

ПИКАЛО С. В.[✉], ДЕМИДОВ О. А., ЮРЧЕНКО Т. В., ПРОКОПІК Н. І., ГУМЕНЮК О. В.

Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН України,

Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне, вул. Центральна, 68

[✉] pykserg@ukr.net, (097) 659-12-65

РЕГЕНЕРАЦІЙНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПЕРСПЕКТИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ У КУЛЬТУРІ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ

Мета. Дослідити регенераційну здатність перспективних ліній пшениці м'якої озимої у культурі апікальних меристем 3-добових проростків. **Методи.** Культура тканин і органів *in vitro*, статистичний аналіз даних. **Результати.** Досліджено процеси морфогенезу ліній пшениці м'якої озимої в культурі апікальних меристем 3-добових проростків та встановлено, що у вивчених форм частота калюсогенезу та регенерації пагонів визначаються генотипом експланта. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Формування рослин-регенерантів із калюсів відбувалося шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріодогенезу. **Висновки.** Лінія Еритроспермум 60068 характеризувалася найвищим регенераційним потенціалом і може бути рекомендована для подальших біотехнологій пшениці. Відпрацьована технологія отримання повноцінних рослин-регенерантів ліній пшениці м'якої озимої у культурі апікальних меристем пагонів може бути використана у клітинній селекції та генно-інженерних експериментах.

Ключові слова: пшениця м'яка озима, апікальна меристема, генотип, калюс, регенерація пагонів.

Останніми роками біотехнологія є одним із новітніх інструментів досліджень сільськогосподарських культур. Біотехнологічні підходи прискорюють селекційний процес завдяки скороченню часу, необхідного для виведення сортів із поліпшеними характеристиками, а також доповнюють та розширюють генетичну мінливість, необхідну для отримання нових сортів із заданими ознаками [1–3]. Методи культури тканин *in vitro* різних експлантів (органів або частин органів, ізольованих від донорної рослини) нині широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин, зокрема пшениці [4–6].

Незважаючи на те, що культура *in vitro* злакових вже певний час використовується як

об'єкт досліджень, до сьогодні рослини з триби *Gramineae* вважаються одними із найскладніших для біотехнологічних робіт. Серед головних проблем, що обмежують застосування клітинних технологій у селекції злакових, є низька частота регенерації рослин із культивованих клітин і тканин. Одним із ключових чинників, що впливає на ефективність біотехнологічних робіт зі злаковими культурами, є вибір відповідного типу експланта. 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, 3]. Традиційним типом експланта для злакових, зокрема пшениці, є незрілі зародки. Проте їх використання має певні обмеження, оскільки вони доступні досить короткий час протягом вегетаційного періоду [7]. Цей факт змусив біотехнологів шукати альтернативні типи експлантів: зрілі зародки, незрілі суцвіття, сегменти колеоптіля, мезокотіля та молодих листків [3, 4, 7, 8].

Останнім часом значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найперспективнішого експланта для злакових культур, оскільки (порівняно з незрілими зародками) його перевагою є можливість подолання генотипових особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, та можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час [1, 9]. Цей тип експланта широко використовують як джерело калюсної тканини, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу – до 90 % [10–12]. Оскільки здатність рослин до регенерації на сьогодні розглядається в основному як генотипова особливість, актуальним є пошук генотипів із високим регенераційним потенціалом. У зв'язку з цим метою роботи було дослідити регенераційну здатність перспек-

тивних ліній пшениці м'якої озимої у культурі апікальних меристем 3-добових проростків.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були лінії конкурсного сортовипробування пшениці м'якої озимої: Лютесценс 37611, Лютесценс 60027, Лютесценс 37391, Еритроспермум 60025, Лютесценс 60049, Еритроспермум 60068, Лютесценс 60106, Еритроспермум 37326, Лютесценс 60100, Еритроспермум 37003. Зразки насіння отримано з рослин селекційного розсадника Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН, що вирощувались у польових умовах 2016/17 р.

Для отримання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1%-им розчином $KMnO_4$ протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували в 1%-у розчині $AgNO_3$ і поміщали у 96 % етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було 3-разове промивання стерильною дистильованою водою. Отримане простерилізоване насіння пророщували на світлі за $24^\circ C$ на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [13]. Донорні рослини культивували у скляному посуді об'ємом 200 мл, у який було розлито по 30 мл безгормонального середовища МС. Як експланти використовували апікальну меристему 3-добових стерильних проростків [9]. Розмір експлантів варіював у межах 1,5–2 мм. Для кожного генотипу було взято по 160 експлантів.

Культуру калусної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, $AgNO_3$ –10 мг/л та 2,4-Д–2 мг/л [9]. Експланти культивували за $26^\circ C$ у темряві впродовж трьох тижнів. Потім їх перенесли на світло і далі вирощували за освітлення 3–4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду ще протягом двох тижнів. Наприкінці пасажу визначали частоту індукції калусу (у відсотках) як співвідношення числа експлантів, що утворили калус, до їх загального числа. Для індукції морфогенезу калуси перенесли на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК [9]. Отримані пагони в міру розвитку перенесли 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 перенесли у ґрунт.

Частоту утворення морфогенного калусу та регенерації пагонів (у відсотках) для кожного варіанта визначали як співвідношення кількості морфогенних калусів або регенерантів до початкової кількості висаджених експлантів. Експериментально отримані дані обробляли методами статистичного аналізу [14].

Результати та обговорення

Із наукових літературних джерел [4, 7, 9] відомо, що морфогенез *in vitro* характеризується багатьма аспектами, зокрема 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. Тотипотентність культивованих клітин, тобто здатність перейти до виконання програми розвитку, визначається, насамперед, генотиповими особливостями, тому дослідження були розпочаті з вивчення реакції ліній пшениці на умови культивування *in vitro*. Початок калусогенезу в усіх досліджених форм спостерігали вже на третю-четверту добу культивування. Під час переходу до дедиференціації на експлантах утворювалася калусна тканина, і вони збільшувалися за розмірами (рис. 1).

У процесі роботи було виявлено, що досліджувані генотипи пшениці характеризуються різною здатністю до індукції калусу, яка варіювала від 65,6 % у Лютесценс 60049 до 95,6 % у Еритроспермум 60068 (табл.).

Після 3–4 тижнів культивування було виявлено два типи калусу, які розрізняли за морфологічними властивостями: морфогенний калус – щільний, жовтуватий, глобулярний, який виявився здатним на середовищі для регенерації індукувати розвиток морфогенних структур; неморфогенний калус – пухкий і водянистий, за подальшого культивування якого спостерігався некроз (рис. 2).

Протягом подальшого культивування частота морфогенних калусів формувала рослини-регенеранти. Виявлено, що всі досліджувані лінії пшениці утворювали морфогенний калус, однак із різною частотою. Найбільша частота його утворення виявлена у лінії Еритроспермум 60068 (56,9 %), а найменша – у лінії Лютесценс 60027 (26,3 %).

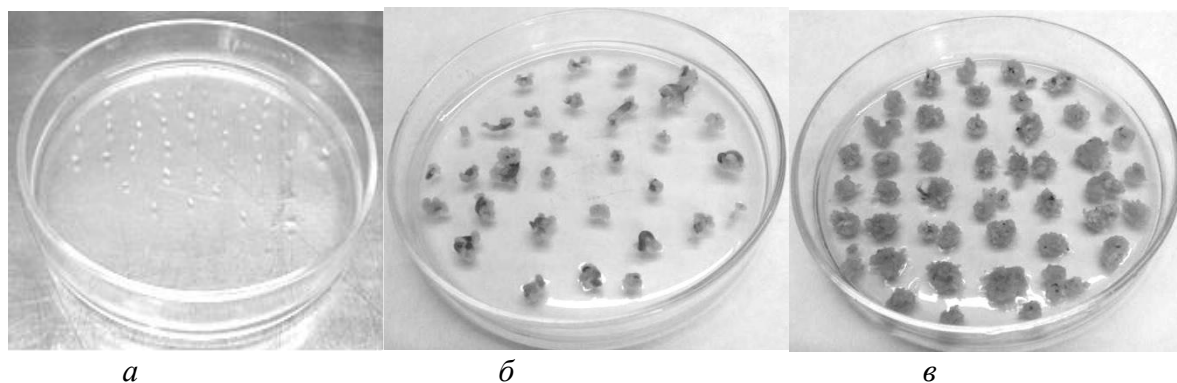


Рис. 1. Етапи індукції калюсу пшениці з апікальних меристем пагонів: *а* – вихідні експланти; *б* – початок калюсоутворення; *в* – сформовані калюси.

Таблиця. Частота морфогенезу пшениці в культурі апікальних меристем пагонів

Генотип	Частота індукції калюсу, %	Частота утворення морфогенного калюсу, %	Частота регенерації пагонів, %
Лютесценс 37611	88,1±2,6	43,1±3,9	22,5±3,3
Лютесценс 60027	68,8±3,7	26,3±3,5	9,4±2,3
Лютесценс 37391	77,5±3,3	45,6±3,9	18,8±3,1
Еритроспермум 60025	80,6±3,1	49,4±4,0	15,6±2,9
Лютесценс 60049	65,6±3,8	44,4±3,9	27,5±3,5
Еритроспермум 60068	95,6±1,6	56,9±3,9	35,0±3,8
Лютесценс 60106	82,5±3,0	49,4±4,0	13,8±2,7
Еритроспермум 37326	86,9±2,7	50,0±4,0	24,4±3,4
Лютесценс 60100	76,3±3,4	34,4±3,8	15,0±2,8
Еритроспермум 37003	81,3±3,1	41,9±3,9	13,1±2,7

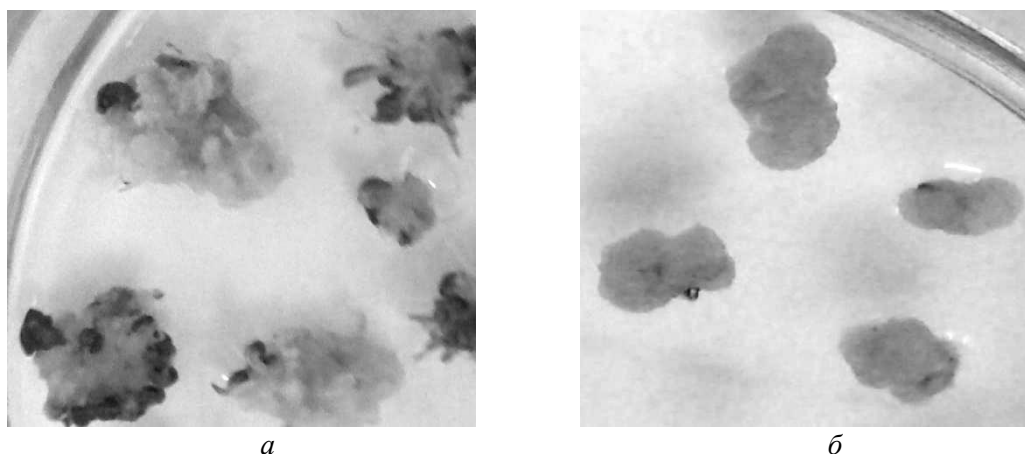


Рис. 2. Типи індукованих калюсів пшениці: *а* – морфогенні калюси; *б* – неморфогенні калюси.

Варто зазначити, що отримання морфогенних калюсів і подальша регенерація з них рослин – невід’ємна частина багатьох рослинних біотехнологій. У роботі М. І. Соболевої та І. В. Логінова [15] здійснена спроба визначити залежність морфогенної здатності клітинних культур пшениці м’якої ярої від різних факто-

рів. На їхню думку, тотипотентність і проліферація тісно пов’язані єдиним молекулярним механізмом, вимикання або порушення якого призводить в культурі *in vitro* до формування неморфогенного калюсу. А. Г. Мардамішин та А. Р. Мустафіна [16] встановили, що баланс ендогенних фітогормонів визначає подальшу

проліферацію калюсної тканини. Порівняльний імуноферментний аналіз наявності ендогенних фітогормонів у калюсній тканині гороху посівного виявив, що вміст цитокинінів у морфогенному калюсі набагато вищий, ніж у неморфогенному. Н. Н. Круглова і А. А. Катасонова [17] під час культивування *in vitro* різновікових зародків м'якої пшениці виявили, що основною умовою формування морфогенних калюсів є інокуляція експлантів із рослин на певній стадії органогенезу, яка характеризується певним цито-гістологічним статусом зародка. Введення в культуру експлантів на більш ранній або пізній стадії призводило до індукції неморфогенних калюсів. Автори дійшли висновку, що потенціал зародка пшениці стосовно реалізації калюсогенезу є істотно ширшим, ніж його морфогенетична здатність.

У ході подальшої роботи усі морфогенні калюси в міру розвитку пересаджували на середовище для регенерації. Як відомо, неоднорідність калюсних клітин зумовлює різні шляхи їх подальшого морфогенезу [9, 18]. У своїх дослідженнях ми спостерігали розвиток із морфогенного калюсу як соматичних ембріодів, так і геморизогенних структур (рис. 3).

Відомо, що соматичний ембріогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки в такому випадку формування рослини починається із проростання зародка, який має усі сформовані органи [18]. Найбільшу частоту утворення соматичних зародків було помічено на 22–26 добу культивування, а геморизогенних структур – на 26 добу вирощування після пересадки калюсів на регенераційне середовище МС.

Зазначимо, що регенерацію пагонів помічали у всіх досліджуваних генотипів, проте вона проходила по-різному. Найвищу її частоту мала лінія Еритроспермум 60068 (35,0 %), з експлантів якої одержано найбільшу кількість регенерантів. Найменша частота регенерації пагонів виявлена у лінії Лютесценс 60027 – було отримано менше 10 % рослин. Таким чином, генотип відіграє ключову роль у здатності формувати калюс із високою регенераційною здатністю. В багатьох роботах виявлені значні відмінності між сортами пшениці, ячменю та тритикале за показниками ефективності калюсоутворення і регенерації пагонів [3, 6, 19, 20].

Варто підкреслити, що, незважаючи на активний морфогенетичний процес у калюсних тканинах, у більшості генотипів отримано лише незначну кількість регенерантів. Основною причиною цього явища, на нашу думку, був ризогенез, тобто утворення лише самих коренів без наступної регенерації пагонів, що в подальшому істотно знижувало вихід рослин-регенерантів. Слід зазначити, що стабільна регенераційна здатність є необхідною умовою практичного застосування культури тканин *in vitro*, зокрема у клітинній селекції, яка спрямована на отримання стрес-стійких форм рослин.

Розвиток отриманих регенерантів у подальшому відбувався аналогічно до інтактних рослин пшениці в умовах *in vivo*. Позначалися типові фенофази сходів, третього листка, кушіння. Рослини у фенофазі кушіння переносили в умови *ex vitro* у пластикові стаканчики з ґрунтовою сумішшю (рис. 4).

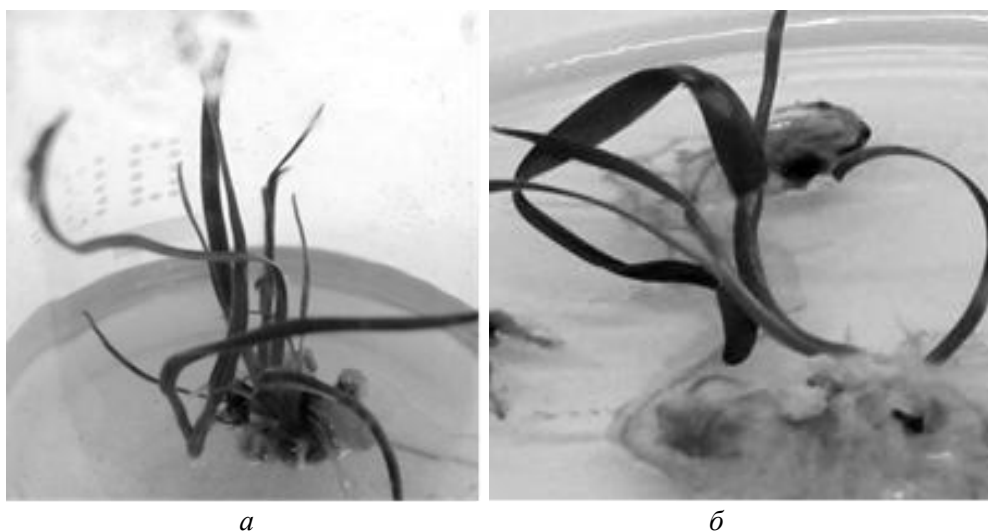


Рис. 3. Шляхи формування рослин-регенерантів пшениці у культурі *in vitro*: *a* – проростання соматичних зародків; *б* – прямий органогенез за типом геморизогенезу.

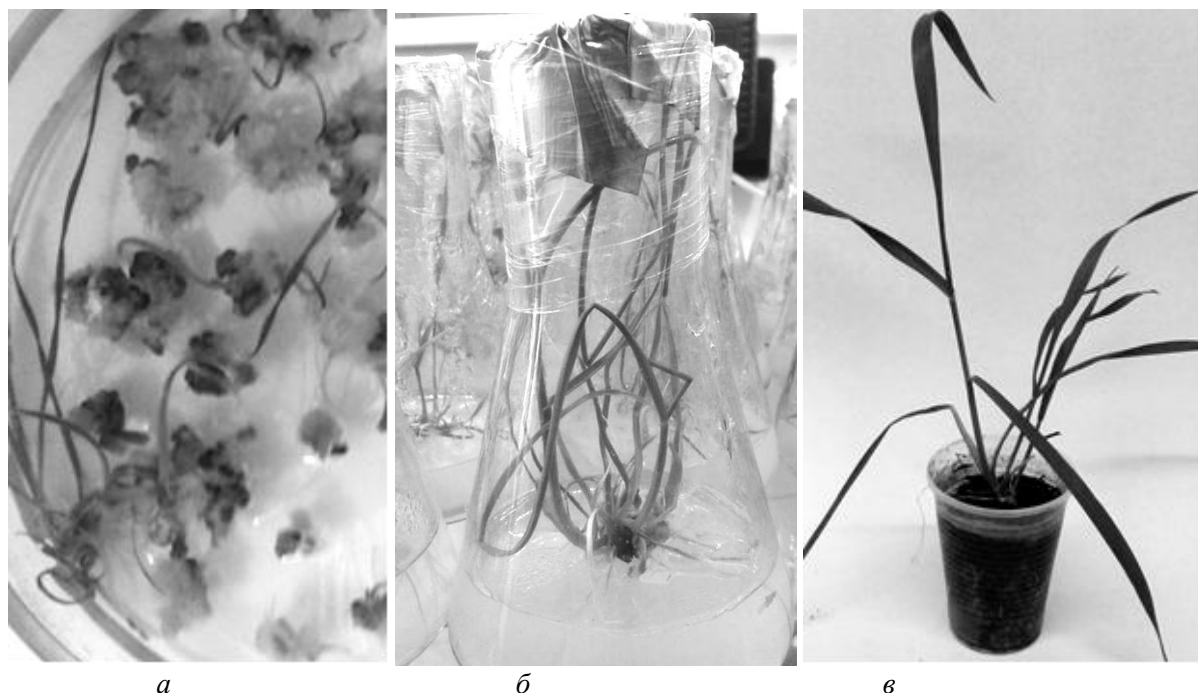


Рис. 4. Етапи отримання рослин-регенерантів пшениці: *а* – регенерація пагонів; *б* – укорінення пагонів; *в* – переведення регенерантів до умов *in vivo*.

Висновки

Таким чином, нами досліджено процеси морфогенезу перспективних ліній пшениці м'якої озимої в культурі апікальних меристем 3-добових проростків та встановлено, що у вивчених форм частота калюсогенезу та регенерації пагонів визначаються генотипом експланта. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Формування рослин-регенерантів із калюсів відбувалося шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріодогенезу. Серед проаналі-

зованих генотипів лінія Еритроспермум 60068 характеризувалася найвищим регенераційним потенціалом і може бути рекомендована для подальших робіт, пов'язаних із біотехнологіями пшениці, зокрема для генетичної інженерії та клітинної селекції. Відпрацьована технологія отримання повноцінних рослин-регенерантів ліній пшениці м'якої озимої у культурі апікальних меристем пагонів може бути використана у клітинній селекції та генно-інженерних експериментах.

References

1. Baval A.V., Dubrovna O.V., Lialko I.I. Plant regeneration from shoot tips of wheat. *Visnyk Ukr. tov-va henetykiv i selektsioneriv*. 2007. Vol. 5, № ½. P. 3–10. [in Ukrainian] / Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5, № 1/2. С. 3–10.
2. Dodig D., Zorić M., Mitić N., Nikolić R., Šurlan-Momirović G. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2008. Vol. 95, № 1. P. 107–114. doi: 10.1007/s11240-008-9421-x.
3. Baval A.V., Dubrovna O.V., Lialko I.I. Plant regeneration from various types of explants of common wheat. *Fiziologiya I Biokhimiya Kul'turnykh Rasteniy*. 2008. Vol. 40, № 2. P. 150–156. [in Ukrainian] / Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2008. Т. 40, № 2. С. 150–156.
4. Fazeli-nasab B., Omidi M., Amiritokaldani M. Callus induction and plant regeneration of wheat mature embryos under abscisic acid treatment. *Int J Agric Crop Sci*. 2012. Vol. 4. P. 17–23. doi: 10.12692/ijb/3.2.87-98.
5. Raja N.I., Bano A., Rashid H., Khan M.H., Chaudhry Z. Effect of age of embryogenic callus on plant regeneration in local cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 2009. Vol. 41, № 6. P. 2801–2806.
6. Shafi M., And F.U., Akmal M. Effect of cultivars and culture medium on callus formation and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot.* 2010. Vol. 42, № 1. P. 639–652.
7. Dağüstü N. Comparison of callus formation and plantlet regeneration capacity from immature embryo culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2008. Vol. 22, № 3. P. 778–781. doi: 10.1080/13102818.2008.10817552.
8. Yu H., Wang W., Wang Y., Hou B. High frequency wheat regeneration from leaf tissue explants of regenerated plantlets. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012. Vol. 3, № 01. P. 46–50. doi: 10.4236/abb.2012.31008.

9. Goncharuk A.N., Baval A.V., Dubrovna O.V. Morphogenesis in apical meristems culture of highly productive winter wheat varieties. *Fiziologiya Rasteniy I Genetika*. 2014. Vol. 46, № 3. P. 245–251. [in Ukrainian] / Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенез в культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46, № 3. С. 245–251.
10. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: In vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell Develop Biol*. 2002. Vol. 38, № 2. P. 163–168. doi: 10.1079/IVP2001267.
11. Zhang S., Zhang H., Sticklen H.B. Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*. 1996. Vol. 148, № 6. P. 667–671. doi: 10.1016/S0176-1617(96)80365-8.
12. Yasmin S., Khan I.A., Khatri A., Seema N., Nizamani G.S., Arain M.A. In vitro plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot*. 2009. V. 41, № 6. P. 2869–2876.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
14. Lakin G.F. Biometrics. (4th ed., rev.). Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p. [in Russian] / Лакин Г.Ф. Биометрия. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
15. Soboleva M.I., Loginov I.V. Statistical parameters reflecting morphogenetic capacity of soft spring wheat calluses. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 51, № 2. P. 257–265. doi: 10.1023/b:rupp.0000019223.23756.71.
16. Mardamishin A.G., Mustafina A.R. Comparative analysis of the content of endogenous phytohormones in the morphogenic and non-morphogenic callus tissue of pea. *Biotechnologiya*. 2001. Vol. 1. P. 27–29. [in Russian] / Мардамышин А.Г., Мустафина А.Р. Сравнительный анализ содержания эндогенных фитогормонов в морфогенной и неморфогенной каллусной ткани гороха посевного. *Биотехнология*. 2001. № 1. С. 27–29.
17. Kruglova N.N., Katasonova A.A. Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Fiziologiya I Biohimiya Kul'turnyh Rastenii*. 2009. Vol. 41, № 2. P. 124–131. [in Russian] / Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.
18. Batygina T.B. Embryogenesis and morphogenesis of reproductive and somatic embryos. *Fiziologiya Rasteniy*. 1999. Vol. 46, № 6. P. 888–898. [in Russian] / Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. *Физиология растений*. 1999. Т. 46, № 6. С. 888–898.
19. Chernov V.E., Pendinen G.I. Comparative evaluation callusogenesis and regeneration in different barley varieties. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya*. 2011. Vol. 1. P. 44–53. [in Russian] / Чернов В.Е., Пендинен Г.И. Сравнительная оценка каллусогенеза и регенерации у различных видов ячменя. *Сельскохозяйственная биология*. 2011. № 1. С. 44–53.
20. Pykalo S.V., Voloshchuk S.I., Voloshchuk H.D. Plant regeneration of winter triticale in culture of various types of explants. *Visnyk Kharkivskoho Natsionalnoho Ahrarnoho Universytetu. Seriya Biologiya*. 2015. Vol. 34, № 1. P. 71–79. [in Ukrainian] / Пикало С.В., Волощук С.І., Волощук Г.Д. Регенерація рослин тритикале озимого в культурі різних типів експлантів. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2015. Т. 34, № 1. С. 71–79.

PYKALO S. V., DEMYDOV O. A., YURCHENKO T. V., PROKOPIK N. I., HUMENIUK O. V.

The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine, Ukraine, 08853, Kyiv region, Tsentralne v., Tsentralna str., 68, e-mail: pykserg@ukr.net

THE REGENERATION POTENTIAL OF PROMISING WINTER COMMON WHEAT LINES IN SHOOT APICAL MERISTEM CULTURE

Aim. To investigate the regenerative ability of promising winter common wheat lines in shoot apical meristem culture. **Methods.** Plant tissue culture methods, statistical evaluation of data. **Results.** The processes of morphogenesis in culture of apical meristem of 3-days seedlings of lines of winter common wheat were investigated and it was established that the frequency of callusogenesis and shoot regeneration in the studied forms is determined by the genotype of explant. Two types of callus with morphophysiological properties were identified: morphogenic and nonmorphogenic callus. The formation of regenerated plants from wheat calli took place through both gemmorigenesis and somatic embryogenesis. **Conclusions.** The line Erytrospermum 60068 was characterized the highest regeneration potential and it can be recommended for further biotechnology of wheat. Obtained technology of vigorous regenerated plant production of winter common wheat lines in shoot apical meristem culture can be used in cell selection and genetic engineering experiments.

Keywords: winter common wheat, apical meristem, genotype, callus, shoot regeneration.