

УДК 581.143.6:58.085

Регенераційна здатність тритикале в культурі апікальних меристем пагонів залежно від генотипу та віку експланта

Пикало С. В., кандидат біологічних наук
Волощук С. І., кандидат сільськогосподарських наук
Чугункова Т. В., доктор біологічних наук
Прокопів Н. І.

Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН
Україна, 08853, с. Центральне, Миронівський район Київської області
e-mail: pykserg@ukr.net

Мета. Проаналізувати вплив генотипу та віку експланта на регенераційну здатність тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів. **Методика.** Досліджували 10 генотипів тритикале озимого (сорти Обрій Миронівський, Миролан, АДМ 11, Ізомер, Baltiko, Лідер, Квазар, лінії 38/1296, 1324 та гібрид F₂ 809). Застосовано методи культури тканин і органів *in vitro*, статистичного аналізу. **Результати.** Проведено порівняльний аналіз частоти індукції калюсів і регенерації рослин у культурі апікальних меристем пагонів різного віку в 10 генотипів тритикале озимого. У вивчених форм відзначено генотипову залежність процесів калюсогенезу і регенерації пагонів у культурі *in vitro*. Прямої залежності між віком експлантів і регенераційною здатністю калюсів, отриманих з апексів проростків, не було виявлено. Частота регенерації з калюсів, отриманих з апікальних меристем пагонів 1- і 3-добових проростків, відрізнялась лише у сортів Baltiko, Миролан та Ізомер, у решти генотипів достовірної різниці за цим показником не спостерігали. Виділено два типи калюсів (морфогенні і неморфогенні), утворення яких не залежало від віку експланта. Виявлено, що регенерація рослин з калюсів відбувалася шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріодогенезу. Встановлено, що найвищою частотою калюсогенезу і регенерації пагонів характеризувалась лінія 38/1296, з експлантів якої було отримано найбільшу кількість рослин-регенерантів. Найменша частота індукції калюсу і регенерації пагонів була виявлена у сорту АДМ 11. **Висновки.** У досліджуваних генотипів спостерігали позитивний зв'язок між частотою калюсогенезу та регенерацією пагонів. Оптимізований регламент отримання повноцінних рослин-регенерантів тритикале озимого в калюсній культурі *in vitro* може бути використаний у клітинній селекції та генно-інженерних експериментах, що значно прискорить селекцію тритикале, а також доповнить та розширить генетичну мінливість, необхідну для отримання нових сортів із заданими ознаками.

Ключові слова: тритикале, генотип, експлант, апікальна меристема, калюс, регенерація

Вступ. Тритикале (*×Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) – культура, яка має великий потенціал урожайності, підвищений уміст білка і незамінних амінокислот (лізину, триптофану), що визначає її харчову і кормову цінність. Зерно тритикале використовують у хлібопекарській та кондитерській промисловості, а також для виробництва спирту і промислового крохмалю [1, 2].

Останніми роками біотехнологія стає одним з новітніх інструментів досліджень сільськогосподарських культур. Значним є її внесок у поєднанні з традиційною практикою селекції у розвиток нових методів генетичного поліпшення рослин та підвищення їх продуктивності. Біотехнологічні підходи прискорюють селекцію тритикале завдяки скороченню часу, необхідного для виведення сортів з поліпшеними характеристиками, а також доповнюють та розширюють генетичну мінливість, необхідну для отримання нових сортів із заданими ознаками [3–5]. Біотехнологічні методи культури *in vitro* різних експлантів (органів або частин органів, ізольованих від донорної рослини) нині широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин, зокрема тритикале [6–8]. Тому дослідження з оптимізації та підбору умов для успішної індукції калюсогенезу, субкультивування і регенерації рослин тритикале у культурі тканин є достатньо актуальними.

Аналіз літературних джерел, постановка проблеми. Відомо, що утворення калюсної тканини у злакових, у тому числі й тритикале, ускладнене [9, 10]. У тритикале найбільш придатним експлантом для утворення морфогенного калюсу є незрілі зародки [11–13]. У різних генотипів тритикале найбільше число соматичних зародків на експлант (9,63) було отримано з 16-денних (після запилення) зародків [13]. Проте недоліком незрілих зародків як експлантів є те, що їх можливо використовувати тільки декілька тижнів.

Зручні для роботи впродовж усього року зрілі зародки використовують для отримання морфогенетично активних калюсних культур тритикале [7, 14, 15]. Регенераційна здатність калюсу тритикале виявилася найвищою, коли зародки були частково ізольовані від ендосперму насінини (до рухливості), але культивувалися разом з останнім «борозенкою вниз» [7].

Рослини тритикале були також регенеровані з інших типів експлантів методом органогенезу або ембріоїдогенезу в культурі молодих суцвіть та базальної основи листка [16–18]. У досліджах В. М. Акініної [19] як експлант для мікроклонального розмноження віддалених гібридів та гаплоїдів тритикале було вибрано фрагменти пагонів на стадії кушіння (2–3-й етапи органогенезу за Ф. М. Куперман), а також фрагменти незрілих суцвіть (5–6-й етапи органогенезу). Як показали результати, оптимізована біотехнологія дала можливість зберегти та розмножити унікальні генотипи тритикале.

Останнім часом у багатьох зернових культур широко використовують як експлант апікальні меристеми конусів наростання пагонів. Перевагою такого типу експланта є можливість подолання генотипових особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, та отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час, а також його доступність у будь-яку пору року [20, 21]. Культуру апікальних меристем широко використовують як джерело калюсної тканини, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу – до 90 % [22, 23].

Відомо також, що процеси калюсогенезу та регенерації пагонів у культурі *in vitro* тритикале визначаються не лише генотипом та типом експланта, але й значною мірою можуть залежати від стадії розвитку донорного матеріалу [12]. Крім того, оскільки здатність рослин до регенерації на сьогодні розглядається в основному як генотипова особливість [12, 16, 23], актуальним є пошук генотипів з високим регенераційним потенціалом.

Мета досліджень – проаналізувати вплив генотипу та віку експланта на регенераційний потенціал тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів.

Матеріал і методика. Як об'єкт дослідження використано генотипи тритикале озимого гексаплоїдного різного еколого-географічного походження з робочої колекції Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН: сорти Обрій Миронівський, Миролан, АДМ 11, Ізомер, Baltiko, Лидер, Квазар, лінії 38/1296, 1324 та гібрид F₂ 809. Зразки насіння отримано з рослин селекційного розсадника МІП, що вирощувались у польових умовах 2012/13 р.

Для отримання донорних рослин насіння стерилізували впродовж 3 хв 1 % розчином КМпО₄. Далі впродовж 1 хв його витримували в 1 % розчині AgNO₃ і на 1 хв поміщали в 96 % етанол. Кінцевим етапом стерилізації було 3-разове промивання стерильною дистильованою водою. Отримане простерилізоване насіння пророщували у клімокамері на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [24]. Донорні рослини культивували у скляному посуді об'ємом 200 мл. Як експланти використовували апікальну меристему пагонів стерильних проростків різного віку: на 1-у, 2-у та 3-ю добу проростання насіння. Розмір експлантів варіював у межах 1,5–2,0 мм. У кожному варіанті досліду було взято по 160 експлантів.

Калюсну тканину отримували на середовищі МС, що додатково містило L-аспарагін (150 мг/л), AgNO₃ (10 мг/л) та 2,4-Д (2 мг/л). Експланти культивували при 26 °С у темряві впродовж трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і вирощували ще впродовж двох тижнів при освітленні (3–4 клк, 16-годинний фотоперіод) і відносній вологості повітря 70 %.

Для індукції морфогенезу калюси переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) та 0,5 мг/л ІОК (індолілоцтова кислота). Отримані пагони в міру розвитку переносили на безгормональне середовище МС із половинним умістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували в посудини зі спеціально підбраною ґрунтовою сумішшю і на 7–14 діб поміщали у вологу камеру. Добре укорінені рослини пересаджували у пластикові стаканчики з ґрунтовою сумішшю.

Частоту утворення морфогенних калюсів та регенерації пагонів (%) для кожного варіанта визначали як відношення числа морфогенних калюсів або регенерантів до початкової кількості висаджених експлантів. Експериментально отримані дані обробляли методами статистичного аналізу [25].

Обговорення результатів. На початку культивування, при переході до дедиференціації, експланти збільшувались у розмірах у середньому в 2-3 рази (рис. 1).

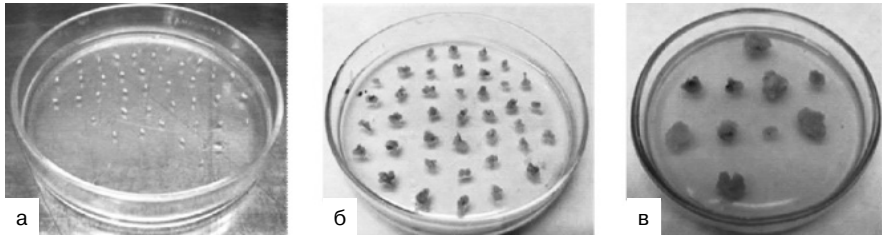


Рис. 1. Етапи індукції калюсу тритикале з апікальних меристем пагонів: а – вихідні експланти; б – початок калюсоутворення; в – сформовані калюси

Тривалість періоду індукції калюсоутворення залежала від віку та розміру експланта і варіювала від 3 до 4 діб з моменту початку культивування. Варто підкреслити, що найбільш активний процес утворення калюсу спостерігали в апікальних меристем пагонів 3-добових проростків завдовжки 1,5–1,8 мм. У процесі роботи нами було виявлено, що всі досліджувані генотипи тритикале озимого характеризуються різною здатністю до індукції калюсу, що варіювала від 60,5 до 96,9 % (табл.).

Як показали результати досліджень, у всіх генотипів найбільшу частоту індукції калюсу було зафіксовано у варіантах, в яких використовували експланти 3-добового віку. Найбільшу частоту калюсогенезу, незалежно від віку експлантата, було відмічено у сортів Обрій Миронівський, Baltiko та лінії 38/1296, найменшу – у сорту АДМ 11 та лінії 1324.

Після перенесення на світло через 10–16 діб культивування було виявлено два типи калюсу, що розрізнялись за морфо-фізіологічними властивостями (рис. 2): морфогенний – калюс, що здатний до регенерації і містить агрегати клітин із щільних сегментів жовтувато-білого кольору з ділянками зелених хлорофіловмісних клітин; неморфогенний – калюс, який не здатний до морфогенезу і складається з м'яких, обводнених клітин білого кольору, за подальшого культивування яких спостерігали некроз.

Утворення морфогенного калюсу спостерігали в усіх варіантах, однак з різною частотою залежно від генотипу та віку експланта. У ході подальшого культивування всі морфогенні калюси в міру розвитку пересаджували на середовище для регенерації. Неоднорідність калюсних клітин обумовлює різні шляхи їх морфогенезу. Формування рослин може йти за двома напрямками. Згідно з дослідженнями Т. Б. Батигіної [26], формування рослин проходить через соматичний ембріодогенез – процес розвитку зародкоподібної біполярної структури (ембріюїда), що утворюється асексуально з соматичних та статевих клітин. За даними

інших авторів [7, 14], регенерація рослин, окрім соматичного ембріоїдогенезу, може також відбуватися шляхом геморизогенезу, тобто одночасного розвитку пагонів і коренів. У своїх дослідженнях ми спостерігали розвиток з морфогенного калюсу як соматичних ембріодів, так і геморизогенних структур. Однак у деяких калюсів спостерігали лише ризогенез (утворення коренів) без подальшої регенерації (рис. 3). Дослідники пояснюють це тим, що органогенез у таких калюсах не досягає рівня розвитку цілих рослин [14, 20, 26].

Таблиця. Частота калюсогенезу та морфогенезу тритикале озимого залежно від генотипу та віку експланта

Генотип	Вік експланта (доба проростання)	Частота утворення калюсів, %	Частота утворення морфогенних калюсів, %	Частота регенерації, %
Baltiko	1	81,9±3,1	33,8±3,7	14,4±2,8
	2	82,5±3,0	34,4±3,8	20,6±3,2
	3	89,4±2,4	44,4±3,9	23,5±3,4*
АДМ 11	1	65,6±3,8	21,9±3,3	8,8±2,2
	2	68,8±3,7	25,0±3,4	10,0±2,4
	3	70,0±3,6	27,5±3,5	10,6±2,4
Лидер	1	69,4±3,6	38,1±3,8	16,3±2,9
	2	73,1±3,5	41,3±3,9	17,5±3,0
	3	78,1±3,3	46,3±3,9	19,8±3,2
Миролан	1	73,1±3,5	39,4±3,9	8,8±2,2
	2	74,4±3,5	43,8±3,9	12,5±2,6
	3	81,9±3,1	50,0±4,0	16,3±2,9*
Ізомер	1	56,3±3,9	35,0±3,8	15,6±2,9
	2	59,4±3,9	38,1±3,8	23,8±3,4
	3	66,3±3,7	45,6±3,9	26,3±3,5*
38/1296	1	91,9±2,2	47,5±4,0	31,3±3,7
	2	93,8±1,9	50,0±4,0	33,8±3,7
	3	96,9±1,4	58,1±3,9	36,3±3,8
Квазар	1	75,0±3,4	41,3±3,9	11,9±2,6
	2	77,5±3,3	44,4±3,9	12,5±2,6
	3	83,1±3,0	50,6±4,0	14,3±2,8
Обрій Миронівський	1	89,4±2,4	41,3±3,9	20,0±3,2
	2	91,3±2,2	45,0±3,9	22,5±3,3
	3	95,0±1,7	51,3±4,0	26,9±3,5
1324	1	68,1±3,7	26,3±3,5	11,3±2,5
	2	70,6±3,6	29,4±3,6	12,5±2,6
	3	77,5±3,3	35,6±3,8	15,6±2,9
F ₂ 809	1	74,4±3,5	32,5±3,7	10,6±2,4
	2	76,3±3,4	34,4±3,8	13,8±2,7
	3	82,5±3,0	43,1±3,9	14,4±2,8

Примітка. *різниця достовірна при $p \leq 0,05$ між 1-ю і 3-ю добою проростання

Відомо, що соматичний ембріогенез порівняно з геморизогенезом більш оптимальний, оскільки в першому випадку формування рослини починається з проростання соматичного ембріона, який має зачатки усіх органів

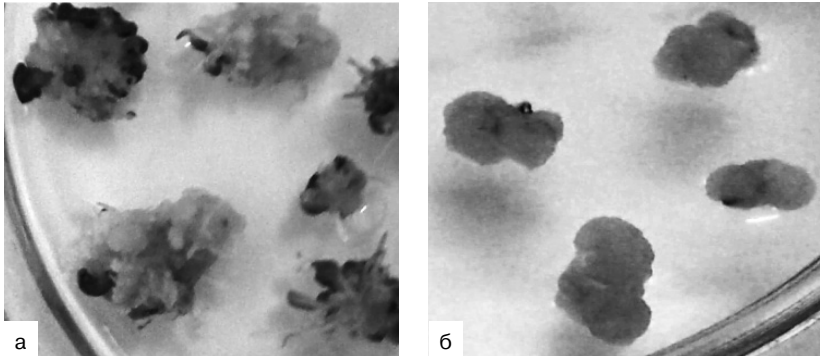


Рис. 2. Типи індукованих калюсів тритикале:
а – морфогенні калюси; б – неморфогенні калюси

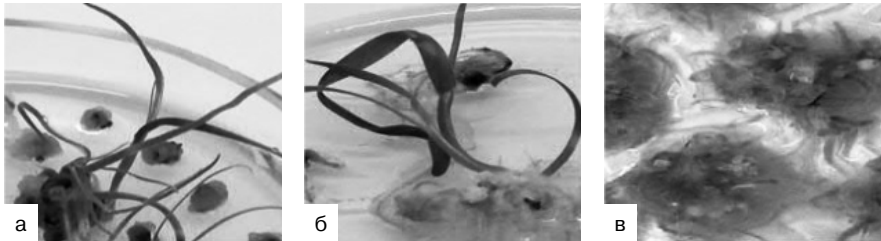


Рис. 3. Різні шляхи морфогенезу в культурі *in vitro* тритикале:
а – проростання соматичних зародків; б – прямий органогенез
за типом геморизогенезу; в – інтенсивний ризогенез

[10]. Найбільшу частоту їх утворення було відмічено на 22–26-у добу культивування, а геморизогенних структур – лише після 26-ї доби.

Досліджувані генотипи суттєво відрізнялися за регенераційною здатністю. Найбільшу частоту регенерації пагонів незалежно від віку експланта спостерігали у лінії 38/1296 (36,3 %) та сорту Обрій Миронівський (30,6 %), а найменшу частоту було виявлено у сортів Квазар (8,1 %) та АДМ 11 (10,6 %).

Максимальною регенераційною здатністю характеризувались калюси, отримані з апексу пагона саме 3-добових проростків. Це може бути пов'язано з тим, що при використанні як експланта верхівки пагона з меристемними зонами регенерація йде з більш диференційованої тканини. Слід зазначити, що у сортів Baitiko, Миролан та Ізомер спостерігалась статистично достовірна різниця за частотою регенерації з калюсів, отриманих з експлантів 1- та 3-добових проростків.

У проаналізованих нами генотипів спостерігали певний зв'язок між частотою утворення калюсу та частотою регенерації пагонів, подібна тенденція

також спостерігалась і в попередніх наших дослідженнях [27]. Варто підкреслити, що є роботи, в яких не спостерігається зв'язку між калюсогенезом та регенерацією рослин [6, 28]. Автори зазначених результатів припускають, що ці ознаки контролюються незалежними генетичними системами. У працях E. K. Kaleikau et al. [29] для виявлення генетичних факторів, що детермінують здатність калюсу до регенерації, були використані дителосомні і нуллітетрасомні лінії пшениці сорту “Чайнз Спрінг”. За результатами проведених досліджень були знайдені істотні відмінності між анеуплоїдними і еуплоїдними лініями за швидкістю росту калюсів, що регенерують. Авторами був констатований факт значного впливу присутності-відсутності плеча у гомологічних хромосомах на генетичний баланс організму, що проявляється у зміні характеру генних ефектів при успадкуванні здатності до недиференційованого росту. Встановлено також, що відсутність певних плечей хромосом може або взагалі унеможливити регенерацію, або істотно її послабити. З розглянутих прикладів очевидно, що регуляція індукції калюсоутворення і регенераційної здатності є досить складним процесом і, безумовно, потребує подальшого вивчення.

Висновки. Порівняльний аналіз частоти калюсоутворення та регенерації у 10 генотипів тритикале озимого засвідчив, що всі вони мали різну здатність до індукції калюсу та регенерації пагонів. Серед проаналізованих генотипів найбільшою частотою індукції калюсу та регенерації пагонів характеризувалась лінія 38/1296. У досліджуваних генотипів спостерігали позитивний зв'язок між частотою калюсогенезу та регенерації пагонів. Оптимізований регламент отримання повноцінних рослин-регенерантів тритикале в калюсній культурі *in vitro* може бути використаний у клітинній селекції та генно-інженерних експериментах, що значно прискорить селекцію тритикале, а також доповнить та розширить генетичну мінливість, необхідну для отримання нових сортів із заданими ознаками.

Список використаних джерел

1. Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *J. Agric. Sci.* 2005. Vol. 143, Iss. 5. P. 329–346. doi: 10.1017/S0021859605005290
2. Рибалка О. І., Моргун В. В., Моргун Б. В., Починок В. М. Агронімічний потенціал і перспективи тритикале. *Фізіологія рослин і генетика*. 2015. Т. 47, № 2. С. 95–111.
3. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Біотехнологія рослин і перспективи її розвитку. *Фізіологія рослин і генетика*. 2014. Т. 46, № 1. С. 3–18.
4. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ : Логос, 2012. 428 с.
5. Волощук С. І. Створення вихідного селекційного матеріалу тритикале на основі біотехнологій *in vitro*. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агронімія і біологія*. 2012. Вип. 9 (24). С. 165–170.
6. Marcinska I., Wedzony M. Effect of physical, physiological and genetic factors on callus induction, differentiation and regeneration of winter triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Cereal Res. Commun.* 2002. Vol. 30, Iss. 1–2. P. 63–68.
7. Birsin M. A., Ozgen M. Comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (*×Triticosecale* Wittmack). *Cell. Mol. Biol. Letters*. 2004. Vol. 9, Iss. 2. P. 353–361.

8. Волощук С. І. Індукований андрогенез у селекції тритикале озимого. *Вісник аграрної науки*. 2014. № 3. С. 36–40.
9. Sowa S., Oleszczuk S., Zimny J. A simple and efficient method for cryopreservation of embryogenic triticale calli. *Acta Physiol. Plant*. 2005. Vol. 27, Iss. 2. P. 237–243.
10. Eudes F., Acharya S., Laroche A. et al. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2003. Vol. 73, Iss. 2. P. 147–157.
11. Bohorova N. E., Pfeiffer W. H., Mergoum M. et al. Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breed*. 2001. Vol. 120, Iss. 4. P. 291–295. doi: 10.1046/j.1439-0523.2001.00518.x
12. Atak N., Muharemm K., Khavar K. et al. Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes. *Afr. J. Biotechnol*. 2008. Vol. 7, No 11. P. 1765–1768.
13. Ainsley P. J., Aryan A. P. Efficient plant regeneration system for immature embryos of triticale (*Triticosecale* Wittmack). *Plant Growth Regul*. 1998. Vol. 24, Iss. 1. P. 23–30.
14. Vikrant, Rashid A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf base of *Triticale*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2001. Vol. 64, Iss. 1. P. 33–38.
15. Ganeshan S., Chodaparambil S. V., Baga M. et al. *In vitro* regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2006. Vol. 85, Iss. 1. P. 63–73. doi: 10.1007/s11240-005-9049-z
16. Eapen S., Rao P. S. Plant regeneration from immature inflorescence callus cultures of wheat, rye and triticale. *Euphytica*. 1985. Vol. 34, Iss. 1. P. 153–159.
17. Reddy V. D., Suprasanna P., Rao K. V. et al. Cell and tissue culture studies in rice, maize and triticale. *Indian Rev. Life Sci*. 1991. Vol. 11. P. 29–52.
18. Burritt D. J., Fautrier A. G., Field R. J. Regenerative ability of bulky explants of hexaploid and octoploid triticale (*x Triticosecale* sp. Wittm.). In *Toward Enhanced and Sustainable Agricultural Productivity in the 2000's: Breeding Research and Biotechnology: proceedings of SABRAO Seventh International Congress and WSA A Symposium Held at Academia Sinica* (Taipei, November 16–20, 1993). Taipei, Taiwan, 1993. Vol. 2, p. 547.
19. Акинина В. Н. Микроклональное размножение тритикале в условиях *in vitro*. *Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии*: мат. XII молодеж. науч. конф. (г. Москва, 11 апреля 2012 г.). Москва, 2012. С. 8–9.
20. 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.
21. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant*. 2002. Vol. 38, Iss. 2. P. 163–168. doi: 10.1079/IVP2001267
22. Дубровна О. В., Бавол А. В., Зінченко М. О. та ін. Вплив цефатоксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2012. Т. 44, № 3. С. 218–224.
23. Reddy V. D., Reddy G. M. Genetic basis of plant regeneration in hexaploid triticale. *Euphytica*. 1993. Vol. 70, Iss. 1–2. P. 17–19.
24. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
25. Лакин Г. Ф. Биометрия. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
26. Батыгина Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. *Физиология растений*. 1999. Т. 46, № 6. С. 888–898.

27. Пыкало С. В., Зинченко М. А., Волощук С. И., Дубровная О. В. Морфогенез тритикале озимого в культуре апикальных меристем побегов. *Биотехнология: достижения и перспективы развития* : материалы I Международной научно-практической конференции (г. Пинск, 25–26 сентября 2014 г.). Пинск : ПолесГУ, 2014. С. 29–34.
28. Сидор Л. С., Орлов П. А. Регенерационный потенциал различных видов пшеницы, ржи и ячменя в культуре листовых эксплантов. *Цитология и генетика*. 2005. Т. 39, № 5. С. 28–34.
29. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 1989. Vol. 78, Iss. 6. P. 783–787.

References

1. Oettler, G. (2005). The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *J. Agric. Sci.*, 143(5), 329–346. doi: 10.1017/S0021859605005290
2. Rybalka, O. I., Morgun, V. V., Morgun, B. V., & Pochynok, V. M. (2015). Agronomic potential and perspectives of triticale. *Fiziologiya Rasteniy i Genetika* [Plant Physiology and Genetics], 47(2), 95–111. [in Ukrainian]
3. Reshetnikov, V. N., Spiridovich, E. V., & Nosov, A. M. (2014). Plant biotechnology and perspectives of its development. *Fiziologiya Rasteniy i Genetika* [Plant Physiology and Genetics], 46(1), 3–18. [in Russian]
4. Dubrovna, O. V., Chugunkova, T. V., Baval, A. V., & Lialko, I. I. (2012). *Biotehnolohichni ta cytohenetychni osnovy stvorennia roslyn, stiikykh do stresiv* [Biotechnological and Cytogenetic Bases for the Creation of Plants Resistant to Stresses]. Kyiv: Lohos. [in Ukrainian]
5. Voloshchuk, S. I. (2012). Creation of initial selection material of triticale on the basis of *in vitro* biotechnology. *Visnyk Sumskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu. Seriya: Ahronomiia i Biolohiia* [Bulletin of Sumy NAU. Series: Agronomy and Biology], 9, 165–170. [in Ukrainian]
6. Marcińska, I., & Wędzony, M. (2002). Effect of physical, physiological and genetic factors on callus induction, differentiation and regeneration of winter triticale (*×Triticosecale* Wittm.). *Cereal Res. Commun.*, 30(1–2), 63–68.
7. Birsin, M. A., & Ozgen, M. (2004). A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (*×Triticosecale* Wittmack). *Cell. Mol. Biol. Letters*, 9(2), 353–361.
8. Voloshchuk, S. I. (2014). Induced androgenesis in breeding of winter triticale. *Visnyk ahrarnoi nauky* [News of Agrarian Sciences], 3, 36–40. [in Ukrainian]
9. Sowa, S., Oleszczuk, S., & Zimny, J. (2005). A simple and efficient method for cryopreservation of embryogenic triticale calli. *Acta Physiol. Plant.* 27(2), 237–243.
10. Eudes, F., Acharya, S., Laroche, A., Selinger, L.B., & Cheng, K.-J. (2003). A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, 73(2), 147–157.
11. Bohorova, N. E., Pfeiffer, W. H., Mergoum, M., Crossa, J., Pacheco, M., & Estanol, P. (2001). Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos. *Plant Breed.*, 120(4), 291–295. doi: 10.1046/j.1439-0523.2001.00518.x
12. Atak, M., Kaya, M., Khawar, K. M., Saglam, S., Özcan, S., & Ciftci, C. Y. (2008). Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(11), 1765–1768.
13. Ainsley, P. J., & Aryan, A. P. (1998). Efficient plant regeneration system for immature embryos of triticale (*×Triticosecale* Wittmack). *Plant Growth Regul.*, 24(1), 23–30.
14. Vikrant, & Rashid, A. (2001). Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 64(1), 33–38.

15. Ganeshan, S., Chodaparambil, S. V., Bega, M., Fowler, D. B., Hucl, P., Rosnagel, B. G., & Chibbar, R. N. (2006). In vitro regeneration of cereals based on multiple shoot induction from mature embryos in response to thidiazuron. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 85(1), 63–73. doi: 10.1007/s11240-005-9049-z
16. Eapen, S., & Rao, P. S. (1985). Plant regeneration from immature inflorescence callus cultures of wheat, rye and triticale. *Euphytica*, 34(1), 153–159.
17. Reddy, V. D., Suprasanna, P., Rao, K. V., Kavi Kishor, P. B., & Reddy, G. M. (1991). Cell and tissue culture studies in rice, maize and triticale. *Indian Rev. Life Sci.*, 11, 29–52.
18. Burritt, D. J., Fautrier, A. G., & Field, R. J. (1994). Regenerative ability of bulky explants of hexaploid and octoploid triticale (*xTriticosecale* sp. Wittm.). In *Toward Enhanced and Sustainable Agricultural Productivity in the 2000's: Breeding Research and Biotechnology: proceedings of SABRAO Seventh International Congress and WSAW Symposium Held at Academia Sinica* (Vol. 2, p. 547). November 16–20, 1993, Taipei, Taiwan.
19. Akinina, V. N. (2012). Microclonal reproduction of triticale in *in vitro* conditions. In *Biotehnologiya v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii: materialy XII molodezhnoy. nauchnoy konferentsii* [Biotechnology in crop production, animal husbandry and veterinary medicine: Proc. of XII Youth Sci. Conf.] (pp. 8–9). April 11, 2012, Moscow, Russia. [in Russian]
20. Goncharuk, A. N., Baval, A. V., & Dubrovna, O. V. (2014). Morphogenesis in apical meristems culture of highly productive winter wheat varieties. *Fiziologiya Rasteniy i Genetika* [Plant Physiology and Genetics], 46(3), 245–251. [in Ukrainian]
21. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W., & Sticklen, M. B. (2002). Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant*, 38(2), 163–167. doi: 10.1079/IVP2001267
22. Dubrovna, O. V., Baval, A. V., Zinchenko, M. O., Goncharuk, A. N., & Lialko, I. I. (2012). Effect of cefatoxime on morphogenesis in apical meristems and mature embryos culture of wheat. *Fiziologiya i Biokhimiya Kul'turnykh Rasteniy* [Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants], 44(3), 218–224. [in Ukrainian]
23. Reddy, V. D., & Reddy, G. M. (1993). Genetic basis of plant regeneration in hexaploid triticale. *Euphytica*, 70(1/2), 17–19.
24. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
25. Lakin, G. F. (1990). *Biometriya* [Biometrics]. (5th ed., rev.). Moscow: Vysshaya shkola. [in Russian]
26. Batygina, T. B. (1999). Embryogenesis and morphogenesis of reproductive and somatic embryos. *Fiziologiya Rasteniy* [Plant Physiology], 46(6), 888–898. [in Russian]
27. Pykalo, S. V., Zinchenko, M. O., Voloshchuk, S. I., & Dubrovna, O. V. (2015). Morphogenesis of winter triticale in shoot apical meristem culture. In *Biotehnologiya: dostizheniya i perspektivy razvitiya: materialy I Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Biotechnology: achievements and prospects of development: Proc. I Int. Sci. Conf.] (pp. 29–34). Sept. 25–26, 2014, Pinsk, Belarus. [in Russian]
28. Sidor, L. S., & Orlov, P. A. (2005). Regeneration potential of different types of wheat, rye and barley in culture of leaf explants. *Tsitologiya i Genetika* [Cytology and Genetics], 39(5), 28–34. [in Russian]
29. Kaleikau, E. K., Sears, R. G., & Gill, B. S. (1989). Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 78(6), 783–787.

Регенерационная способность тритикале в культуре апикальных меристем побегов в зависимости от генотипа и возраста экспланта

Пыкало С. В., кандидат биологических наук

Волощук С. И., кандидат сельскохозяйственных наук

Чугункова Т. В., доктор биологических наук

Прокопик Н. И.

Мироновский институт пшеницы имени В. Н. Ремесло НААН

Украина, 08853, с. Центральное, Мироновский район Киевской обл.

e-mail: pykserg@ukr.net

Цель. Проанализировать влияние генотипа и возраста экспланта на регенерационную способность тритикале озимого в культуре апикальных меристем побегов. **Методика.** Исследовали 10 генотипов тритикале озимого (сорта Обрій Миронівський, Миролан, АДМ 11, Изомер, Baltiko, Лидер, Квазар, линии 38/1296, 1324 и гибрид F₂ 809). Применяли методы культуры тканей и органов *in vitro*, статистического анализа. **Результаты.** Проведен сравнительный анализ частоты индукции каллусов и регенерации растений в культуре апикальных меристем побегов разного возраста у 10 генотипов тритикале озимого. У изученных форм отмечена генотипическая зависимость процессов каллусогенеза и регенерации побегов в культуре *in vitro*. Прямой зависимости между возрастом эксплантов и регенерационной способностью каллусов, полученных из апексов проростков, не было обнаружено. Частота регенерации из каллусов, полученных из апикальных меристем побегов 1- и 3-суточных проростков, отличалась только у сортов Baltiko, Миролан и Изомер, у остальных генотипов достоверных различий по этому показателю не наблюдали. Выделены два типа каллусов (морфогенные и неморфогенные), образование которых не зависело от возраста экспланта. Выявлено, что регенерация растений из каллусов происходила путем как гемморизогенеза, так и соматического эмбриоидогенеза. Установлено, что наибольшей частотой каллусогенеза и регенерации побегов характеризовалась линия 38/1296, из эксплантов которой было получено наибольшее количество растений-регенерантов. Наименьшая частота индукции каллуса и регенерации побегов выявлена у сорта АДМ 11. **Выводы.** У исследуемых генотипов наблюдали положительную связь между частотой каллусогенеза и регенерации побегов. Оптимизированный регламент получения полноценных растений-регенерантов тритикале озимого в каллусной культуре *in vitro* может быть использован в клеточной селекции и генно-инженерных экспериментах, что значительно ускорит селекцию тритикале, а также дополнит и расширит генетическую изменчивость, необходимую для получения новых сортов с заданными признаками.

Ключевые слова: тритикале, генотип, эксплант, апикальная меристема, каллус, регенерация

Regenerative ability of triticale in shoot apical meristem culture depending on genotype and explant age

Pykalo S. V., Candidate of Biological Sciences

Voloshchuk S. I., Candidate of Agricultural Sciences

Chugunkova T. V., Doctor of Biological Sciences

Prokopik N. I.

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

Purpose. To analyze the effect of genotype and explant age on regenerative ability of winter triticale in shoot apical meristem culture. **Methods.** There were studied 10 winter triticale genotypes (varieties Obrii Myronivskiyi, Myrolan, ADM 11, Izomer, Baltiko, Lider, Kvazar, lines 38/1296, 1324 and F₂ hybrid 809). Methods of *in vitro* plant tissue culture and statistical evaluation were used. **Results.** Comparative analysis of the frequency of callus induction and plant regeneration in shoot apical meristem culture of different ages in 10 genotypes of winter triticale was carried out. In the forms studied genotypic dependence of callus induction and shoot regeneration in *in vitro* culture was found. Direct dependence between explant age and regenerative capacity of calli derived from seedling apices was not detected. The frequency of regeneration from calli induced from shoot apical meristem of 1 and 3-day seedlings differed only in the varieties Baltiko, Myrolan and Izomer, the reliable difference by this indicator in other genotypes was not found. Two types of callus (morphogenic and nonmorphogenic calli) were identified that were formed regardless of explant age. It was revealed that plant regeneration from calli occurred through both gemmorrhizogenesis and somatic embryogenesis. It was established that the line 38/1296 was characterized with the highest frequency of callus induction and shoot regeneration; its explants produced the greatest number of regenerated plants. The lowest frequency of callus induction and shoot regeneration was found in the variety ADM 11. **Conclusions.** In the genotypes studied there was a positive correlation between the frequency of callus induction and shoot regeneration. The optimized procedure of vigorous regenerated plant production of winter triticale in *in vitro* callus culture can be used in cell selection and genetic engineering experiments, it would significantly accelerate triticale breeding as well as supplement and enlarge genetic variability needed to develop new varieties with specified characteristics.

Key words: *Triticale, genotype, explant, apical meristem, callus, regeneration*