

МОРФОГЕНЕЗ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПОБЕГОВ

С.В. ПЫКАЛО¹, М.А. ЗИНЧЕНКО², С.И. ВОЛОЩУК¹, О.В. ДУБРОВНАЯ²

*¹Мироновский институт пшеницы имени В.Н. Ремесло НААН Украины
с. Центральное Мироновского района Киевской области, Украина*

*²Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
г. Киев, Украина, pykserg@ukr.net*

Введение. Сравнительно новый ботанический вид – тритикале, считается перспективной сельскохозяйственной культурой, на зерно которой с каждым годом все больше растет спрос на мировом рынке (Білітюк, 2004). На сегодня данная культура нуждается в разработке биотехнологических методов решения прикладных задач ее селекции (Волощук, 2012). Получение морфогенного каллуса и последующая регенерация растений – неотъемлемая часть многих биотехнологий этой культуры (Immonen, 1993). Злаки представляют трудный объект с точки зрения экспериментальной биотехнологии. Одной из причин, обуславливающих сложность получения каллусной ткани у

злаков по сравнению с двудольными, является неспособность к образованию раневого каллуса в естественных условиях (Ваго, 1999). Известно, что интенсивность процессов каллусогенеза и образования побегов в культуре *in vitro* многих злаков, и тритикале в том числе, в значительной мере определяется типом экспланта (Haliloglu, 2006). Однако до сих пор не решена проблема его надежности, доступности в любой момент времени и способности к образованию каллуса с высоким регенерационным потенциалом, который сохраняет морфогенетическую активность достаточно длительное время (Бавол, 2007).

Незрелый зародыш является основным эксплантом у тритикале, на основе использования которого разработаны эффективные клеточные технологии получения регенерантов (Lorn, 1988). Однако его применение имеет определенные недостатки, к которым относятся довольно короткий период использования в культуре и значительные затраты времени и средств для получения донорных растений (Волощук, 1998). Это обстоятельство заставило исследователей искать альтернативные типы эксплантов в качестве которых использовали зрелые зародыши или их части, незрелые соцветия, сегменты молодых листьев (Mendoza, Kaeppler, 2002).

В последнее время значительно возрос интерес к апикальной меристеме побегов, как наиболее перспективному экспланту для злаковых культур (Ahmad, 2002), поскольку к его преимуществам относится возможность преодоления генотипических особенностей форм, характеризующихся низким регенерационным потенциалом, а также возможность получения значительного количества исходного материала за короткое время (Zhang, 1996). В последнее десятилетие ученые успешно работают с апексами побегов проростков кукурузы, овса, сорго, проса, пшеницы, тритикале и ячменя для разработки эффективных и менее зависимых от генотипа систем регенерации зерновых (Pizetakiwicz, 2003). Культуру апикальных меристем широко используют как источник каллусной ткани для клеточной селекции и генетической трансформации растений, поскольку меристемные сегменты побегов содержат пул клеток, которые активно делятся, и характеризуются высокой частотой индукции каллуса – до 90% (Patnaik, Khurana, 2001). В связи с этим, целью нашей работы было исследование особенностей процессов каллусогенеза и регенерации в культуре апикальных меристем побегов разных генотипов озимого тритикале.

Методика и объекты исследования. Объектом исследования были сорта озимого тритикале Обрий, Миролан, АДМ 11, линии 38/1296 и 1324, гибрид F₂ 809, которые были взяты из рабочей коллекции Мироновского института пшеницы им. В.Н. Ремесло НААН Украины. Для получения донорных растений семена сначала стерилизовали 1%-ным раствором KMnO₄ в течение 3 мин. Затем в течение 1 мин его выдерживали в 1%-ном растворе AgNO₃ и помещали в 96%-ный этанол на 1 мин. Конечным этапом стерилизации было 3-разовое промывание стерильной дистиллированной водой. Полученные простерилизованные семена проращивали на свету при 24 °С на безгормональной среде Мурасиге–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962). В качестве эксплантов использовали апикальную меристему побега 3-суточных стерильных проростков. Размер эксплантов варьировал в пределах 1,5–2,0 мм. Для каждого генотипа было взято по 160 эксплантов (4 чашки Петри по 40 эксплантов).

Культуру каллусной ткани получали на среде МС, которая дополнительно содержала L-аспарагин –150 мг/л, AgNO₃ – 10 мг/л и 2 мг/л 2,4-Д. Экспланты культивировали при 26 °С в темноте в течении трех недель. Затем их переносили на свет и дальше выращивали при освещении 3–4 клк, относительной влажности воздуха 70% и 16-часовом фотопериоде еще в течении двух недель. В конце пассажа определяли частоту индукции каллуса (в процентах) как соотношение числа эксплантов, образовавших каллус, к их общему числу.

Для индукции регенерации каллус переносили на регенерационную среду МС, дополненную 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК. Полученные побеги по мере развития переносили на безгормональную среду МС с половинным содержанием макросолей для укоренения. Укоренившиеся регенеранты пересаживали в стерильный песок и помещали во влажную камеру на 7–14 суток. Хорошо укоренившиеся растения переносили в почву.

Частоту образования морфогенного каллуса и регенерации побегов (в процентах) определяли как соотношение числа морфогенных каллусов или с регенерантами к общему количеству высаженных эксплантов. Экспериментально полученные данные обрабатывали с помощью методов статистического анализа (Лакин, 1990).

Результаты и их обсуждение. Морфогенез *in vitro* состоит из многих аспектов, таких как фитогормональное восприятие, дедифференциация дифференцированных клеток для достижения компетентности органогенеза, возвращение покоящихся клеток в клеточный цикл и организация деления клеток для формирования примордиев определенных органов и меристемы (Patnaik,

Khurana, 2001). Предыдущие эксперименты с культивируемыми клетками показали, что не только состав питательных сред, условия культивирования, тип тканей эксплантов, условия подготовки растительного материала к введению его в культуру, но и генотипические особенности влияют на процессы морфогенеза (Komatsuda, 1989). Нами установлено, что исследуемые генотипы характеризовались различной способностью к образованию каллуса, которая варьировала от 68,6% у сорта АДМ 11 до 95,4% у линии 38/1296 (рис. 1).

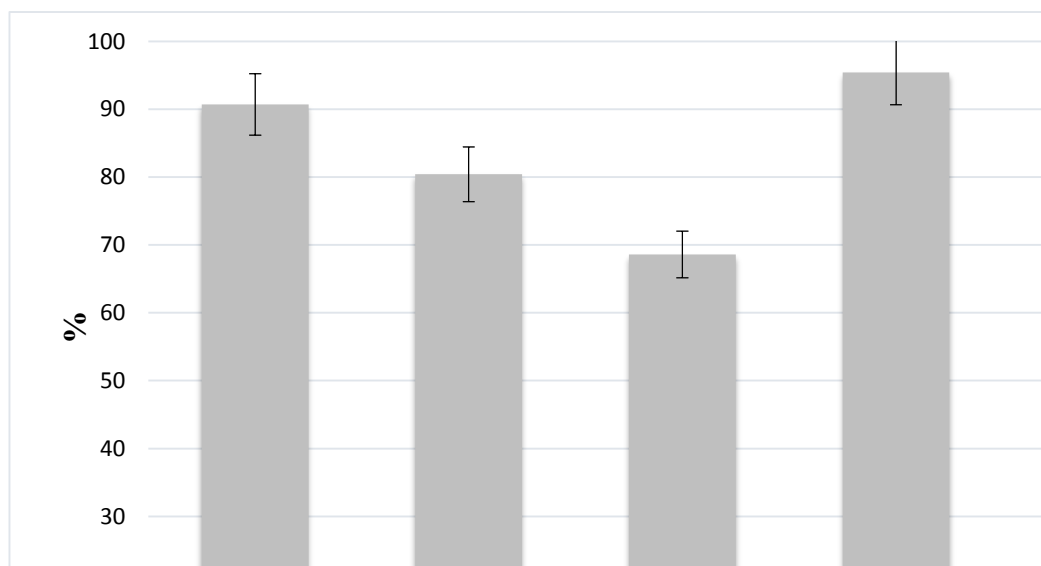


Рисунок 1 – Частота индукции каллуса у разных генотипов тритикале озимого

Начало каллусогенеза у некоторых исследуемых форм наблюдали уже на третьи – четвертые сутки культивирования. Образовывался прозрачный светлый каллус аморфной консистенции. После переноса на свет через 10–16 суток культивирования было обнаружено два типа каллуса, которые различали по морфофизиологическим свойствам: морфогенный каллус – плотный, желтый, глобулярный, который оказался способным на среде для регенерации образовывать побеги и корни, и неморфогенный каллус – рыхлый, водянистый, прозрачный.

В наших исследованиях после переноса каллусов на свет, через 2 недели выращивания, на части из них наблюдали появление плотных зеленых участков. Такой каллус мы относили к морфогенному типу. При дальнейшем культивировании часть из них формировала побеги. Все изученные генотипы озимого тритикале были способны образовывать морфогенный каллус, но с разной частотой. Наибольшая частота его образования обнаружена у линии 38/1296 (58,4 %), а также у сортов Миролан (49,7 %) и Обрий (46,5 %). Наименьшей частотой образования морфогенного каллуса характеризовался сорт АДМ 11 – 26,7 % (табл.).

Таблица – Частота образования морфогенного каллуса и побегов в культуре апикальных меристем побегов озимого тритикале

Генотип	Частота образования каллуса, %	Частота морфогенных каллусов, %	Частота регенерации побегов, %
Обрий	90,7±2,3	46,5±3,9	13,9±2,7
Миролан	80,4±3,1	49,7±4,0	12,7±2,6
АДМ 11	68,6±3,6	26,7±3,5	8,6±2,2
38/1296	95,4±1,7	58,4±3,9	36,4±3,8
1324	78,6±3,2	35,4±3,8	11,7±2,5
F ₂ 809	80,3±3,1	39,2±3,9	11,2±2,5

После переноса каллусов на регенерационную среду, которая дополнительно содержала 1 мг/л БАП, наблюдали образование плотных зеленых или светло-желтых глобулярных участков. При дальнейшем культивировании на зеленых участках отмечался интенсивный ризогенез, в то время как на глобулярных участках образовывались побеги. Формирование соматических зародышей

наблюдали на 7–10 сутки культивирования на регенерационной среде. Максимальная частота образования соматических зародышей отмечена на 18–20 сутки культивирования. Важно подчеркнуть, что соматический эмбриогенез биотехнологически оптимальнее, поскольку в данном случае растение формируется из зародыша, который имеет зачатки всех органов. Максимальная частота образования соматических зародышей отмечена на 20–24 сутки культивирования.

Регенерация побегов происходила у всех исследуемых генотипов. Однако среди исследуемых сортов оказались существенные различия по способности к регенерации. Наибольшей частотой регенерации побегов характеризовалась линия 38/1296 – 36,4%. Наименьшая была обнаружена у сорта АДМ 11 – было получено лишь 8,6 % регенерантов. Дальнейшее развитие растений–регенерантов происходило подобно развитию интактных растений тритикале в природных условиях *in vivo*.

Одним из показателей, который определяет эффективность регенерации является количество полученных побегов из одного каллуса. В наших исследованиях обнаружено, что на одном каллусе образовывалось от 1 до 6 побегов (рис. 2). Как видно на рис.2, наблюдалось значительное влияние генотипа на этот показатель. Среди исследуемых генотипов среднее количество побегов на один каллус варьировало от 1,8 у сорта АДМ 11 до 5,6 – у линии 38/1296. Этот показатель был самым высоким у линии 38/1296, которая отличалась и наивысшей регенерационной способностью. В то время как сорт Обрий, который характеризовался относительно высоким регенерационным потенциалом, вероятно, формирует значительное количество побегов за счет высокого процента каллусов, которые способны к регенерации, поскольку каждый отдельный каллус образовывал в среднем 3,8 побега. Сорт с низкой регенерационной способностью АДМ 11 отличался и наименьшим количеством побегов, которые образовывались на одном каллусе – 1,8.

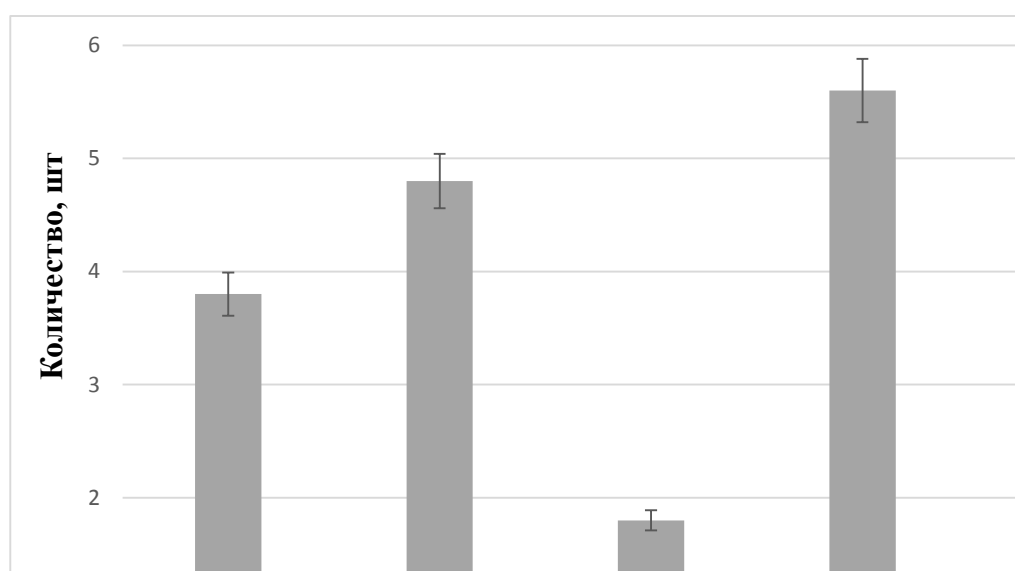


Рисунок 2 – Среднее количество побегов, полученных из одного каллуса

Разная частота каллусообразования, наблюдаемая в наших опытах с генотипами тритикале в культуре апикальных меристем, и значительные различия между генотипами по частоте регенерации побегов подтверждают существование различных генетических систем регуляции этих процессов. Некоторые исследователи считают, что такие признаки как способность к индукции каллуса и регенерационный потенциал контролируются независимыми генетическими системами (Komatsuda, 1989). С помощью диалельного анализа была доказана справедливость такого предположения для культуры тканей незрелых зародышей ячменя. Позже в ряде работ было показано влияние генотипа и на регенерационную способность культивируемых тканей пшеницы (Henry, 1994).

Классические генетические подходы позволяют не только обнаруживать гены, которые отвечают за различия в проявлении тотипотентности *in vitro*, но и определять их локализацию на генетических картах. Исследования на мутантах подтвердили, что большое влияние на проявление тотипотентности *in vitro* имеют гены, изменяющие уровень гормонов в клетках или порог чувствительности к ним (Galiba, 1986). В работах, выполненных на изогенных линиях пшеницы, различа-

ющихся по аллелями гена Rht, ответственного за чувствительность растений к гиббереллину, показано, что аллельные различия влияют на рост и морфогенез каллусных культур, хотя этот эффект зависел от генотипа (Омельянюк, Гвоздев, 1990). Проявление в культуре *in vitro* генов со специфическим характером экспрессии может быть связан с активацией их транскрипции под влиянием экзогенных гормонов, в том числе ауксинрегулируемая последовательность является в 5'-области гена PIDIABR (Benjamins, 2001).

Выводы. Таким образом, частота регенерации, достигнута в условиях опыта при использовании в качестве экспланта апикальной меристемы побега проростков, в определенной степени может удовлетворить потребности современной биотехнологии тритикале. Хотя регенерационный потенциал этого типа экспланта несколько ниже по сравнению с незрелыми зародышами, его доступность в любое время года позволяет за короткий промежуток времени получать значительное количество растений-регенерантов. На основе проведенных исследований можно сделать вывод, что среди проанализированных генотипов наибольшей частотой индукции каллуса и регенерации побегов характеризовалась линия 38/1296. Именно ее можно рекомендовать для дальнейших работ, связанных с биотехнологиями тритикале, в частности генетической инженерии и клеточной селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Особливості процесів морфогенезу в культурі листових експлантів озимої пшениці // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наук. праць. К.: Логос, 2007. Т.2. С. 444–448.
2. Білітюк А.П., Гірко В.С., Каленська С.М., Андрушків М.І. Тритикале в Україні. К: Арістей, 2004. 388 с.
3. Волощук С.І., Волощук Г.Д., Гірко В.С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // Захист рослин. 1998. № 8. С. 4–5.
4. Волощук С.І., Заліський О.О., Філонченко П.О., Волощук Г.Д. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаплоїдних ліній тритикале // НБТ МПП ім. В.М. Ремесла. 2012. Вип. 11. С. 320–334.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Омельянюк Н.А., Гвоздев А.В. Использование изогенных линий для изучения каллусообразования и регенерации // Использование изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах. Новосибирск. 1990. С. 96–98.
7. Ahmad A., Zhong H., Wang, W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In vitro* cellular and development biology. 2002. 38, N 2. P. 163–168.
8. Barro F., Martin A, Lazzeri P., Barcel P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum // *Euphytica*. 1999. 108, N 3. P. 161–167.
9. Benjamins R., Quint A., Weijers D. et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport // *Development*. 2001. 128. P. 4057–4067.
10. Galiba G., Kovdcz G., Sutka J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat // *Plant Breed*. 1986. 97. P. 261–263.
11. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // *Biologia Plantarum*. 2006. 50, N 3. P. 326–330.
12. Henry Y., Marcotte J., De Buyser J. Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines // *Theor. Appl. Genet*. 1994. 89. P. 344–350.
13. Immonen A.S.T. Amino acid medium for somatic embryogenesis from immature triticales (*Triticosecale Wittmack*) embryos // *Cereal Res. Comm.-Szeged.*, 1993. V.21, N 1. P.51–55.
14. Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // *J. Hered*. 1989. 80. P. 345–350.
15. Lorn H., Gobel E., Brown P. Advances in tissue culture and progress towards transformation of cereals // *Plant breed*. 1988. V. 100, N 1. P. 1–25.
16. Mendoza M., Kaeppler H. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 2002. 38, N 1. P. 39–45.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 473–479.
18. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // *Electronic J. Biotech*. 2001. 4. P. 74–102.
19. Pizetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticales // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult*. 2003. 73, N 3. P. 245–256.

20. Zhang S., Zhang H., Sticklen H. B. Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // Journal of Plant Phisiology. 1996. 148, N 6. P. 667–671.