

## ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Тритикале (*×Triticosecale* Wittmack) є наймолодшою зерновою культурою і першим злаком, синтезованим людиною [1]. У зв'язку з підвищеним попитом на продовольче зерно його вирощують майже в усіх ґрунтово-кліматичних зонах України, де серед інших факторів, що лімітують його врожайність, значної шкоди завдає посуха, яка діє на рослинний організм як осмотичний стресор [2].

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному злаків за дії стресових чинників вносить суттєвий вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля [3]. Застосування культури *in vitro* дозволяє розглядати дію стресорів на клітину в строго контрольованих умовах вирощування та надає можливість виключити складні корелятивні взаємовідносини між різними органами і тканинами, що суттєво полегшує дослідження самого процесу дії стресового фактора на клітинний метаболізм.

Встановлено, що абіотичні стресори індукують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляється на різних рівнях досліджень [4, 5]. На цитологічному рівні показано, що в умовах дії осмотичних речовин відбувається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [6]. Ці зміни проявлялися в деструктуризації, гомогенізації, вакуолізації, зменшенні середніх розмірів та появі поліморфних ядер. За осмотичного стресу спостерігається значна конденсація ядер та фрагментація ДНК [7]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, який викликає надмірна кількість активних форм кисню. Активні форми кисню також можуть мати пошкоджуючий вплив на клітинні структури і макромолекули, особливо на ДНК, викликаючи численні ушкодження, внаслідок чого виникають мутації та інші генетичні ефекти [8]. Значний цитотоксичний ефект осмотиків, зо-

крема маніту, було встановлено при дослідженні в культурі *in vitro* клітин *Centaurea ragusina* L. [9] та калюсних ліній пшениці [3]. Виявлено як хромосомні аберації, так і аномалії мітозу, пов'язані з порушеннями веретена поділу.

Особливості цитогенетичної мінливості калюсних культур тритикале в процесі отримання форм, стійких до абіотичних стресових чинників, майже не досліджені. Однак цитогенетична нестабільність при культивуванні *in vitro* може призводити як до втрати стійкості до стресорів, так і до зниження морфогенетичного потенціалу. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було вивчення цитологічного ефекту дії маніту на клітинні популяції калюсних культур озимого тритикале у процесі добору стійких до осмотичного стресу форм.

### Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були калюсні культури, отримані із експлантів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин озимого гексаплоїдного тритикале лінії 38/1296. Для індукції калюсу використовували середовище Мурасіге-Скуга (МС) [10], доповнене 2,4-Д у концентрації 2,0 мг/л. Калюси культивували при 26 °С, освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді. В якості стресового чинника використовували маніт, який додавали до живильного середовища у сублетальній концентрації – 0,6 М. Летальні та сублетальні концентрації маніту в культурі тканин тритикале були нами встановлені в попередніх дослідженнях [11]. Контролем слугували калюсні культури, які вирощували на середовищі без стресового чинника.

Аналізували по 100–150 метафазних та анафазних пластинок у кожному варіанті досліду. Цитогенетичний аналіз калюсних культур проводили в період найбільшої мітотичної активності на 5–7 добу культивування в I, III та VI пасажах. Цитологічне вивчення здійснювали, виключаю-

чи передфіксаційний вплив на мітоз, з використанням стандартної методики фіксації (етиловий спирт: оцтова кислота 3:1). Калюси забарвлювали 2 % оцетоорсеїном та готували тимчасові препарати за стандартною методикою [12]. Цитогенетичний ефект дії маніту на культуру тканин тритикале визначали за зміною співвідношення клітин різного рівня плоідності та частотою структурних перебудов хромосом і аномалій мітозу. При статистичній обробці даних визначали похибку середнього арифметичного та довірчий інтервал коефіцієнта Ст'юдента.

### Результати та обговорення

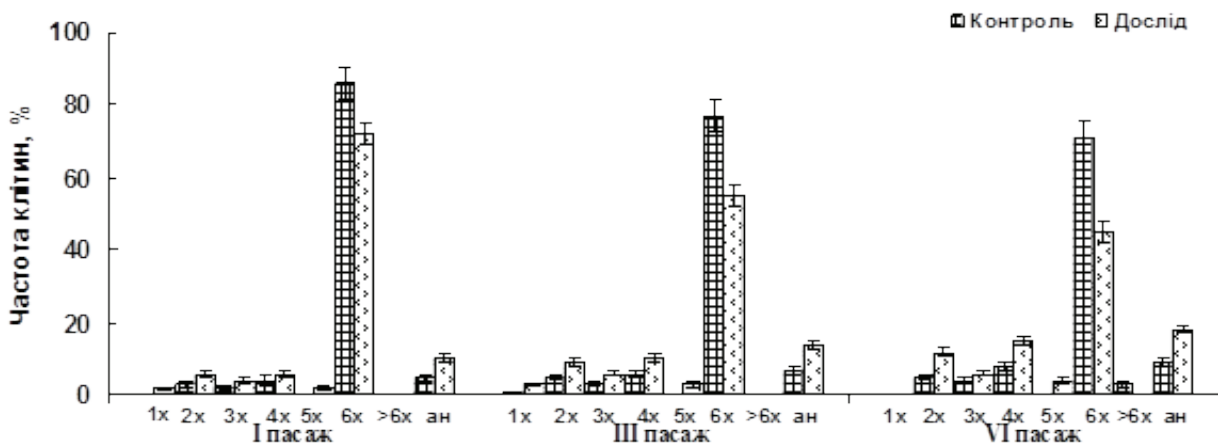
Слід відмітити, що клітинні культури тритикале виявили схожу реакцію на осмотичний стрес, тому аналіз дії маніту на генетичну структуру клітинних популяцій наведено на прикладі калюсної лінії № 5. Цитогенетичний аналіз калюсних культур показав високий ступінь гетерогенності і наявність значних розходжень у характері перебігу цитологічних процесів між калюсами, що вирощувалися на контрольному та селективному середовищах (рис. 1).

Протягом першого пасажу у дослідних калюсів за рахунок зменшення числа гексаплоїдних клітин було відмічено достовірне збільшення до 14 % анеуплоїдних клітин (рис. 2 е), що більш ніж у 2 рази перевищувало даний показник у контролі. У калюсів, що культивувалися на селективному середовищі, було виявлено достовірне підвищення диплоїдних (рис. 2 б) та збільшення кількості тетраплоїдних (рис. 2 г) клітин. У дослідних калюсів також спостерігали поя-

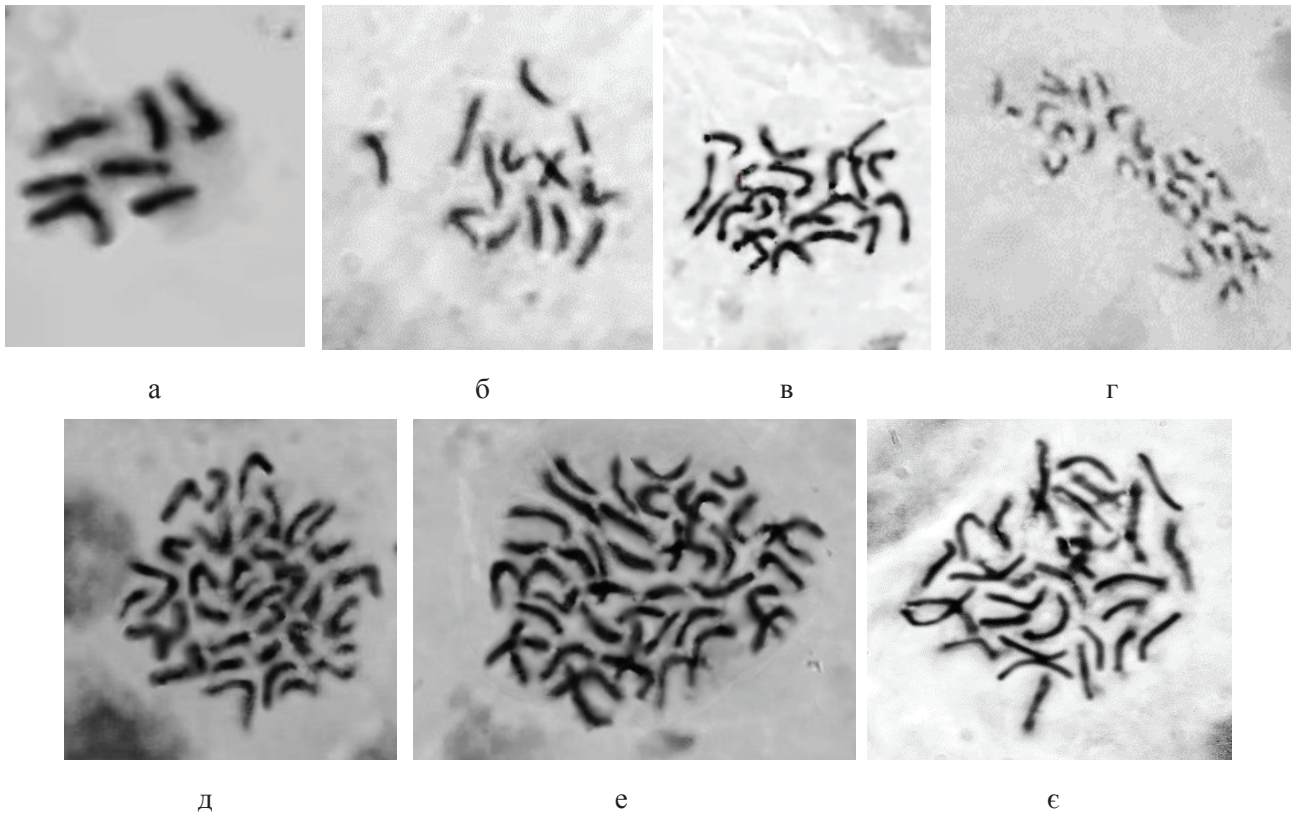
ву гаплоїдних (рис. 2 а) та пентаплоїдних (рис. 2 д) клітин. За кількістю триплоїдних клітин (рис. 2 в) достовірної різниці між контролем та дослідом не виявлено. Слід відмітити, що протягом культивування калюсів поліплоїдні клітини практично не виявлялися. Одиначні клітини зустрічалися лише в контролі.

Протягом третього пасажу у калюсів, що культивувалися на селективному середовищі, на фоні зменшення кількості еуплоїдних клітин, спостерігали подальше достовірне збільшення кількості гаплоїдних, диплоїдних, триплоїдних, тетраплоїдних та анеуплоїдних клітин. У шостому пасажі спостерігалося зникнення гаплоїдних та подальше достовірне збільшення кількості клітин з диплоїдним та тетраплоїдним рівнем плоідності, а також числа анеуплоїдних клітин (рис. 1).

Таким чином, при культивуванні калюсів на селективному середовищі з сублетальною концентрацією маніту спостерігається достовірне підвищення частоти сегрегації геномів, що проявляється збільшенням популяцій клітин із зменшеним відносно модального числом хромосом. Частота сегрегації зростає із збільшенням тривалості культивування. Варто також підкреслити, що культура тритикале, яка є штучно синтезованим амфідиплоїдом і поєднує в собі геноми пшениці та жита, сама по собі характеризується певною цитогенетичною нестабільністю [13]. Тож за рахунок соматональної мінливості та дії осмотичного стресу в культурі *in vitro* нестабільність посилюється, що більшою мірою проявляється сегрегацією геномів. До появи незбалансованих поліплоїдів, які мають непарне число хромо-



**Рис. 1.** Розподіл за числом наборів хромосом у клітинах калюсів тритикале в процесі культивування на контрольному та селективному середовищах: по горизонталі – число наборів хромосом; по вертикалі – частота клітин, % (ан – анеуплоїдні клітини).



**Рис. 2.** Клітини різного рівня плоідності калюсних культур тритикале: а –  $2n = 1x = 7$ ; б –  $2n = 2x = 14$ ; в –  $2n = 3x = 21$ ; г –  $2n = 4x = 28$ ; д –  $2n = 5x = 35$ ; е –  $2n = 6x = 42$ ; є –  $2n = 5x-2 = 33$

сом (гаплоїдне, триплоїдне, пентаплоїдне), може призводити сегрегація геномів під час еуплоїдних мітозів. Вже на перших етапах культивування спостерігалися три- та багатополюсні мітози (рис. 3 г), що і могло обумовити появу клітин різної плоідності, в тому числі і з непарними наборами хромосом. Оскільки мультиполярні мітози нерідко зустрічаються у процесі культивування калюсів тритикале, вони також можуть бути одним із шляхів утворення анеуплоїдних клітин.

Пошкодження веретена поділу, яке виявляється у вигляді відсталих хромосом (рис. 3 д) є ще одним механізмом появи таких клітин.

Наявність у середовищі сублетальної концентрації маніту призводило до підвищення частоти хромосомних аберацій. У першому пасажі кількість клітин з абераціями у контрольному калюсі була на рівні 5,3 %, в той час як у дослідних калюсах даний показник був втричі вищий – 17,6 % (табл.). Це свідчить, що високі концен-

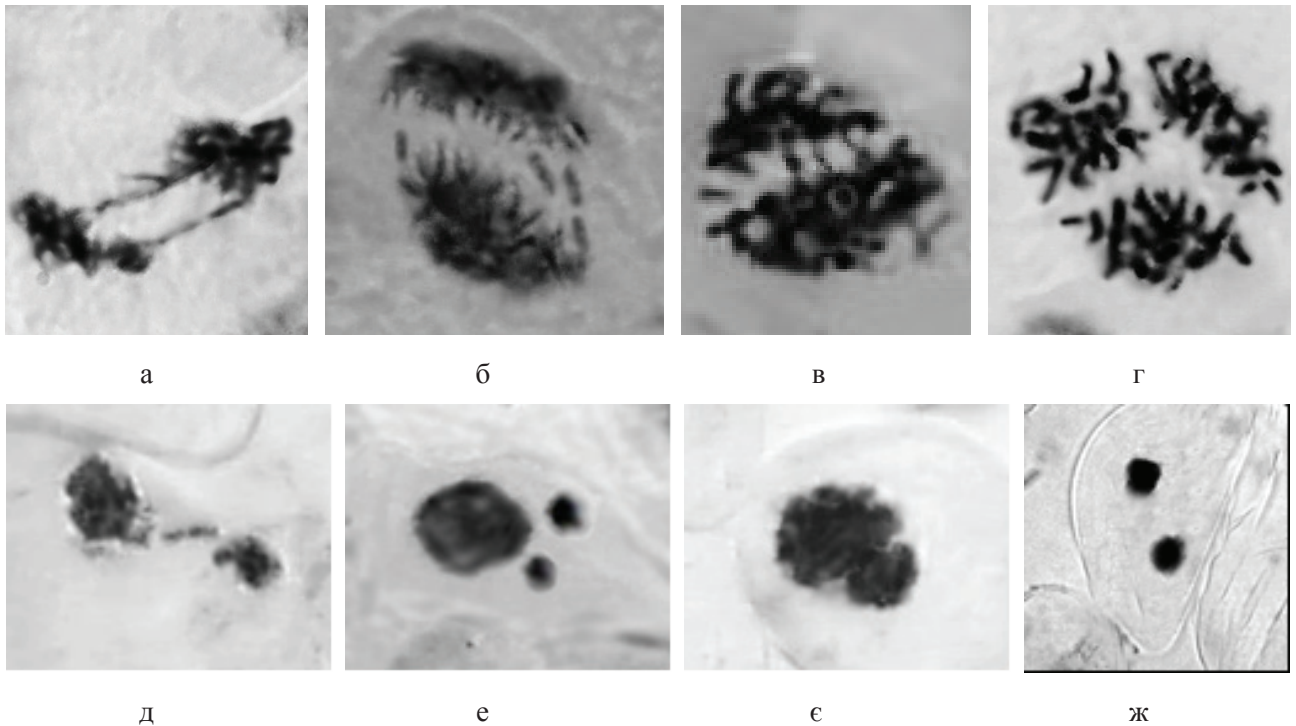
*Таблиця*

**Частота аберацій хромосом у клітинах калюсних культур тритикале в процесі культивування на контрольному та селективному середовищах**

Варіант досліді	Досліджено анафаз, шт.	Кількість анафаз з порушеннями, шт.	Частота, %
1 пасаж			
Контроль	150	8	$5,3 \pm 1,8$
Лінія № 5	136	24	$17,6 \pm 3,3^*$
3 пасаж			
Контроль	132	9	$6,8 \pm 2,2$
Лінія № 5	116	17	$14,7 \pm 3,3^*$
6 пасаж			
Контроль	137	11	$8,0 \pm 2,3$
Лінія № 5	104	12	$11,5 \pm 3,1$

Примітка: \* – відмінності порівняно з контролем достовірні при  $p \leq 0,05$ .





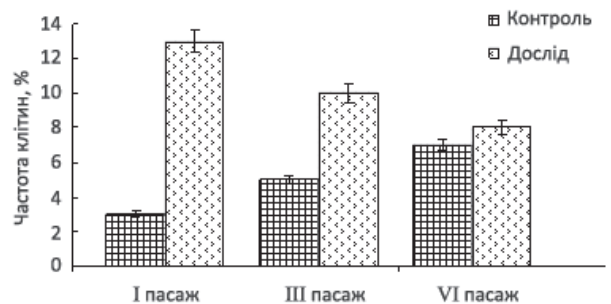
**Рис. 3.** Порушення мітозу в клітинах калюсу тритикале при культивуванні на селективному середовищі: а – хроматидні мости; б – множинні фрагменти; в – множинні порушення; г – триполюсний мітоз; д – відставання хромосоми; е – мікроядра; є – лопатеве ядро; ж – двоядерна клітина

трації маніту мають виражений кластогенний ефект на калюсні культури тритикале. Переважна більшість аберацій виявлена в клітинах у вигляді хроматидних мостів (рис. 3, а) та фрагментів (рис 3, б). Значна кількість аберацій у нашому експерименті представлена у вигляді хроматидних мостів, що свідчить про збереження у клітинних поколіннях дицентричних хромосом. Сумарна кількість абераційних анафаз з фрагментами становить близько 65 % – тобто у спектрі клітинних пошкоджень переважають “свіжі” розриви. Достовірно збільшення їх кількості свідчить про значний генотоксичний вплив маніту на хромосомний апарат клітин і його кластогенний ефект у сублетальній концентрації. Були виділені клітини з множинними порушеннями, тобто такі, які несуть одночасно мости та фрагменти (рис. 3 в).

Протягом третього пасажу у дослідних калюсів кількість клітин з абераціями суттєво не змінилася, проте була удвічі більшою, ніж у контролі. У шостому пасажі частота хромосомних аберацій достовірно не змінилася, проте знизилась порівняно з першим пасажем. Це може бути обумовлено певною адаптацією клітинної популяції до стресових умов.

Сумарна кількість аномалій мітозу, пов’язана з порушеннями веретена поділу, в контролі не перевищувала 3 відсотків (рис. 4). Виявлені багатополюсні мітози (рис. 3 г), відсталі хромосоми (рис. 3 д), клітини з лопатевими ядрами та мікроядрами (рис. 3 е, є), а також двоядерні (рис. 3 ж).

На селективних середовищах з 0,6 М маніту вже в першому пасажі частота аномалій мітозу, пов’язана з порушеннями веретена поділу, збільшилася до 9 %. Отримані результати свідчать, що сублетальна концентрація маніту викликає також і турбагенні порушення в клітинах калюс-



**Рис. 4.** Частота виникнення турбагенних ефектів у калюсних культур тритикале на середовищі з сублетальною концентрацією маніту протягом 6 пасажів культивування

них культур тритикале. Треба відмітити, що серед порушень мітозу більшість склали багатополюсні мітози (55 %). Відомо, що така аномалія клітинного поділу є проявом сильної антимікротрубочкової дії токсичних сполук [14]. Крім того, за сублетальної концентрації осмотика в першому пасажі зростає кількість клітин з мікроядрами (до 25–30 % від загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значного генотоксичного ефекту маніту на клітини. Слід зазначити, що частка клітин з іншими патологіями мітозу, зокрема полікаріоцитами, була незначною – їх кількість не перевищувала 5 % від загальної кількості клітин з аномаліями поділу. Реститутивні клітини – клітини з лопатеви-ми ядрами або полікаріоцити, можуть утворюватися внаслідок виходу клітин із К-мітозу шляхом деконденсації хаотично розкиданих хромосом, минаючи стадію розходження хромосом та утворення клітинної стінки. Утворення двоядерних клітин відбувається внаслідок порушення клітинного поділу, що пов'язане із запізненням ци-

токінезу. Такі ядерні аномалії інтерфазних клітин також характеризують турбагенний ефект дії маніту. Мікроядра можуть утворюватися унаслідок виходу з мітозу клітин з відставанням хромосом, що разом із багатополюсними мітозами обумовлює можливість розвитку анеуплоїдії [15].

### Висновки

У результаті проведених досліджень нами виявлений цитогенетичний ефект дії маніту в культурі тканин тритикале у процесі добору стійких до осмотичного стресу форм. Встановлено, що сублетальна концентрація стресового чинника спричиняє кластогенний ефект та викликає турбагенні порушення в клітинах калюсів. Аналіз генетичної структури клітинних популяцій впродовж тривалого культивування за сублетальної концентрації осмотика виявив достовірне збільшення анеуплоїдії та частоти сегрегації геномів, що проявляється зростанням популяцій клітин із зменшеним відносно модального числом хромосом.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Білітюк А.П., Гірко В.С., Каленська С.М., Андрушків М.І. Тритикале в Україні. – К.: Арістей, 2004. – 388 с.
2. Авдеев Ю.И., Слащева Л.А. Устойчивость озимой тритикале к экстремальным абиотическим факторам среды в аридной зоне возделывания // Астр. Вест. Экол. Обр. – 2014. – 29, № 3. – С. 84–87.
3. Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Цитогенетичний ефект маніту на калюсні культури м'якої пшениці, стійкі й нестійкі до метаболітів *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2012. – 44, № 6. – С. 508–515.
4. Errabi T., Bernard C., Gandonou C., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Skali-Senhaji N. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures // Acta Physiol. Plantarum. – 2007. – 29. – P. 95–102.
5. Yumurtaci A., Aydin Y., Uncuoglu A. Cytological changes in Turkish durum and bread wheat genotypes in response to salt stress // Acta Biologica Hungarica. – 2009. – 60, N 2. – P. 221–232.
6. Echenique G.V., Curvetto N.R. Effect of water stress upon cell division in root tips of *Eragrostis carvula* // Biologia Plantarum. – 1990. – 32, N 2. – P. 153–160.
7. Xiong L., Zhu J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress // Plant Cell Environ. – 2002. – 25. – P. 131–139.
8. Kultz D., Chakravarty D. Hyperosmolarity in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – 98. – P. 1999–2004.
9. Radic S., Prolic M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. // Environmental and Experimental Botany. – 2005 – 54, N 3. – P. 213–218.
10. 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.
11. Пыкало С.В., Зинченко М.А., Волощук С.И., Дубровная О.В. Отбор *in vitro* генотипов тритикале озимого на устойчивость к осмотическому стрессу в культуре апикальных меристем побегов // Сб. стат. Междунар. научн.-практ. конф. «Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений», 18–20 августа 2014 г. – Минск, 2014. – С. 202–205.
12. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – С. 168–170.
13. Soloviev A.A., Karlov G.I., Divashuk M.G., Bazaleev N.A. Morphological and cytogenetic characterization of translocated spring triticale line 131/7 // Acta Agriculturae Serbica. – 2005. – 10, N 19. – P. 17–25. Fiskesjo G. *In vitro* toxicity testing protocol // Humana Press, Totowa, NJ. – 1995. – P. 119–127.
14. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.А. Иммуниет и цитогенетическая нестабильность. – Томск.: Изд-во Томского университета, 1986. – 223 с.

PYKALO S.V. <sup>1</sup>, BAVOL A.V. <sup>2</sup>, DUBROVNA O.V. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine, Ukraine, 08853, P.O. Tsentral'ne, Myronivka district, Kyiv region, e-mail: pykserg@ukr.net

<sup>2</sup> Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

## CYTOGENETIC FEATURES OF CALLUS CULTURES OF WINTER TRITICALE UNDER OSMOTIC STRESS ACTION

**Aims.** To study the effects of sublethal concentrations of mannitol on cytogenetic structure of cell populations of callus cultures of winter triticales (*Triticosecale* Wittmack) during selection of resistant to osmotic stress forms. **Methods.** By cytological analysis method there were determined ploidy level, frequency of structural chromosome aberrations and mitotic abnormalities in the cells of callus cultures of winter triticales under sublethal concentrations of mannitol. **Results.** Analysis of genetic structure of cell populations during cultivation showed a significant increase in aneuploidy frequency and genome segregation that is shown growth of cell populations with reduced relative to the modal number of chromosomes. **Conclusions.** It was established that sublethal concentrations of mannitol caused significant clastogenic effect and turbagene disturbances in callus cells of triticales.

**Keywords:** *Triticosecale* Wittmack, callus cultures, mannitol, cytological analysis, chromosome aberrations.