

УДК 57.085.23:633.11

Морфогенетичні процеси в культурі апікальних меристем пагонів пшениці та їх взаємозв'язок

Пикало С. В., кандидат біологічних наук
Юрченко Т. В., кандидат сільськогосподарських наук
Прокоп Н. І.
Харченко М. В., кандидат сільськогосподарських наук

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

Мета. Дослідити процеси морфогенезу *in vitro* в культурі апікальних меристем 3-добових проростків сортів пшениці м'якої озимої та виявити взаємозв'язок між ними.
Методи. Досліджували 12 сортів пшениці м'якої озимої: МІП Княжна, Горлиця миронівська, Розкішна, Гордовита, Елегія, Щедра нива, Зіра, Статна, МІП Валенсія, Альбатрос одеський, Поліська 90, Подолянка. Застосовано методи культури тканин і органів *in vitro*, статистичного аналізу.
Результати. Вивчено реакцію сортів пшениці м'якої озимої на умови культивування апікальних меристем 3-добових проростків та досліджено взаємозв'язок морфогенетичних процесів *in vitro*. За морфофізіологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Формування рослин-регенерантів з калюсів відбувалося шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріодогенезу. Встановлено, що високою регенераційною здатністю характеризувався сорт Подолянка, з експлантів якого було отримано найбільшу кількість рослин-регенерантів. Найнижчий регенераційний потенціал виявлено у сорту Поліська 90. Встановлена сильна позитивна статистично достовірна кореляція ($r = 0,84$) між частотою утворення морфогенних калюсів і регенерації пагонів, що свідчить про можливе існування загальної генетичної системи, яка контролює ці процеси. Виявлено сильний зворотний зв'язок ($r = -0,88$) між частотою індукції ризогенезу і регенерації пагонів. Між частотою калюсогенезу та морфогенетичних процесів вірогідної кореляції не виявлено, що вказує на відсутність прямого зв'язку між генетичними чинниками, які їх контролюють.
Висновки. У досліджених сортів частоти калюсогенезу та регенерації пагонів визначаються генотипом експланта. Отримані результати є певним внеском у вивчення теоретичних аспектів процесів морфогенезу *in vitro* пшениці та можуть застосовуватись як елементи біотехнологічних програм. Сорт Подолянка рекомендований як модельний об'єкт у клітинній інженерії, а також для подальших досліджень у біотехнології пшениці.
Ключові слова: *Triticum aestivum* L., апікальна меристема, калюс, морфогенез, регенерація пагонів, кореляція

Вступ. Пшениця є важливою продовольчою культурою і основним продуктом харчування у 43 країнах світу з населенням понад 1 млрд осіб [1]. Поширеність пшениці зумовлена її високою біологічною пластичністю, поживністю зерна, з якого виготовляють багато харчових продуктів [2].

Метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовується для вирішення прикладних завдань селекції різних сільсько-

господарських рослин і, зокрема, пшениці [3]. Особливістю культури соматичних тканин рослин є можливість регенерації повноцінних організмів завдяки властивості тотипотентності рослинної клітини [4, 5]. Морфогенез *in vitro* характеризується багатьма аспектами, такими як фітогормональне сприйняття, дедиференціація диференційованих клітин з надбанням компетентності до органогенезу, повернення спочиваючих клітин до клітинного циклу, організація поділу клітин для формування примордіїв певних органів і меристем [6].

Аналіз літературних джерел, постановка проблеми. Згідно з літературними джерелами, на процеси як калюсогенезу, так і утворення пагонів у культурі *in vitro* крім генотипу впливає тип експланта [7, 8]. Культура тканин *in vitro* злакових уже тривалий час є об'єктом досліджень, але до сьогодні рослини з триби *Gramineae* вважають одним із найскладніших об'єктів для біотехнологічних робіт. Серед головних проблем, що обмежують застосування клітинних технологій у селекції злакових, є низька частота регенерації рослин з культивованих клітин і тканин. Досліджуючи калюсогенез і регенерацію пагонів, зазвичай вибирають той тип експланта, який найбільш зручний для проведення експериментів і забезпечує ефективне отримання достовірних результатів. Як експланти для отримання калюсу з соматичних клітин використовують незрілі [9] та зрілі зародки [10], незрілі суцвіття [11, 12], сегменти колеоптиля [12], мезокотилі [7] та молодих листків [13]. Останніми роками значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найбільш перспективного експланта для злакових культур [14, 15]. Перевагою даного типу експланта є можливість отримувати достатню кількість вихідного матеріалу за короткий проміжок часу та його доступність будь-якої пори року [16]. Бавол А. В. зі співавторами [17] дослідили калюсогенез та регенерацію пагонів у культурі апікальних меристем 3-добових проростків пшениці м'якої та виявили генотипову залежність морфогенетичних процесів *in vitro*.

Як відомо, калюсні культури є гетерогенними системами з певними морфологічними реакціями, які зумовлюють специфіку розвитку окремих органів [8]. Неоднорідність калюсних клітин обумовлює різні шляхи морфогенезу, реалізація яких детермінована і значною мірою визначається генетичними і фізіологічними характеристиками експлантів. Згідно з дослідженнями S. E. Maddock et al. [11], регенерація рослин може проходити шляхом геморизогенезу, тобто одночасного розвитку пагонів і коренів. За даними інших авторів [9, 12], формування рослин відбувається через соматичний ембріодогенез – процес розвитку зародкоподібної біполярної структури (ембріода), що утворюється асексуально з соматичної або статевої клітини. Однак більшість дослідників [6, 18, 19] спостерігали одночасний розвиток з морфогенного калюсу як сома-

тичних ембріоїдів, так і геморизогенних структур, отриманих у процесі органогенезу. На прикладі незрілих зародків м'якої пшениці показано [20, 21], що формотворчі шляхи *in vitro* взаємопов'язані різним чином, а рівень регенераційного потенціалу культури визначається сукупністю генетичних факторів, що обумовлюють морфогенетичні процеси. Незважаючи на те, що співвідношення між утворенням калюсів, коренів і пагонів у культурі апікальних меристем проростків пшениці є важливим критерієм, нині це питання досліджено недостатньо.

Мета досліджень – дослідити процеси морфогенезу *in vitro* в культурі апікальних меристем 3-добових проростків сортів пшениці м'якої озимої та виявити взаємозв'язок між ними.

Матеріали і методика. Дослідження проводили на сортах пшениці м'якої озимої різних установ-оригінаторів України: МІП Княжна, Горлиця миронівська, МІП Валенсія (Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН, або МІП), Подолянка (Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, МІП), Розкішна, Гордовита, Статна (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН), Елегія, Щедра нива (Білоцерківська дослідно-селекційна станція Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН), Альбатрос одеський (Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН), Зіра (Синельниківська селекційно-дослідна станція ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН) та Поліська 90 (ННЦ «Інститут землеробства НААН»).

Для отримання донорних рослин насіння стерилізували у 1 % розчині $KMnO_4$ протягом 3 хв, витримували в 1 % розчині $AgNO_3$ упродовж 1 хв та у 96 % етанолі – 1 хв, після чого тричі промивали стерильною дистильованою водою. Простерилізоване насіння пророщували на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [22]. Донорні рослини культивували у скляному посуді об'ємом 200 мл, в який було розлито по 30 мл цього середовища. Як експлант використовували апікальну меристему пагонів 3-добових стерильних проростків. Розмір експлантів варіював у межах 1,5–2,0 мм. Для кожного сорту було взято по 160 експлантів.

Індукцію та культивування калюсів проводили за методикою О. М. Гончарука зі співавторами [6]. Калюсну тканину отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін (150 мг/л), $AgNO_3$ (10 мг/л) та 2,4-Д (2 мг/л). Експланти культивували впродовж трьох тижнів у темряві за 26 °С, далі протягом двох тижнів при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді. Наприкінці пасажу визначали частоту утворення калюсу (у відсотках) як відношення числа експлантів, що утворили калюс, до їх загальної

кількості. Для індукції морфогенезу калюси переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л 6-бензил-амінопурину та 0,5 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти. Отримані пагони в міру розвитку переносили на безгормональне середовище МС із половинним умістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували у пластикові стаканчики зі спеціально підбраною ґрунтовою сумішшю, які поміщали у вологу камеру на 7–14 діб. Добре укорінені рослини пересаджували у ґрунт. Частоту утворення морфогенного калюсу, ризогенезу та регенерації пагонів по кожному варіанту визначали як відсоток до початкової кількості висаджених експлантів. Проводили кореляційно-регресійний аналіз, визначали похибку середнього арифметичного та довірчий інтервал *t*-критерію Стьюдента з використанням прикладних програм MS Excel 2013 і Statistica 10.

Обговорення результатів. Тотипотентність культивованих клітин, тобто здатність перейти до виконання програми розвитку, визначається як особливостями генотипу рослин, так і умовами культивування *in vitro* [4, 6, 7]. Початок калюсогенезу спостерігали вже на третю-четверту добу культивування (рис. 1).

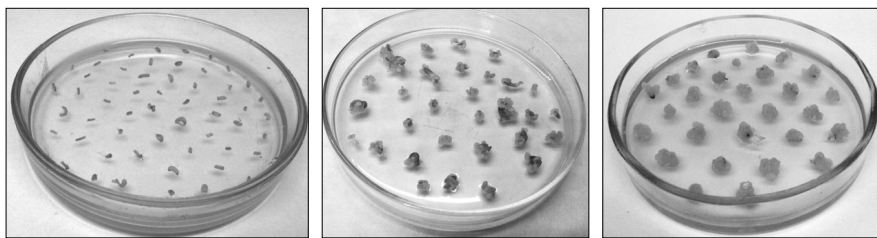


Рис. 1. Етапи індукції калюсу пшениці з апікальних меристем пагонів:
а – вихідні експланти; б – початок калюсоутворення; в – сформовані калюси

Слід зазначити, що досліджувані сорти м'якої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів характеризувалися різною здатністю до індукції калюсу, яка варіювала від 68,1 % у сорту Альбатрос одеський до 95,0 % у сорту Подолянка (табл. 1).

При перенесенні на світло було виявлено два типи калюсу, які розрізнялися за морфологічними властивостями: морфогенний, здатний до регенерації, що мистив агрегати клітин із щільних сегментів жовтувато-білого кольору з ділянками зелених хлорофіловмісних клітин, і неморфогенний, не здатний до морфогенезу, що складався з м'яких водянистих клітин білого кольору, при подальшому культивуванні яких спостерігали некроз (рис. 2).

Таблиця 1. Частота морфогенезу в культурі апікальних меристем пагонів сортів пшениці м'якої озимої

Сорт	Частота, %			
	утворення калусів	утворення морфогенних калусів	ризогенезу	регенерації пагонів
МІП Княжна	80,0±3,2	48,1±3,9	13,8±2,7	18,1±3,0
Горлиця миронівська	87,5±2,6	35,6±3,8	21,3±3,2	10,6±2,4
МІП Валенсія	71,9±3,6	47,5±3,9	16,3±2,9	13,8±2,7
Подольанка	95,0±1,7*	55,6±3,9	6,3±1,9	30,6±3,6*
Розкішна	85,6±2,8	46,3±3,9	13,1±2,7	17,5±3,0
Гордовита	79,4±3,2	42,5±3,9	16,9±3,0	15,0±2,8
Статна	83,1±3,0	43,8±3,9	7,5±2,1	20,6±3,2
Елегія	86,3±2,7	33,1±3,7	17,5±3,0	12,5±2,6
Щедра нива	82,5±3,0	44,4±3,9	14,4±2,8	15,6±2,9
Альбатрос одеський	68,1±3,7	41,9±3,9	8,8±2,2	17,5±3,0
Зіра	70,0±3,6	38,1±3,8	15,0±2,8	13,8±2,7
Поліська 90	86,9±2,7	34,4±3,8	22,5±3,3	9,4±2,3

Примітка. * – достовірно відрізняється від решти сортів при $p \leq 0,05$

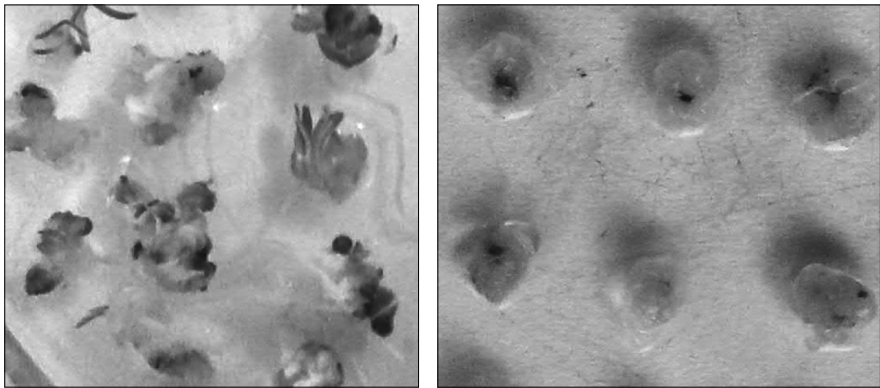


Рис. 2. Типи калусів пшениці м'якої озимої:
а – морфогенні калуси; б – неморфогенні калуси

Відзначено, що у процесі культивування потенційно морфогенний калюс міг переходити до типу неморфогенного, у якого не спостерігали утворення коренів і пагонів. Подібне явище було також продемонстроване раніше в дослідженнях на пшениці, житі та ячмені [23].

Виявлено, що морфогенний калюс утворювався у всіх досліджуваних сортів пшениці, однак із різною частотою, найбільшою у сорту Подольанка (55,6 %), а також у сортів МІП Княжна (48,1 %) і МІП Валенсія (47,5 %). Децю нижчий морфогенетичний потенціал (33,1 %) демонстрував сорт Елегія.

Варто зазначити, що отримання морфогенних калюсів і подальша регенерація з них рослин є невід'ємною складовою багатьох рослинних біотехнологій. Мардамшин А. Г. та Мустафіна А. Р. [24] показали, що баланс ендогенних фітогормонів визначає подальшу проліферацію калюсної тканини. Порівняльний імуноферментний аналіз наявності ендогенних фітогормонів у калюсній тканині гороху посівного виявив, що вміст цитокінінів у морфогенному калюсі набагато вищий, ніж у неморфогенному. У роботі М. І. Соболевої та І. В. Логінова [21] показано залежність морфогенної здатності клітинних культур від різних факторів. На їхню думку, тотипотентність і проліферація тісно пов'язані єдиним молекулярним механізмом, вимикання або порушення якого призводить у культурі *in vitro* до формування неморфогенного калюсу. Як стверджує Л. В. Хотильова зі співавторами [25], необхідною умовою здатності калюсних клітин до морфогенезу є певний рівень розвитку мембранної системи мітохондрій. Досліджуючи ультраструктуру мітохондрій різних типів калюсів тритикале, ці автори показали, що калюсні тканини морфогенного типу відрізняються від неморфогенного наявністю мітохондрій з більш розвинутою мембранною системою на одиницю площі органели. Круглова Н. Н. і Катасонова А. А. [26] за культивування *in vitro* різновікових зародків пшениці м'якої виявили, що основною умовою формування морфогенних калюсів є виділення експлантів із рослин на певній стадії органогенезу, яка характеризується певним цито-гістологічним статусом зародка. Введення зародків у культуру *in vitro* на більш ранній або пізній стадії їх розвитку призводило до індукції неморфогенних калюсів. Таким чином, потенціал експланта щодо реалізації калюсогенезу є істотно ширшим, ніж його морфогенетична здатність.

У процесі культивування всі морфогенні калюси в міру розвитку пересаджували на модифіковане середовище для регенерації, яка відбувалась шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріоїдогенезу (рис. 3).

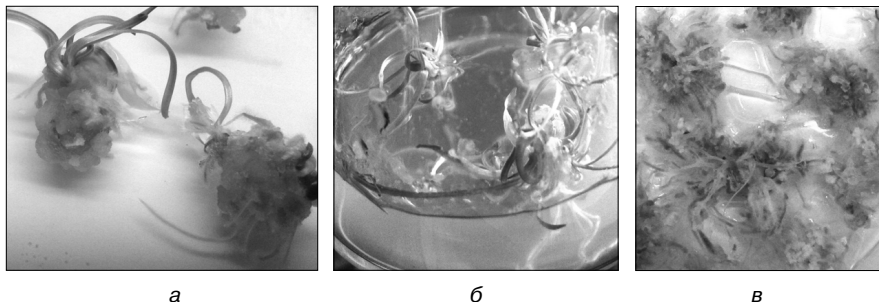


Рис. 3. Шляхи морфогенезу в культурі *in vitro* пшениці:
а – геморизогенез; б – соматичний ембріоїдогенез; в – ризогенез

Відомо, що соматичний ембріодогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки в даному випадку формування рослин починається із проростання зародка (ембріюда), який має зачатки усіх органів [16, 17]. Найбільшу частоту утворення соматичних зародків було відмічено на 22–25-у добу культивування, а геморизогенних структур – на 26-у добу вирощування після пересадки калюсів на регенераційне середовище МС.

Зазначимо, що регенерацію пагонів відмічали у всіх досліджуваних генотипів, проте з різною частотою. Найвищою вона була у сорту Подолянка (30,6 %), який за цим показником достовірно відрізнявся від решти сортів. Зважаючи на це, вищезгаданий сорт можна використовувати як модельний об'єкт у клітинній інженерії та генетичній трансформації рослин. Найменшу частоту регенерації пагонів виявлено у сорту Поліська 90 – було отримано менше 10 % регенерантів. Очевидно, генотип відіграє ключову роль у спроможності формувати калюс з високою регенераційною здатністю. У багатьох роботах [6, 10, 16, 19, 23] виявлено значні відмінності між сортами різних злаків за показниками ефективності калюсоутворення і регенерації.

Варто підкреслити, що незважаючи на активні морфогенні процеси у калюсних тканинах у більшості генотипів отримано незначну кількість регенерантів. Основною причиною цього явища, 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 для отримання стійких форм рослин.

Отримані рослини-регенеранти у подальшому розвивались подібно до інтактних рослин пшениці в умовах *in vivo*. Відзначались типові фенофази сходів, третього листка, кущіння. Рослини-регенеранти у фазі кущіння переносили в умови *ex vitro* (пластикові стаканчики з ґрунтовою сумішшю) (рис. 4).

Як відомо, процес отримання рослин-регенерантів у культурі *in vitro* є багатоступеневим і включає етапи індукції і проліферації калюсу, морфогенезу та регенерації рослин [6, 10, 12]. Хоча кожен попередній етап визначає можливість наступного, все ж немає підстав вважати, що підвищення рівня одного з них неминуче призведе до зростання іншого. З погляду на це ми вважали за потрібне проаналізувати кореляційні зв'язки між формотворчими процесами *in vitro* та їх статистичну значущість.

За результатами кореляційного аналізу виявлено сильну позитивну статистично достовірну кореляцію ($r = 0,84$) між частотою утворення морфогенних калюсів і регенерації пагонів пшениці (табл. 2).



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

Таблиця 2. Кореляційні зв'язки морфогенетичних процесів у культурі апікальних меристем пагонів пшениці

Морфогенетичні процеси <i>in vitro</i>	Калюсогенез	Утворення морфогенного калюсу	Ризогенез
Утворення морфогенного калюсу	0,12	–	–
Ризогенез	0,04	-0,71*	–
Регенерація пагонів	0,31	0,84**	-0,88**

Примітки: * – достовірно при $p < 0,05$; ** – достовірно при $p < 0,01$

Це вказує на наявність певної генетичної системи, що контролює ці процеси. Подібні результати були отримані також у дослідженнях інших авторів [20, 21].

Результати кореляційного аналізу дають підстави вважати процес калюсоутворення генетично незалежним від морфогенезу. Т. Komatsuda et al. [27] у дослідях з незрілими зародками ячменю методом діалельного аналізу довели, що здатність до індукції калюсу та регенерації детермінуються незалежними генетичними системами.

У ході досліджень нами встановлена суттєва негативна кореляція ($r = -0,71$) між частотою утворення морфогенних калюсів і ризогенезу. У сортів з підвищеним рівнем ризогенезу відмічали зниження рівня регенерації пагонів і, як наслідок, зменшення виходу регенерантів. Встановлено сильний зворотний зв'язок ($r = -0,88$) між частотою ризогенезу і регенерації рослинки, що є, на наш погляд, цілком очевидним. У роботі Л. П. Хлебової зі співавторами [20] в культурі незрілих зародків пшениці м'якої

ярої також виявлено високу негативну кореляцію між ефективністю регенерації і частотою ризогенезу. Автори підсумували, що калюсна культура *in vitro* є складною інтегрованою біологічною системою, всередині структурних елементів якої існують певні морфофізіологічні зв'язки. Цей висновок цілком підтверджено результатами наших досліджень.

З літературних джерел відомо [28], що зміни, які відбуваються за морфогенезу *in vitro*, контролюються спеціальними генами, проте механізми їх експресії вивчені недостатньо. Вважають, що морфогенез *in vitro* є полігенною ознакою і контролюється кількома хромосомами [28–30]. У роботі Е. К. Kaleikau et al. [29] для виявлення генетичних факторів, що детермінують здатність калюсу до регенерації, були використані дителосомні і нуллтетрасомні лінії пшениці сорту Chinese Spring. За результатами проведених досліджень були виявлені істотні відмінності між анеуплоїдними і еуплоїдними лініями за швидкістю росту регенеруючих калюсів. 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. Вбудова в геном цього сорту чужорідної хромосоми (7R хромосоми жита), навпаки, дала можливість підвищити частоту регенерації рослин. Таким чином, регуляція індукції калюсоутворення і регенераційної здатності має складну генетичну природу і, безумовно, потребує подальшого вивчення.

Висновки. Досліджено процеси морфогенезу *in vitro* в культурі апікальних меристем 3-добових проростків сортів пшениці м'якої озимої. Встановлено, що у вивчених форм частота калюсогенезу і регенерації пагонів визначається генотипом експланта. Встановлено суттєву позитивну кореляцію ($r = 0,84$) між частотою утворення морфогенних калюсів і регенерації пагонів, що свідчить про можливе існування загальної генетичної системи, яка контролює ці процеси. Виявлено сильний зворотний зв'язок ($r = -0,88$) між частотою ризогенезу і регенерації пагонів. Між частотою індукції калюсогенезу та інших морфогенетичних процесів достовірної кореляції не виявлено, що вказує на відсутність зв'язку між генетичними чинниками, що їх контролюють. Отримані результати є певним внеском у вивчення теоретичних аспектів процесів морфогенезу *in vitro* пшениці та можуть застосовуватись як елементи біотехнологічних програм. Сорт Подолянка рекомендований як модельний об'єкт у клітинній інженерії, а також для подальших досліджень у галузі біотехнологій пшениці.

Список використаних джерел

1. Черенков А. В., Гасанова І. І., Солодушко М. М. Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. Дніпропетровськ, 2014. № 6. С. 3–6.
2. Жемела Г. П., Кузнецова О. А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м'якої озимої. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. Полтава, 2012. № 3. С. 23–25.
3. Дубровна О. В., Бавол А. В. Мінливість геному пшениці в культурі *in vitro*. *Цитологія и генетика*. 2011. Т. 45, № 5. С. 76–84.
4. Neelakandan A. K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*. 2012. Vol. 31, Iss. 4. P. 597–620. doi: 10.1007/s00299-011-1202-z
5. Dodig D., Zorić M., Mitić N., Nikolić R., Šurlan-Momirović G. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008. Vol. 95, Iss. 1. P. 107–114. doi: 10.1007/s11240-008-9421-x
6. 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.
7. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40, № 2. С. 150–156.
8. Dodig D., Zorić M., Mitić N., Nikolić R., King S. R. Morphogenetic responses of embryo culture of wheat related to environment culture conditions of the explant donor plant. *Scientia Agrícola*. 2010. Vol. 67, No. 3. P. 295–300. doi: 10.1590/S0103-90162010000300007
9. Dağüstü N. Comparison of callus formation and plantlet regeneration capacity from immature embryo culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2008. Vol. 22, Iss. 3. P. 778–781. doi: 10.1080/13102818.2008.10817552
10. Delporte F., Pretova A., Du Jardin P., Watillon B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*. 2014. Vol. 251, Iss. 6. P. 1455–1470. doi: 10.1007/s00709-014-0647-7
11. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Experimental Botany*. 1983. Vol. 34, Iss. 7. P. 915–926. doi: 10.1093/jxb/34.7.915
12. Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000. Vol. 61, Iss. 2. P. 107–113. doi: 10.1023/A:1006464208686
13. 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, Iss. 1. P. 46–50. doi: 10.4236/abb.2012.31008
14. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2002. Vol. 38, Iss. 2. P. 163–168. doi: 10.1079/IVP2001267
15. Sticklen M. B., Oraby H. F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2005. Vol. 41, Iss. 3. P. 187–200. doi: 10.1079/IVP2004616
16. Гончарук О. М., Бавол А. В., Дубровна О. В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2011. Т. 11. С. 237–241.

17. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5, №1/2. С. 3–10.
18. Ahloowalia B. S. Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Science*. 1982. Vol. 22, No. 2. P. 405–410. doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200020047x
19. Мирошниченко Д. Н., Соколов Р. Н., Аликина О. В., Долгов С. В. Скрининг регенераційного потенціала ди-, тетра- і гексаплоїдних сортів і видів пшениці в культурі *in vitro*. *Біотехнологія*. 2014. № 1. С. 38–51.
20. Хлебова Л. П., Никитина Е. Д., Мацюра А. В., Бычкова О. В. Взаимосвязь морфогенетических процессов в культуре ткани пшеницы. *Біологічний вісник МДПУ імені Богдана Хмельницького*. Мелітополь, 2016. Т. 6, № 2. С. 311–320.
21. Соболева М. И., Логинов И. В. Статистические характеристики, маркирующие морфогенез в каллусных культурах яровой мягкой пшеницы. *Физиология растений*. 2004. Т. 51, № 2. С. 297–296.
22. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
23. Сидор Л. С., Орлов П. А. Регенераційний потенціал різних видів пшениці, ржи і ячменя в культурі листових експлантів. *Цитологія і генетика*. 2005. Т. 39, № 5. С. 28–34.
24. Мардамшин А. Г., Мустафина А. Р. Сравнительный анализ содержания эндогенных фитогормонов в морфогенной и неморфогенной каллусной ткани гороха посевного. *Біотехнологія*. 2001. № 1. С. 27–29.
25. Хотылева Л. В., Матвеев С. Н., Рубан В. В. Каминская Л. Н. Особенности структуры цитоплазматических органелл в клетках каллуса и регенерантов гетерозисных гибридов тритикале. *Цитология и генетика*. 1995. Т. 29, № 1. С. 23–28.
26. Круглова Н. Н., Катасонова А. А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41, № 2. С. 124–131.
27. Komatsuda T., Enomoto S., Nakajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. *Journal of Heredity*. 1989. Vol. 80, Iss. 5. P. 345–350. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a110872
28. Tyankova N. D., Zagorska N. A. Genetic control of *in vitro* response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2001. Vol. 37, Iss. 5. P. 524–530. doi: 10.1007/s11627-001-0091-1
29. Kaleikau E. K., Sears R. G., Gill B. S. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1989. Vol. 78, Iss. 6. P. 783–787. doi: 10.1007/BF00266658
30. Amer I. B., Worland A. J., Börner A. Chromosomal location of genes affecting tissue-culture response in wheat. *Plant Breeding*. 1995. Vol. 114, Iss. 1. P. 84–85. doi: 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00766.x

References

1. Cherenkov, A. V., Gasanova, I. I., & Solodushko, M. M. (2014). Winter wheat – the development and selection of culture in historical perspective. *Bulletin Institute of Agriculture of Steppe Zone NAAS of Ukraine*, 6, 3–6. [in Ukrainian]
2. Zhemela, G. P., & Kuznetsova, O. A. (2012). Influence of high quality properties on productivity and quality of soft winter wheat grain. *News of Poltava State Agrarian Academy*, 3, 23–25. [in Ukrainian]. doi: 10.31210/visnyk2012.03.04
3. Dubrovna, O. V., & Baval, A. V. (2011). Variability of the wheat genome during *in vitro* culture. *Cytol. Genet.*, 45(5), 333–340. doi: 10.3103/S0095452711050033

4. Neelakandan, A. K., & Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.*, 31(4), 597–620. doi: 10.1007/s00299-011-1202-z
5. Dodig, D., Zorić, M., Mitić, N., Nikolić, R., & Šurlan-Momirović, G. (2008). Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell Tiss. Org.*, 95(1), 107–114. doi: 10.1007/s11240-008-9421-x.
6. Goncharuk, A. N., Bovol, A. V., & Dubrovna, O. V. (2014). Morphogenesis in apical meristems culture of highly productive winter wheat varieties. *Plant Physiology and Genetics*, 46(3), 245–251. [in Ukrainian]
7. Bovol, A. V., Dubrovna, O. V., & Lialko, I. I. (2008). Plant regeneration from various types of explants of soft wheat. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 40(2), 150–156. [in Ukrainian]
8. Dodig, D., Zorić, M., Mitić, N., Nikolić, R., & King, S. R. (2010). Morphogenetic responses of embryo culture of wheat related to environment culture conditions of the explant donor plant. *Sci. Agric.*, 67(3), 295–300. doi: 10.1590/S0103-90162010000300007
9. Dağüstü, N. (2008). Comparison of callus formation and plantlet regeneration capacity from immature embryo culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Biotechnol. Biotech. Eq.*, 22(3), 778–781. doi: 10.1080/13102818.2008.10817552
10. Delporte, F., Pretova, A., Du Jardin, P., & Watillon, B. (2014). Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma*, 251(6), 1455–1470. doi: 10.1007/s00709-014-0647-7
11. Maddock, S. E., Lancaster, V. A., Risiott, R., & Franklin, J. (1983). Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *J. Exp. Bot.*, 34(7), 915–926. doi: 10.1093/jxb/34.7.915
12. Benkirane, H., Sabounji, K., Chlyah, A., & Chlyah, H. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat. *Plant Cell Tiss. Org.* 61(2), 107–113. doi: 10.1023/A:1006464208686
13. Yu, H., Wang, W., Wang, Y., & Hou, B. (2012). High frequency wheat regeneration from leaf tissue explants of regenerated plantlets. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 3(1), 46–50. doi: 10.4236/abb.2012.31008
14. Ahmad, A., Zhong, H., Wang, W., & Sticklen, M. (2002). Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38(2), 163–168. doi: 10.1079/IVP2001267
15. Sticklen, M. B., & Oraby, H. F. (2005). Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 41(3), 187–200. doi: 10.1079/IVP2004616
16. Honcharuk, O. M., Bovol, A. V., & Dubrovna, O. V. (2011). Morphogenic potential of high-yielding winter wheat varieties in shoot apical meristem culture. *Topics in Experimental Evolution of Organisms*, 11, 237–241. [in Ukrainian]
17. Bovol, A. V., Dubrovna, O. V., & Lialko, I. I. (2007). Plant regeneration from shoot tips of wheat. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 5(1/2), 3–10. [in Ukrainian]
18. Ahloowalia, B. S. (1982). Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci.*, 22(2), 405–410. doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200020047x
19. Miroshnichenko, D. N., Sokolov, R. N., Alikina, O. V., & Dolgov, S. V. (2014). Comparative analysis of tissue culture efficiency of di-, tetra- and hexaploid wheat breeds and species. *Biotechnology*, 1, 38–51. [in Russian]
20. Khlebova, L. P., Nikitina, E. D., Matsyura, A. V., & Bychkova, O. V. (2016). Relationship of morphogenetic processes in wheat tissue culture. *Ukr. J. Ecol.*, 6(2), 311–320. [in Russian]
21. Soboleva, M. I., & Loginov, I. V. (2004). Statistical parameters reflecting morphogenetic capacity of soft spring wheat calluses. *Russ. J. Plant Physiol.*, 51(2), 257–265. doi: 10.1023/b:ruopl.0000019223.23756.71

22. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
23. Sidor, L. S., & Orlov, P. A. (2005). Regeneration potential of different types of wheat, rye and barley in culture of leaf explants. *Cytol. Genet.*, 39(5), 28–34. [in Russian]
24. Mardamshin, A. G., & Mustafina, A. R. (2001). Comparative analysis of the content of endogenous phytohormones in the morphogenic and non-morphogenic callus tissue of pea. *Biotechnology*, 1, 27–29. [in Russian]
25. Khotyleva, L. V., Matveenko, S. N., Ruban, V. V., & Kaminskaya, L. N. (1995). Features of the structure of cytoplasmic organelles in callus cells and regenerants of heterotic triticale hybrids. *Cytol. Genet.*, 29(1), 23–26. [in Russian]
26. Kruglova, N. N., & Katasonova, A. A. (2009). Immature wheat embryo as the morphogenetically competent explant. *Physiology and Biochemistry of Cultivated Plants*, 41(2), 124–131. [in Russian]
27. Komatsuda, T., Enomoto, S., & Nakajima, K. (1989). Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. *J. Hered.*, 80(5), 345–350. doi: 10.1093/oxford-journals.jhered.a110872
28. Tyankova, N. D., & Zagorska, N. A. (2001). Genetic control of in vitro response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37(5), 524–530. doi: 10.1007/s11627-001-0091-1
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. doi: 10.1007/BF00266658
30. Amer, I. B., Worland, A. J., & Börner, A. (1995). Chromosomal location of genes affecting tissue-culture response in wheat. *Plant Breed.*, 114(1), 84–85. doi: 10.1111/j.1439-0523.1995.tb00766.x

Морфогенетические процессы в культуре апикальных меристем побегов пшеницы и их взаимосвязь

Пыкало С. В., кандидат биологических наук

Юрченко Т. В., кандидат сельскохозяйственных наук

Прокопик Н. И.

Харченко М. В., кандидат сельскохозяйственных наук

Мироновский институт пшеницы имени В. Н. Ремесло НААН

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

e-mail: pykserg@ukr.net

Цель. Исследовать процессы морфогенеза *in vitro* в культуре апикальных меристем 3-дневных проростков сортов озимой мягкой пшеницы и выявить взаимосвязь между ними. **Методы.** Исследовали 12 сортов озимой мягкой пшеницы: МІП Княжна, Горлица миронівська, Розкішна, Гордовита, Елегія, Щедра нива, Зіра, Статна, МІП Валенсія, Альбатрос одеський, Поліська 90, Подолянка. Используются методы культуры тканей и органов *in vitro*, статистического анализа. **Результаты.** Изучена реакция сортов озимой мягкой пшеницы на условия культивирования апикальных меристем 3-суточных проростков и исследована взаимосвязь морфогенетических процессов *in vitro*. По морфофизиологическим свойствам выделены два типа каллуса: морфогенный и неморфогенный. Формирование растений-регенерантов из каллусов пшеницы происходило путем как гемморизогенеза, так и соматического эмбриоидогенеза. Установлено, что высокой регенерационной способностью характеризовался сорт Подолянка, из эксплантов которого было получено наибольшее количество растений-регенерантов. Самый низкий регенерационный потенциал выявлен у сорта Поліська 90. Установлена сильная положительная статистически достоверная корреляция

($r = 0,84$) между частотой образования морфогенного каллуса и регенерации побегов, что свидетельствует о возможном существовании общей генетической системы, контролирующей эти процессы. Выявлена сильная отрицательная связь ($r = -0,88$) между частотой индукции ризогенеза и регенерации побегов. Между частотой каллусогенеза и морфогенетических процессов достоверной зависимости не обнаружено, что указывает на отсутствие прямой связи между контролирующими их генетическими факторами. **Выводы.** У исследуемых сортов частота каллусогенеза и регенерации побегов определяется генотипом экспланта. Полученные результаты вносят определенный вклад в изучение теоретических аспектов процессов морфогенеза *in vitro* пшеницы и могут применяться как элементы биотехнологических программ. Сорт Подoliaнка рекомендован в качестве модельного объекта в клеточной инженерии, а также для дальнейших исследований в биотехнологии пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., апикальная меристема, каллус, морфогенез, регенерация побегов, корреляция

Morphogenetic processes in shoot apical meristem culture of wheat and their relationship

Pykalo S. V., Candidate of Biological Sciences

Yurchenko T. V., Candidate of Agricultural Sciences

Prokopik N. I.

Kharchenko M. V., Candidate of Agricultural Sciences

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

Purpose. To study morphogenetic processes in *in vitro* culture of apical meristem of 3-day-old seedlings of bread winter wheat varieties and to reveal the relationship between them. **Methods.** There were used 12 bread winter wheat varieties: MIP Kniashna, Horlytsia myronivska, Rozkishna, Hordovyta, Elehiia, Shchedra nyva, Zira, Statna, MIP Valensiia, Albatros odeskyi, Poliska 90, Podoliianka. Methods of plant tissue and organ *in vitro* culture and statistical evaluation were used. **Results.** The response of bread winter wheat varieties to *in vitro* culture of apical meristem of 3-day-old seedlings was investigated and the relationship of morphogenetic processes was studied. Two types of callus by morphophysiological properties were identified: morphogenic and nonmorphogenic one. Development of regenerated plants from wheat calli occurred *via* both gemmorrhizogenesis and somatic embryogenesis. The variety Podoliianka was characterized with the highest regeneration ability; from its explants the greatest numbers of regenerated plants were obtained. The lowest regeneration potential was found in the variety Poliska 90. Strong positive statistically significant correlation ($r = 0.84$) was established between formation of morphogenic callus and shoot regeneration which indicates the possible existence of general genetic system that controls these processes. Strong negative correlation ($r = -0.88$) between rhizogenesis and shoot regeneration was revealed. Significant correlation between callus induction and morphogenetic processes was not found, indicating no direct relation between genetic factors which control them. **Conclusions.** In the varieties studied the frequencies of callus induction and shoot regeneration were defined by genotype of explant. The results obtained contribute to the study of theoretical aspects of *in vitro* morphogenesis processes in wheat and can be used as elements of biotechnological programs. The variety Podoliianka is recommended as a model object for plant cell engineering, as well as for further research in wheat biotechnology.

Key words: *Triticum aestivum* L., apical meristem, callus, morphogenesis, shoot regeneration, correlation