15

## CALLI FORMATION AND PLANT REGENERATION OF WINTER TRITICALE IN SHOOT APICAL MERISTEM CULTURE

S. Pykalo

*The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine  
P. O. Tsentralne, Myronivka district, Kyiv region 08853, Ukraine  
e-mail: pykserg@ukr.net*

The processes of callus formation and regeneration of shoots in culture of apical meristems of 3-days seedlings for 6 genotypes of winter triticale were investigated. It was established that all the genotypes studied were characterized by different ability to callus

formation and shoot regeneration. In the forms studied genotypic dependence of processes of shoot formation in culture *in vitro* was observed. From the induced calli plant regenerants were obtained and their rearing, rooting and transfer to *in vivo* conditions were optimized. The line 38/1296 was characterized the highest regeneration potential and it can be recommended for further biotechnology of triticale.

*Keywords:* winter triticale, genotype, apical meristem, morphogenic callus, regeneration.

## КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПОБЕГОВ

С. Пыкало

*Мироновский институт пшеницы имени В.Н. Ремесло НААН Украины  
с. Центральное, Мироновский р-н, Киевская обл. 08853, Украина  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Исследованы процессы каллусогенеза и регенерации побегов в культуре апикальных меристем 3-суточных проростков 6 генотипов тритикале озимого. Установлено, что все исследуемые генотипы характеризовались разной способностью к образованию каллуса и регенерации побегов. У изученных форм отмечена генотипическая зависимость процессов регенерации побегов в культуре *in vitro*. С индуцированных каллусов получены растения-регенеранты, оптимизированы их доращивание, укоренение и перевод в условия *in vivo*. Линия 38/1296 характеризовалась самым высоким регенерационным потенциалом и может быть рекомендована для дальнейших биотехнологий тритикале.

*Ключевые слова:* тритикале озимое, генотип, апикальная меристема, морфогенный каллус, регенерация.