

УДК 581.143.6:58.085

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРІ РІЗНИХ ТИПІВ ЕКСПЛАНТІВ

© 2015 р. С. В. Пикало, С. І. Волощук, Г. Д. Волощук

Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла

Національної академії аграрних наук України

(с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл., Україна)

Досліджено процеси калюсогенезу та регенерації рослин чотирьох сортів тритикале озимого (Балтико, Лідер, Ізомер та Квазар) у культурі трьох типів експлантів (апикальні меристеми пагонів, незрілі зародки та молоді суцвіття). Встановлено, що у вивчених форм поряд з генотипною залежністю частота калюсогенезу та регенерації пагонів також зумовлена типом експланта. Було виділено три типи калюсів, утворення яких не залежало від походження експланта. У процесі регенерації у досліджуваних сортів з одного калюса утворювалося від одного до шести пагонів. За допомогою дисперсійного аналізу виявлено істотний вплив ($p < 0,05$) на процеси морфогенезу тритикале усіх досліджуваних факторів. Вплив генотипу був найбільшим на етапі калюсогенезу. Найвищий вплив взаємодії генотип \times тип експланта спостерігали на етапі утворення морфогенних калюсів. Вплив типу експланта був найвищим на етапі регенерації пагонів. Оптимізований регламент отримання повноцінних рослин-регенерантів тритикале в калюсній культурі *in vitro* може бути використаний у клітинній селекції та генно-інженерних експериментах.

Ключові слова: *Triticale, генотип, експлант, калюс, морфогенез, регенерація*

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 і, зокрема, тритикале. Одержання морфогенного калюсу і наступна регенерація рослин – невід’ємна частина клітинної інженерії цієї культури (Immonen, 1993; Хомякова, 2009). Труднощі, які виникають при проходженні цих етапів, особливо характерні для культивованих *in vitro* різних експлантів злаків (Бавол та ін., 2007). Незважаючи на те, що регенерація рослин із калюсів описана для багатьох представників цієї родини (пшениці, кукурудзи, рису, сорго), удосконалення системи культивування *in vitro* експлантів залишається актуальним для злаків (Кучеренко, 1993; Сатарова, 2002; Игнатова, 2004; Белінська, 2007). При дослідженні калюсогенезу і регенерації зазвичай вибирається той тип експланта, який найбільш зручний для проведення експериментів і забезпечує

ефективне отримання достовірних результатів. Поки що питання про біотехнологічно оптимальний експлант і удосконалення способів реалізації його морфогенетичного потенціалу далеко від остаточного вирішення. Як експланти для отримання калюсу з соматичних клітин використовують незрілі та зрілі зародки або їх частини, незрілі суцвіття, сегменти колеоптиля, мезокотилія та молодих листків, апикальні меристеми пагонів (Benkirane et al., 2000; Ahmad et al., 2002; Копертех, Стрибная, 2003; Chen et al., 2006).

Як відомо, незрілі зародки є традиційним експлантом у злаків (Хамула и др., 1987). Вибір такого типу експланта зумовлений високою інтенсивністю проліферації і компетентністю всіх тканин зародка при культивуванні *in vitro* (Круглова, Катасонова, 2009). Це дозволяє виключити вплив зниження проліферативної функції клітин, характерний для спеціалізованих тканин, на результати експериментів. Але застосування даного типу експланта має певні недоліки, до яких належать досить короткий період використання в культурі та значні затрати часу для отримання донорних рослин. Для мікронального розмноження окремих унікальних рослин, таких як стерильні міжвидові гібриди

Адреса для кореспонденції: Пикало Сергій Володимирович, Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України, с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл., 08853, Україна;
e-mail: pykserg@ukr.net

злаків, зазвичай використовують соматичні тканини молодих суцвіть (Sharma at al., 1995). Останнім часом широко використовують апікальні меристеми конусів наростання пагонів. Перевагою даного типу експланта є можливість подолання генотипних особливостей форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час, а також його доступність у будь-яку пору року. Дослідники багатьох країн світу успішно працюють з апексами пагонів проростків кукурудзи, вівса, сорго, проса, пшениці, тритикале та ячменю для розробки ефективних і менш залежних від генотипу систем регенерації зернових (Zhang at al., 1996; Гончарук та ін., 2014). Культуру апікальних меристем широко використовують як джерело калусної тканини для клітинної селекції та генетичної трансформації рослин, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калусу – до 90% (Ahmad at al., 2002).

Відомо також, що ефективність регенерації з різних типів експлантів залежить від того, на якій стадії розвитку (оптимальній або неоптимальній) вони були відібрані для отримання первинних калусів (Goldstein, Kronstadt, 1986; Pizetakiewicz at al., 2003). Оскільки зазвичай орієнтиром у подібних випадках служить розмір експланта, то ефективність регенерації може варіювати від експерименту до експерименту.

Разом з тим, на морфогенетичний потенціал експланта впливає багато чинників, зокрема: генотип, стадія розвитку донорного органу, умови культивування (Tsukahara at al., 1996; Бавол та ін., 2007; Гончарук та ін., 2014). Оскільки культура тритикале як об'єкт біотехнологічних досліджень у даному напрямі вивчена недостатньо, метою нашої роботи було дослідження процесів калусогенезу та регенерації різних генотипів тритикале озимого в культурі незрілих зародків, апікальних меристем пагонів та молодих суцвіть.

МЕТОДИКА

Матеріалом досліджень були чотири генотипи тритикале озимого: сорти Балтико, Лідер, Ізомер та Квазар, які були взяті з робочої колекції Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України. Для отримання калусної тканини використовували три типи експлантів: молоді суцвіття (сегменти молодого колоса, які не досягли стадії мейозу), незрілі зародки (ізолювані на 12–15 добу після запи-

лення) і апікальні меристеми верхівки пагонів 3-денних проростків зі зрілих зернівок (через 6 місяців після повного дозрівання, нормально сформованих у природних умовах).

Для кожного генотипу було взято по 160 експлантів. Стерилізація та підготовка донорного матеріалу для кожного типу експланта мали свої особливості, які описані нижче.

Апікальні меристеми пагонів. Для отримання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1% розчином $KMnO_4$ протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували у 1% розчині $AgNO_3$ і поміщали у 96% етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було триразове промивання стерильною дистильованою водою. Отримане простерилізоване насіння прощували на світлі при $24^\circ C$ на безгормональному МС-середовищі (Murashige, Skoog, 1962). Використовували апікальну меристему пагонів 3-добових стерильних проростків. Розмір експлантів варіював у межах 1,5-2 мм.

Незрілі зародки. Незріле насіння польових рослин витримували дві доби у холодильнику за температури $+4^\circ C$, стерилізували 70% етанолом протягом 3 хв, 30% комерційним препаратом «Белизна» 5 хв, а також 0,01 н розчином HCl 3 хв, після того тричі промивали стерильною дистильованою водою. Після видалення зародка із зернівки його висаджували у чашки Петрі із живильним МС-середовищем щитком вгору.

Молоді суцвіття. Як донори використовували пагони з молодими суцвіттями, які ще не досягли стадії мейозу. Довжина самих суцвіть при цьому сягала 20-60 мм. Після того, як усі зовнішні листки були видалені, проводили поверхневу стерилізацію пагонів 30% комерційним препаратом «Белизна» протягом 1 хв, а потім 70% етанолом протягом 1 хв. Після цього з недозрілого колоса видаляли молоді колоски, які висаджували на МС-середовище для калусоутворення.

Культуру калусної тканини незалежно від типу експланта отримували на МС-середовищі, яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, $AgNO_3$ – 10 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д. Експланти культивували при $26^\circ C$ в темряві впродовж трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді ще протягом трьох тижнів. Наприкінці пасажу визначали частоту індукції калусу (у відсотках) як співвідношення числа експлантів, що утворили калус, до їх загальної кількості.

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО

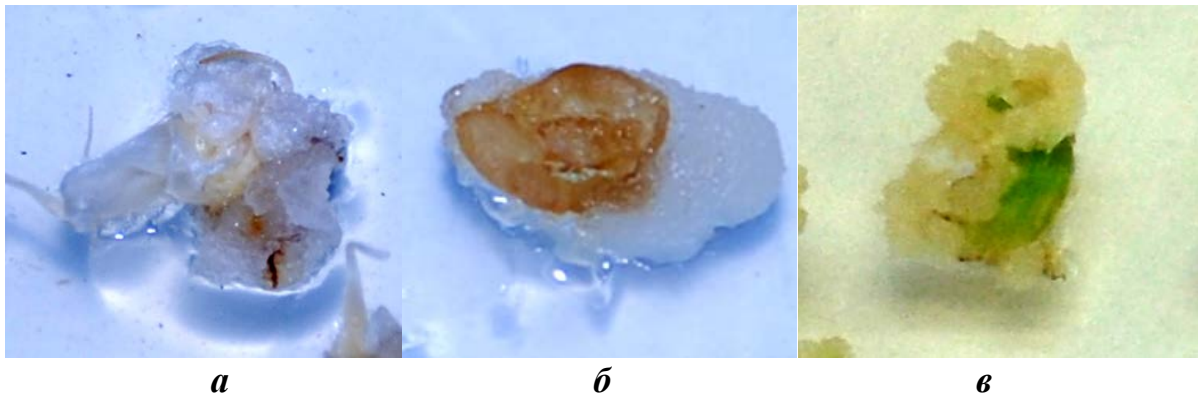


Рис. 1. Початок індукції калюсу тритикале з різних типів експлантів.
a – молоді суцвіття; *б* – незрілі зародки; *в* – апікальні меристеми пагонів.

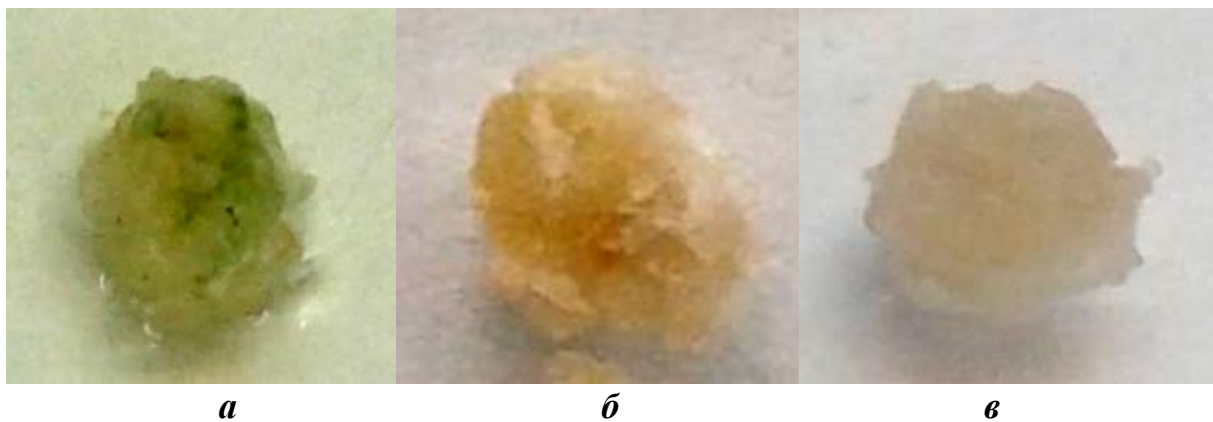


Рис. 2. Типи індукованих калюсів тритикале.
a – калюс першого типу; *б* – калюс другого типу; *в* – калюс третього типу.

Для індукції морфогенезу калюси переносили на модифіковане регенераційне МС-середовище, доповнене 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК. Отримані пагони у міру розвитку переносили на безгормональне МС-середовище з половинним вмістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували у горщики зі спеціально підібраною ґрунтовою сумішшю і поміщали у вологу камеру на 7-14 діб. Добре укорінені рослини переносили у ґрунт.

Частоту утворення морфогенного калюсу та регенерації пагонів (у відсотках) у кожному варіанті визначали як співвідношення числа морфогенних калюсів або регенерантів до початкової кількості висаджених експлантів. Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу (Лакін, 1990).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, процес отримання рослин-регенерантів у культурі *in vitro* є багатоступневим і включає етапи індукції і проліферації

калюсу, морфогенезу і регенерації рослин. Тому кожен попередній етап визначає можливість наступного. На початку культивування при переході до недиференційованого росту експланти втрачали зелене забарвлення та збільшувалися у розмірах (рис. 1).

Тривалість періоду індукції калюсоутворення залежала від типу експланта та його віку і варіювала від 3-4 до 7-9 діб з моменту початку культивування. Встановлено, що для кожного типу експланта порядок їх ранжування за швидкістю індукції калюсогенезу був таким: 1) апікальні меристеми пагонів (3-4 доби); 2) молоді суцвіття (4-6 діб); 3) незрілі зародки (7-9 діб). У молодих суцвіть найбільш активний процес утворення калюса спостерігали у експлантів довжиною 10-25 мм, у незрілих зародків – 0,8-1,5 мм, у апікальних меристем пагонів – 1,5-1,8 мм.

Протягом першого пасажу, зазвичай на 10-14-у добу після посадки незрілих зародків на живильне середовище, їх очищали від проростків, які іноді виникали при проростанні зарод-

Частота морфогенезу тритикале залежно від генотипу і типу експланта

Сорт	Тип експланта*	Частота утворення калюсів, %	Частота утворення морфогенних калюсів, %	Частота регенерації, %
Балтико	НЗ	92,4	52,2	30,0
	МС	85,7	38,4	17,3
	АМ	89,5	44,3	23,5
Лідер	НЗ	83,6	50,2	25,1
	МС	73,1	42,8	12,7
	АМ	78,3	46,6	19,8
Ізомер	НЗ	68,3	25,7	15,4
	МС	72,2	31,3	19,0
	АМ	66,4	45,4	26,3
Квазар	НЗ	71,3	38,5	10,1
	МС	60,5	49,4	8,1
	АМ	83,4	50,7	14,3
НІР ₀₅		5,1	5,8	5,5

Примітка: * – НЗ – незрілі зародки; МС – молоді суцвіття; АМ – апікальні меристеми.

ків. При появі калусної тканини у молодих суцвіть її знімали з експланта і пересаджували на нове середовище.

Серед калюсів, незалежно від їх походження, можна було виділити такі їх типи (рис. 2): першого типу – морфогенні калюси, що здатні до регенерації і містять агрегати клітин із щільних сегментів жовтувато-білого кольору з ділянками зелених хлорофіловмісних клітин; другого типу – калюси, які здатні лише до ризогенезу і складаються з агрегатів клітин з сегментами жовтувато-білого кольору без зелених зон; третього типу – калюси, які взагалі не здатні до морфогенезу. Це агрегати м'яких, водянистих клітин білого кольору, при подальшому культивуванні яких спостерігався некроз.

Було відзначено, що у процесі культивування калюс одного типу може переходити в калюс іншого типу. Даний перехід здійснювався переважно від типу калюса з високим морфогенетичним потенціалом до типу з нижчим потенціалом.

Виявлено, що всі чотири досліджувані генотипи тритикале озимого характеризувалися різною здатністю до індукції калюсу, яка варіювала від 60,5 до 92,4%, залежно від генотипу та походження експланта (таблиця).

Як показали результати досліджень, у сортів Балтико та Лідер найбільшу частоту індукції калюсу (92,4% та 83,6% відповідно) було зафіксовано у варіантах, де як експланти використовували саме незрілі зародки. У сорту Ізомер найбільша частка калюсів (72,2%) утворювалась із молодих суцвіть. А ось у сорту Квазар переважна більшість калусної тканини (83,4%)

утворювалася у варіантах, де як експланти використовувалися апікальні меристеми пагонів.

Утворення морфогенного калюсу спостерігали в усіх варіантах, однак з різною частотою, залежно від генотипу та типу експланта. Найбільша частота утворення морфогенного калюсу у сортів Балтико і Лідер була з незрілих зародків, а в сорту Ізомер та Квазар – з апікальних меристем пагонів (таблиця).

Неоднорідність калусних клітин зумовлює різні шляхи їх морфогенезу. Згідно з дослідженнями Т.Б. Батигіної (Батыгина, 1999), формування рослин проходить через соматичний ембріодогенез – процес розвитку зародкоподібної біполярної структури (ембріюїда), що утворюється асексуально з соматичних та статевих клітин. За даними інших авторів (Benkirane at al., 2000; Гончарук та ін., 2014), регенерація рослин окрім соматичного ембріодогенезу може також відбуватись шляхом геморизогенезу, тобто одночасного розвитку пагонів і коренів. У своїх дослідженнях ми спостерігали розвиток з морфогенного калюса як соматичних ембріюїдів, так і геморизогенних структур, отриманих у процесі органогенезу. В ході подальшого культивування частина з них формувала рослини-регенеранти. Однак, у деяких калюсів спостерігали лише процеси ризогенезу (утворення коренів) без подальшої регенерації. Дослідники дане явище пояснюють тим, що процес органогенезу у них не досягає рівня розвитку цілих рослин (Delporte at al., 2001).

У ході подальшого культивування усі морфогенні калюси у міру розвитку пересаджу-

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО

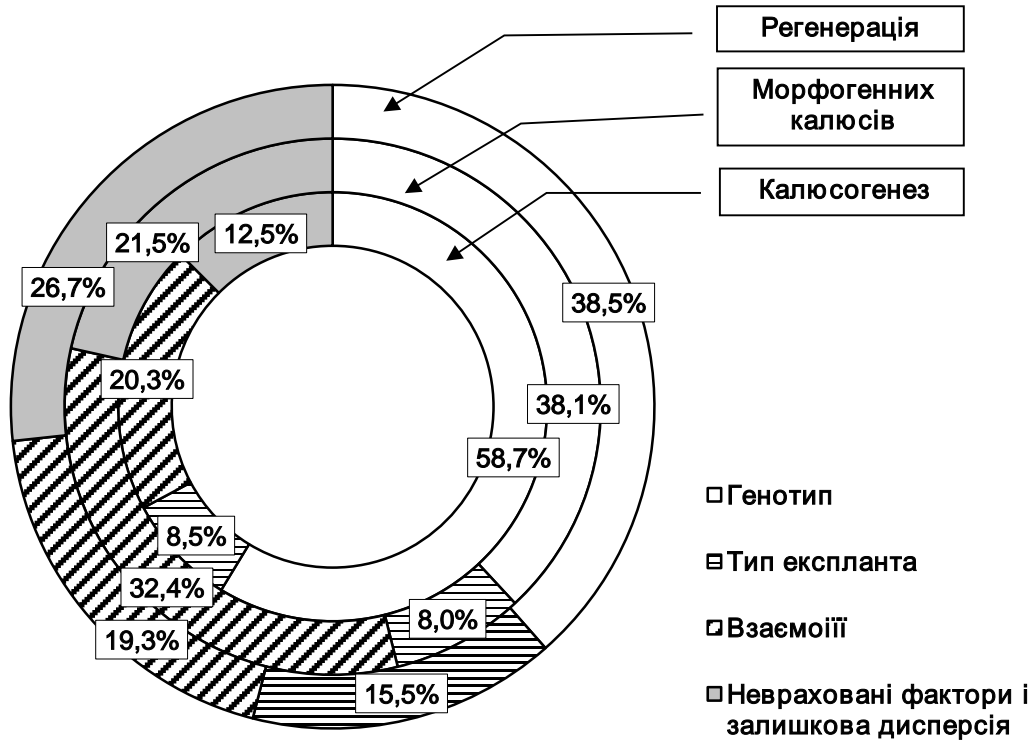


Рис. 3. Вплив факторів експерименту (генотип, тип експланта та їх взаємодія) на калюсогенез, утворення морфогенних калюсів і регенерацію (% від загального варіювання).

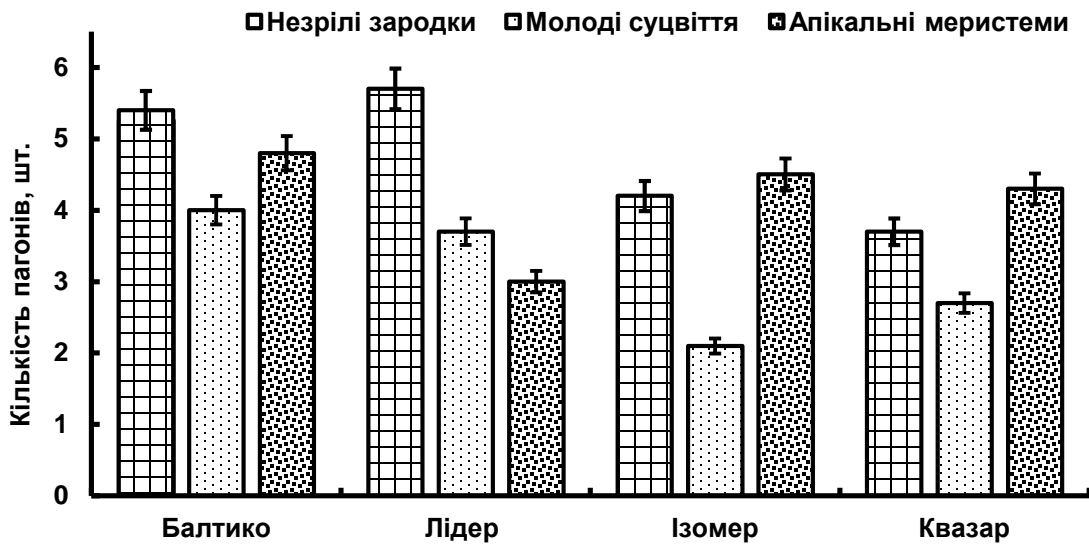


Рис. 4. Середня кількість пагонів, отриманих з одного калюса тритикале.

вали на модифіковане середовище для регенерації, відсаджуючи пагони, що утворилися, на МС-середовище без фітогормонів.

Зазначимо, що регенерацію зелених пагонів відзначали в усіх варіантах дослідження, проте вона проходила по-різному. Найбільшу частоту регенерації незалежно від типу експланта спостерігали у сорту Балтико – до 30%. Найменша ж частота була виявлена у сорту Квazar – 8,1%.

Варто відзначити, що регенерація у сортів Ізомер та Квazar найкраще відбувалась з калюсів, отриманих з апікальних меристем пагонів, тоді як у сортів Балтико та Лідер максимальну регенерацію було зафіксовано у варіантах з незрілими зародками.

За результатами дисперсійного аналізу виявлено істотний вплив ($p < 0,05$) усіх факторів, що вивчались у цьому дослідженні: генотип, тип

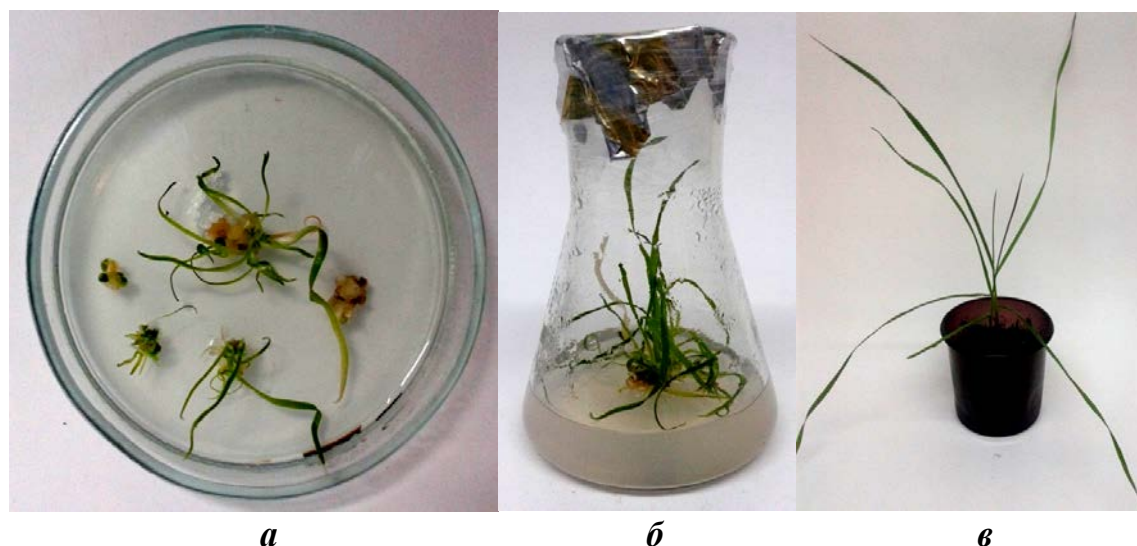


Рис. 5. Етапи отримання рослин-регенерантів тритикале озимого.

а – початок регенерації пагонів; *б* – укорінення рослин-регенерантів; *в* – переведення рослин в умови *in vivo*.

експланта і взаємодії, причому вплив генотипу був найбільшим на етапі калюсогенезу – 58,7% (рис. 3). Найвищий вплив взаємодії генотип × тип експланта спостерігали на етапі утворення морфогенних калюсів (32,4%). Вплив типу експланта був найвищим на етапі регенерації (15,5%). Найвищі значення залишкової дисперсії, яка включає похибку і невраховані фактори, також спостерігали на етапі регенерації (26,6%).

Одним із показників, що визначає ефективність регенерації, є кількість отриманих пагонів з одного калюса. Нами було виявлено, що загалом з одного калюса утворювалося від одного до шести пагонів (рис. 4).

Як видно з рис. 4, цей показник залежав не тільки від генотипу, а й типу експланта. Якщо у сортів Балтико і Лідер найбільшу кількість утворених пагонів з одного калюса спостерігали у варіантах з незрілими зародками, то у сортів Ізомер та Квазар даний показник був максимальний у варіантах з апікальними меристемами.

Розвиток отриманих рослин-регенерантів у подальшому відбувався подібно до інтактних рослин тритикале в умовах *in vivo*. Відзначалися типові фенофази сходів, третього листка, кущіння. Рослини-регенеранти у фенофазі кущіння переносили в умови *ex vitro* у пластикові стаканчики з ґрунтовою сумішшю (рис. 5).

Таким чином, різна частота калюсоутворення, що спостерігалась у наших дослідках із різними генотипами озимого тритикале в культурі незрілих зародків, молодих суцвіть та апі-

кальних меристем пагонів, і значні відмінності між генотипами за частотою регенерації рослин підтверджують існування різних генетичних систем регуляції цих процесів. Комасуда і співавт. (Komatsuda at al., 1989) одними із перших припустили, що здатність до індукції калюсу та регенерації детермінується незалежними генетичними системами. Вірогідність даного припущення була доведена методом діалельного аналізу у дослідках з незрілими зародками ячменю. В інших працях також було доведено вплив генотипу на регенераційну здатність культивованих тканин пшениці (Henry at al., 1994).

Завдяки новітнім технологіям класичні генетичні підходи дають можливість ідентифікувати гени, які відповідають за розбіжності у прояві тотипотентності *in vitro*, та визначати їх місце на генетичних картах. Використання ліній пшениці з різними перебудовами хромосом дозволило провести генетичний аналіз їх здатності до калюсогенезу й регенерації в культурі пиляків і незрілих ембріонів, а також визначити локуси генів, що контролюють дані ознаки в певних хромосомах (Galiba at al., 1986; Felsenburg at al., 1987; Henry at al., 1994). У дослідженнях, виконаних на ізогенних лініях пшениці, що розрізняються за алелями гена *Rht*, відповідального за чутливість рослин до гібереліну, показано, що алельні відмінності впливають на ріст і морфогенез калюсних культур, хоча цей ефект залежав від генотипу (Mathias, Atkinson, 1988; Омельянчук, Гвоздев, 1990). Прояв у культурі *in vitro* генів зі специфічним характером експресії може бути пов'язаний з активацією їх транскрипції під впливом екзо-

генних гормонів (регульовані гормонами *цис*-елементи присутні в регуляторних ділянках багатьох генів морфогенезу), у тому числі ауксинрегульована послідовність ϵ в 5'-ділянці гена *PIDIABR* (Benjamins et al., 2001).

Тестування сортів озимого тритикале показало, що клітинні культури *in vitro* незалежно від типу експланта є гетерогенними системами з певними морфологічними взаємодіями, які зумовлюють специфіку розвитку окремих органів. Максимально досягнута у досліджених сортів частота регенерації з різних типів експлантів не перевищувала відповідних величин, показаних для інших генотипів озимого тритикале (Immonen, 1993; Пыкало и др., 2014), тим не менше, вона достатня для розробки сучасних біотехнологій даної культури. Встановлено, що поряд із генотипною залежністю частота регенерації пагонів також зумовлена типом експланта. Хоча апікальні меристеми пагонів загалом виявляють дещо нижчу частоту регенерації порівняно із незрілими зародками, їх доступність дозволяє використовувати цей тип експланта як надійне джерело рослин-регенерантів протягом року. Оптимізований регламент отримання повноцінних рослин-регенерантів тритикале в калюсній культурі *in vitro* може бути використаний в клітинній селекції та генно-інженерних експериментах.

ЛІТЕРАТУРА

- Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5, № 1-2. – С. 3-10.
- Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 888–898.
- Белінська О.В. Створення ознакової колекції ячменю за здатністю до андрогенезу *in vitro* та її використання у генетичних і біотехнологічних дослідженнях // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5, № 1-2. – С. 11-20.
- 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.
- Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Одесса, 2004. – 48 с.
- Копертх Л.Г., Стрибная Л.А. Регенерация растений из листовых эксплантов пшеницы // Физиология растений. – 2003. – Т. 50, № 3. – С. 410-414.
- Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный экплант // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 2. – Р. 124-131.
- Кучеренко Л.А. Морфологическая разнокачественность каллюсных тканей риса и ее связь с регенерационной способностью // Физиология растений. – 1993. – Т. 40, № 5. – С. 797-801.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высш. шк., 1990. – 352 с.
- Омельяничук 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.
- Пыкало С.В., Зинченко М.А., Волощук С.И., Дубровная О.В. Морфогенез тритикале озимого в культуре апикальных меристем побегов // Сб. матер. I Междунар. научн.-практ. конф. «Биотехнология: достижения и перспективы развития», Пинск, 25-26 сентября 2014 г. – Пинск, 2014. – С. 29-34.
- Сатарова Т.Н. Прямая регенерация растений в культуре пыльников кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2002. – Т. 34, № 2. – С. 152-177.
- Хамула П.В., Солодовниченко В.Д., Базько Л.В. Влияние генотипа и размера зародыша мягкой пшеницы на частоту каллусообразования // Селекционно-генетические аспекты повышения продуктивности зерновых культур. – Мироновка, 1987. – С. 45-48.
- Хомякова О.В. Создание исходного материала для селекции тритикале на основе клеточных биотехнологий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2009. – 20 с.
- Ahmad A., Zhang H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cell. Devel. Biol.* – 2002. – V. 38, № 2. – P. 163-167.
- Benjamins R., Quint A., Weijers D. et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport // *Development*. – 2001. – V. 128. – P. 4057-4067.
- 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 Cult.* – 2000. – V. 61. – P. 107-113.
- Chen J., Yue R., Xu H., Chen X. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture // *Agric. Sci. China*. – 2006. – V. 5, № 8. – P. 572-578.
- Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J. Plant regeneration through callus initiation from thin mature em-

- bryo fragments of wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2001. – V. 67. – P. 73-80.
- Felsenburg T., Feldman M., Galun E. Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 1987. – V. 74. – P. 802-810.
- Galiba G., Kovacs G., Sutka J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat // *Plant Breed.* – 1986. – V. 97. – P. 261-263.
- Goldstein C.S., Kronstadt W.E. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley *Hordeum vulgare* L. // *Theor. Appl. Genet.* – 1986. – V. 71. – P. 631-636.
- 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. – V. 89. – P. 344-350.
- Immonen A.S.T. Amino acid medium for somatic embryogenesis from immature triticale (*Triticosecale* Wittmack) embryos // *Cereal Res. Commun.* – 1993. – V. 21, № 1. – P. 51-55.
- Komatsuda T., Enomoto S., Nekajima K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley // *J. Hered.* – 1989. – V. 80. – P. 345-350.
- Mathias R.J., Atkinson E. *In vitro* expression of genes affecting whole plant phenotype – The effect of *Rht/Gai* alleles on the callus culture response of wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) // *Theor. Appl. Genet.* – 1988. – V. 75. – P. 474-479.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-479.
- Pizetakiwicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* – 2003. – V. 73, № 3. – P. 245-256.
- Sharma V.K., Rao A, Varshney A., Kothari S.L. Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Desf. // *Plant Cell Rep.* – 1995. – V. 15. – P. 227-231.
- Tsukahora M., Hirosawa T., Murajama H. Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa* L.) plantlets // *Plant Cell Rep.* – 1996. – V. 15. – P. 597-600.
- Zhang S., Zhang H., Sticklen H.B. Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol.* – 1996. – V. 148, № 6. – P. 667-671.

Надійшла до редакції
13.11.2014 р.

PLANT REGENERATION OF WINTER TRITICALE IN CULTURE OF VARIOUS TYPES OF EXPLANTS

S. V. Pykalo, S. I. Voloshchuk, H. D. Voloshchuk

*V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat
National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
(v. Tsentralne, Myronivka district, Kyiv region, Ukraine)
e-mail: pykserg@ukr.net*

The processes of callus formation and plant regeneration for 4 winter triticale varieties (Baltico, Lider, Isomer and Kvazar) in culture of 3 types of explants (shoot apical meristems, immature embryos and immature inflorescences) were investigated. It was ascertained that for the forms studied frequency of calli formation and shoot regeneration along with phenotypical dependence was also conditioned by explant type. The 3 types of callus formation of which was independent on the origin of explant were identified. During regeneration from 1 to 6 shoots were formed per one callus for the varieties tested. Analysis of variance showed a significant effect ($p < 0.05$) for all factors of this experiment: genotype, explant type and their interaction on the triticale morphogenesis. Effect of genotype was the highest on the stage of calli formation. The highest effect of interactions genotype \times explant type was observed at the stage of formation of morphogenic callus. Effect of explant type was the highest at the stage of shoot regeneration. Optimized procedure of vigorous plant regenerant production of triticale in *in vitro* callus cultures can be used in cell selection and genetic engineering experiments.

Key words: *Triticale, genotype, explant, callus, morphogenesis, regeneration*

РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО

РЕГЕНЕРАЦІЯ РАСТЕНИЙ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО В КУЛЬТУРЕ РАЗНЫХ ТИПОВ ЭКСПЛАНТОВ

С. В. Пыкало, С. И. Волощук, А. Д. Волощук

*Мироновский институт пшеницы им. В.Н. Ремесло
Национальной академии аграрных наук Украины
(с. Центральное, Мироновский р-н, Киевская обл., Украина)
e-mail: pykserg@ukr.net*

Исследованы процессы каллусогенеза и регенерации растений четырех сортов тритикале озимого (Балтико, Лидер, Изомер и Квазар) в культуре трех типов эксплантов (апикальные меристемы побегов, незрелые зародыши и молодые соцветия). Установлено, что у изученных форм наряду с генотипической зависимостью частота каллусогенеза и регенерации побегов также обусловлена типом экспланта. Были выделены три типа каллусов, образование которых не зависело от происхождения эксплантов. При регенерации у исследуемых сортов из одного каллуса образовывалось от 1 до 6 побегов. Дисперсионный анализ обнаружил существенное влияние ($p < 0,05$) на процессы морфогенеза тритикале всех факторов, изученных в этом опыте: генотип, тип экспланта и их взаимодействие. Влияние генотипа было максимальным на этапе каллусогенеза. Самое высокое влияние взаимодействия генотип \times тип экспланта наблюдали на этапе образования морфогенного каллуса. Влияние типа экспланта было наиболее выраженным на этапе регенерации побегов. Оптимизированный регламент получения полноценных растений-регенерантов тритикале в каллусной культуре *in vitro* может быть использован в клеточной селекции и генно-инженерных экспериментах.

Ключевые слова: *Triticale, генотип, эксплант, каллус, морфогенез, регенерация*