

ПИКАЛО С.В.^{1✉}, ДУБРОВНА О.В.²

¹ Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України, Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне, вул. Центральна, 68, e-mail: rykserg@ukr.net

² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net
✉ rykserg@ukr.net, (097) 659-12-65

РІВЕНЬ ПЛОЇДНОСТІ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ТРИТИКАЛЕ, ОТРИМАНИХ ШЛЯХОМ СЕЛЕКЦІЇ *IN VITRO* НА СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСІВ

Мета. Проаналізувати рівень плоїдності рослин-регенерантів тритикале озимого, отриманих шляхом селекції *in vitro* на стійкість до осмотичного та сольового стресів. **Методи.** Методами цитологічного аналізу та проточної цитометрії визначено рівень плоїдності рослин-регенерантів тритикале озимого, отриманих методом клітинної селекції на стійкість до абіотичних стресів. **Результати.** Показана соматональна мінливість стійких до осмотичного та сольового стресів рослин-регенерантів тритикале озимого за рівнем плоїдності. Виявлена цитологічна нестабільність регенерантів, яка виявляється наявністю анеуплоїдних рослин. Рослини з анеуплоїдним набором хромосом (38–41) характеризувалися зниженою життєздатністю та аномальним розвитком генеративних органів, тому внаслідок цього у них не було сформовано повноцінного колосу, а також не отримано насіння. **Висновки.** Серед отриманих регенерантів переважно більшість склали еуплоїди, що свідчить про селективну перевагу гексаплоїдних клітин до морфогенезу.

Ключові слова: *Triticale*, рослини-регенеранти, цитологічний аналіз, анеуплоїди, абіотичні стреси.

Однією з перспективних культур для сільськогосподарського виробництва є міжвидовий амфідиплоїдний гібрид пшениці і жита – тритикале (*×Triticosecale* Wittm. & A. Camus), який поєднує цінні господарські та біологічні характеристики, притаманні вихідним видам [1]. Водночас наявні сорти і селекційні форми тритикале недостатньо пластичні через обмежене генетичне різноманіття вихідного матеріалу [2]. Важливе значення для селекційного вдосконалення тритикале має його стійкість до абіотичних стресових чинників довкілля, зокрема до посухи та засолення ґрунтів [3, 4], що дозволяє

розширити його посіви в районах із несприятливими кліматичними умовами. Посуха призводить до виникнення водного дефіциту в ґрунті і відповідно в рослинах, викликаючи у них осмотичний стрес [5]. Шкідлива дія засолення має комплексний характер і зумовлена як порушенням осмотичного балансу клітини, так і прямим токсичним впливом на фізіологічні та біохімічні процеси в клітині [6]. Часто рослини піддаються дії одночасно кількох стресорів, при цьому їх негативний вплив значно посилюється [5, 6].

На сьогодні в дослідженні стійкості рослин до різних стресових чинників перспективним є застосування культури клітин *in vitro*, оскільки це дає змогу вивчати дію селективних чинників на клітину в суворо контрольованих умовах культивування, виключати складні корелятивні взаємовідношення між різними органами і тканинами і, як наслідок, полегшувати дослідження самого процесу дії стресового чинника на клітинний метаболізм. Встановлено, що абіотичні стресори індукують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляється на різних рівнях досліджень [7, 8]. Відомо також, що цитогенетичні зміни клітин калюсів зумовлюють мінливість індукованих із них рослин-регенерантів. На цитологічному рівні показано, що концентрації хлористого натрію (0,2 та 0,4 %), які інгібують ріст, викликають дестабілізацію генетично стабільної диплоїдної тканини *Crepis capillaries* [9], яка проявлялася у появі значного числа анеуплоїдних та поліплоїдних клітин. У ряді праць показано, що в умовах дії осмотичних речовин відбувається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [7, 10, 11]. Значний цитотоксичний ефект маніту встановлено при процесі дослідження калюсних культур *Triticum aestivum* L. [11], коли було ви-

явлено хромосомні аберації та аномалії мітозу, пов'язані з порушеннями веретена поділу. Авторами підтверджено, що більшість рослин-регенерантів, індукованих із стійких калюсних ліній, є гексаплоїдними, однак було виявлено і анеуплоїдні форми.

Варто зазначити, що особливості цитогенетичної мінливості клітинних культур та рослин-регенерантів тритикале за дії абіотичних стресорів практично не досліджені, тому їх вивчення сприятиме встановленню специфічних генетичних механізмів, які зумовлюють мінливість у процесі клітинної селекції, та отриманню стрес-стійких форм.

У зв'язку з цим метою нашої роботи було проаналізувати рівень плідності рослин-регенерантів тритикале озимого, отриманих шляхом селекції *in vitro* на стійкість до осмотичного та сольового стресів.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були рослини-регенеранти озимого гексаплоїдного тритикале лінії 38/1296, отримані шляхом прямої та ступінчастої селекції *in vitro* на стійкість до осмотичного [12] та сольового [13] стресів.

Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів проводили в клітинах кореневої меристеми за стандартною методикою давлених препаратів. Матеріал фіксували в суміші етанол (льодяна оцтова кислота (3:1) протягом доби в холодильнику за температури 4°C) і переносили у 70%-й етанол. Від фіксатора зразки відмивали кілька разів у дистильованій воді, переносили для мацерації у 5N розчин HCl кімнатної температури на 30 хв., після чого відмивали у дистильованій воді і фарбували 2%-м лактопропіоновим орсеїном протягом доби за кімнатної температури. Готували тимчасові давлені препарати в 45%-му розчині оцтової кислоти. У кожній рослині аналізували по 10–15 метафаз.

Для вивчення рівня плідності регенерантів використовували також метод проточної цитометрії. Дослідження проводили на автоматичному аналізаторі «Partec» (Німеччина), який дозволяє визначити вміст ядерної ДНК і плідність декількох сотень тисяч ядер за 2–3 хвилини. Визначення вмісту ядерної ДНК проводилося способом Ig 2, за якого клітинам різного рівня плідності відповідає свій пік на гістограмі. Експериментально отримані дані обробляли методами статистичного аналізу [14].

Результати та обговорення

Раніше нами вже був досліджений цитологічний ефект дії сублетальних концентрацій маніту (0,6М) та хлориду натрію (1,2 %) на клітини калюсів тритикале протягом 6 пасажів культивування *in vitro* [15, 16]. Слід зазначити, що калюси, культивовані на живильних середовищах без селективного чинника, характеризуються стабільно-гетерогенною структурою клітинної популяції, де близько 70–88 % складають гексаплоїдні клітини за наявності певного пулу анеуплоїдних клітин (5–9 %), диплоїдних (2–6 %), триплоїдних (2–4 %), тетраплоїдних (3–7 %) та незначної кількості (до 3 %) поліплоїдних клітин. Калюсні культури, які вирощувалися на селективних середовищах як із 0,6 М маніту, так і 1,2 % NaCl, також характеризувалися гетерогенною структурою клітинних популяцій. За культивування калюсів на селективних середовищах протягом 6 пасажів у клітинних популяціях за рахунок зменшення числа гексаплоїдних клітин було помічено достовірне збільшення кількості анеуплоїдних клітин, що більш ніж у 2 рази перевищувало цей показник у контролі. Також було виявлено достовірне підвищення числа диплоїдних та тетраплоїдних клітин. Крім того, встановлено, що сублетальні концентрації стресових чинників спричиняють кластогенний ефект та викликають турбагенні порушення в клітинах калюсів. Таким чином, цитогенетичний аналіз показав високий ступінь гетерогенності та значні відмінності за цитологічними показниками між калюсними культурами, культивованими на селективних і контрольному середовищах. За культивування калюсів на селективних середовищах як з манітом, так і хлоридом натрію спостерігалось достовірне підвищення частоти сегрегації геномів, що проявлялося збільшенням популяцій клітин із зменшеним відносно модального числом хромосом. Частота сегрегації зростала із збільшенням тривалості культивування.

Розроблена нами система культивування дозволила вже у першому пасажі після перенесення стійких форм на регенераційне середовище отримати регенеранти (рис. 1).

Відомо, що рівень плідності рослин-регенерантів відображає ступінь гетерогенності клітинних популяцій калюсних культур [17–19]. Під час цитологічного аналізу отриманих регенерантів були виявлені рослини різного рівня плідності (табл.).

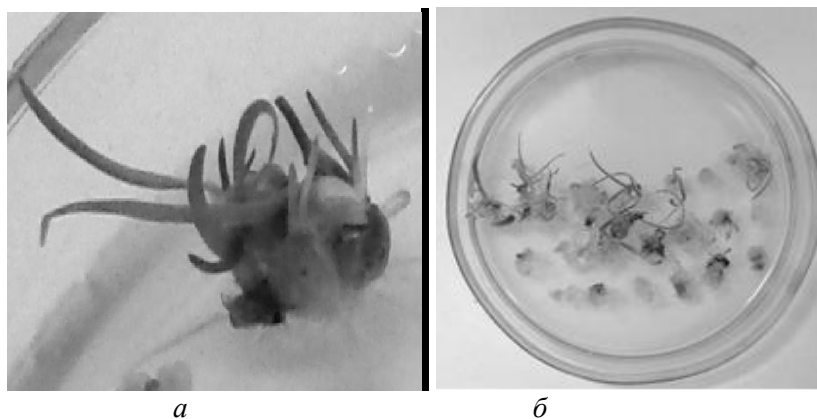


Рис. 1. Регенерація із стійких до абіотичних стресових чинників калюсних культур тритикале: а – стійких до 0,6 М маніту; б – стійких до 1,2 % хлориду натрію.

Таблиця. Плідність рослин-регенерантів R_0 тритикале, отриманих шляхом селекції *in vitro* на стійкість до водного дефіциту та засолення

Клітинна лінія	Кількість вивчених регенерантів, шт.	Гексаплоїди, шт.	Анеуплоїди, шт.
<i>Регенеранти, отримані із осмостійких клітинних ліній</i>			
1Л/ос	5	5	–
2Л/ос	8	7	1
3Л/ос	11	9	2
4Л/ос	6	5	1
5Л/ос	13	11	2
<i>Регенеранти, отримані із солестійких клітинних ліній</i>			
1Л/сл	6	5	1
2Л/сл	9	8	1
3Л/сл	5	5	–
4Л/сл	14	11	3
5Л/сл	11	9	2

Оскільки через відсутність клітин, що діляться, у багатьох випадках визначення рівня плідності клітин взагалі неможливе, то не тільки підрахунок числа хромосом, але й пошук якісних метафазних пластинок займає багато часу. Крім того, наявність анеуплоїдних клітин може бути викликана артефактами приготування цитологічних препаратів. У зв'язку з цим нами для підтвердження даних цитологічного аналізу був використаний метод проточної цитометрії, який також виявив наявність рослин різного рівня плідності (рис. 2).

Було підтверджено, що більшість рослин-регенерантів, індукованих із стійких калюсних ліній, є гексаплоїдними, однак виявлено й анеуплоїдні форми. Серед 43 вивчених рослин, отриманих із осмостійких клітинних ліній, 37 виявилися гексаплоїдами, а 6 – анеуплоїдами. Серед 45 вивчених рослин, отриманих із солес-

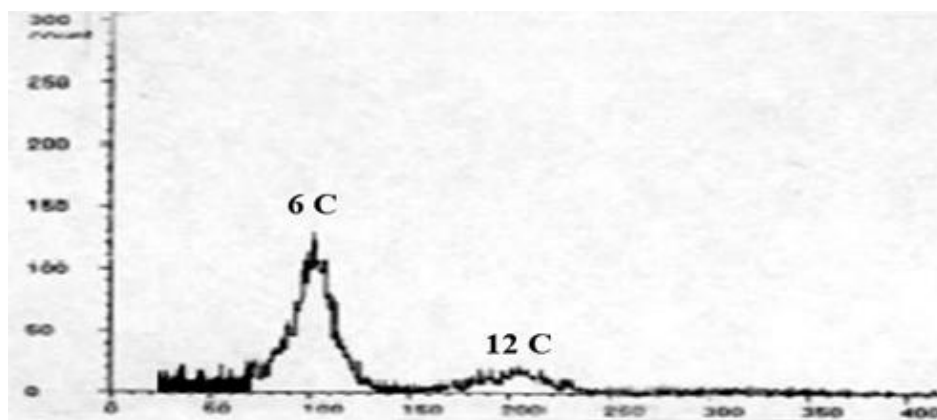
стійких клітинних ліній, 38 виявилися гексаплоїдами, а 7 – анеуплоїдами. При цьому анеуплоїдні форми мали число хромосом 38–41.

Під час подальшого культивування та укорінення регенерантів із гексаплоїдним набором хромосом фенотипових відмінностей від вихідного морфотипу не було виявлено. Рослини з анеуплоїдним набором хромосом характеризувалися зниженою життєздатністю та аномальним розвитком генеративних органів. Тому внаслідок цього у них не було сформовано повноцінного колосу, а також не отримано насіння (рис. 3).

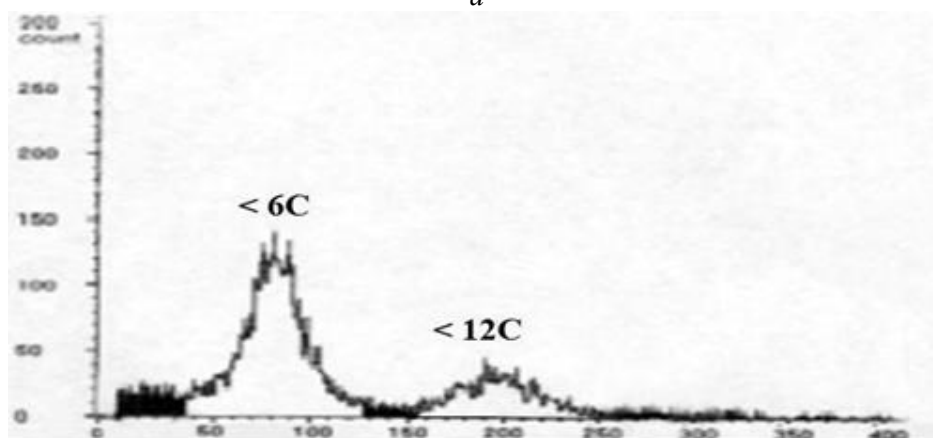
Таким чином, у наших дослідженнях з отриманих рослин-регенерантів переважну більшість склали еуплоїди, що свідчить про селективну перевагу гексаплоїдних клітин до морфогенезу. Слід зазначити, що рослини різного рівня плідності були також отримані за ре-

генерації зі стійких до комплексу стресових чинників (у тому числі до осмотичного стресу) калюсних культур пшениці [11]. Відомо, що культура тритикале, як штучно синтезований амфідиплоїд, сама по собі характеризується певною цитогенетичною нестабільністю.

Специфічні умови культивування тканин *in vitro* спричиняють підвищення частоти появи клітин із каріологічними змінами, що призводить до утворення регенерантів із різними генетичними порушеннями, в тому числі значним варіюванням числа хромосом у клітинах.



а



б

Рис. 2. Гістограми розподілу інтерфазних ядер за вмістом ДНК гексаплоїдної (а) та анеуплоїдної (б) рослини-регенеранта тритикале.



Рис. 3. Аномалії формування генеративних органів в індукованих рослин-регенерантів тритикале з анеуплоїдним числом хромосом.

Висновки

Таким чином, нами показана цитологічна нестабільність регенерантів тритикале, отриманих із стійких до осмотичного та сольового стресу калюсних культур, що проявлялася в гетерогенності рослин за рівнем плідності, зокрема появою анеуплідних рослин. Цитологічний аналіз засвідчив, що серед отриманих у результаті селекції *in vitro* рослин-регенерантів

переважну більшість складала еуплоїди, що свідчить про селективну перевагу гексаплоїдних клітин до морфогенезу. Рослини з анеуплідним набором хромосом (38–41) характеризувалися зниженою життєздатністю та аномальним розвитком генеративних органів, внаслідок чого у них не було сформовано повноцінного колосу, а також не отримано насіння.

Література

- Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *J. Agric. Sci.* 2005. Vol. 143, № 5. P. 329–346. doi: 10.1017/S0021859605005290
- Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В., Починок В.М. Агронічний потенціал і перспективи тритикале. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47, № 2. С. 95–111.
- Blum A. The abiotic stress response and adaptation of triticale – a review. *Cereal Res Commun.* 2014. Vol. 42, № 3. P. 359–375. doi: 10.1556/CRC.42.2014.3.1.
- Авдеев Ю.И., Слашева Л.А. Устойчивость озимой тритикале к экстремальным абиотическим факторам среды в аридной зоне возделывания. *Астр. Вест. Экол. Обр.* 2014. Т. 29, № 3. С. 84–87.
- Krasensky J., Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exper. Bot.* 2012. Vol. 63, № 4. P. 1593–1608. doi: 10.1093/jxb/err460.
- Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2005. Vol. 24, № 1. P. 23–58. doi: 10.1080/07352680590910410.
- Errabii T., Gandonou C. B., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Senhaji N.S. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum sp.*) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2007. Vol. 29, № 2. P. 95–102. doi: 10.1007/s11738-006-0006-1.
- Кунах В.А. Механізми та деякі закономірності соматоклональної мінливості рослин. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2003. Т. 1, № 1. С. 101–106.
- Кулиева Ф.Б., Шамина З.Б., Строгонов Б.П. Действие высоких концентраций хлористого натрия на размножение клеток *Crepis capillaries in vitro*. *Физиология растений*. 1975. Т. 22, № 1. С. 131–135.
- Xiong L., Zhu J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 2002. Vol. 25, № 2. P. 131–139. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00782.x.
- Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Цитологічний ефект дії маніту на калюсні культури м'якої пшениці, стійкі до метаболітів *G. graminis var. tritici*. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2012. Т. 44, № 6. С. 508–515.
- Пикало С.В., Зінченко М.О., Волощук С.І., Дубровна О.В. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту. *Biotechnol. Acta*. 2015. Т. 8, № 2. С. 69–77. doi: 10.15407/biotech8.02.069.
- Пикало С.В., Дубровна О.В., Демидов О.А. Клітинна селекція тритикале озимого на стійкість до сольового стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 247–251.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
- Пикало С.В., Бавол А.В., Дубровна О.В. Цитогенетичні особливості калюсних культур тритикале озимого за дії осмотичного стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 17. С. 230–235.
- Pykalo S.V., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Cytogenetic effect of sodium chloride on callus cultures of winter triticale. *Biotechnology for agriculture and environmental protection: proceedings are published materials of the XIIth International Scientific and Practical Conference daRostim 2016*. (Odessa, 07–10th September 2016). Odessa: I.I. Mechnikov Odessa National University, 2016. P. 201–202.
- Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К.: Логос, 2005. 730 с.
- Vij S., Tyagi A. K. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 5, № 3. P. 361–380. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x.
- Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический анализ клеточной линии сои, устойчивой к окислению вольфрама. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2010. Т. 42, № 2. С. 125–131.

References

- Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *J. Agric. Sci.* 2005. Vol. 143, № 5. P. 329–346. doi: 10.1017/S0021859605005290.
- Rybalka O.I., Morgun V.V., Morgun B.V., Pochynok V.M.. Agronomic potential and perspectives of triticale. *Fiziologiya Rasteniy I Genetika*. 2015. Vol. 47, № 2. p. 95–111.
- Blum A. The abiotic stress response and adaptation of triticale – a review. *Cereal Res Commun.* 2014. Vol. 42, № 3. P. 359–375. doi: 10.1556/CRC.42.2014.3.1.
- Avdeyev Y.I., Slasheva L.A. Resistance winter triticale to extreme abiotic factors of environment in aired territory of cultivation. *Astrakhanskiy Vestnik Ekologicheskogo Obrazovaniya*. 2014. Vol. 29, № 3. P. 84–87.

5. Krasensky J., Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J. Exper. Bot.* 2012. Vol. 63, № 4. P. 1593–1608. doi: 10.1093/jxb/err460.
6. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2005. Vol. 24, № 1. P. 23–58. doi: 10.1080/07352680590910410.
7. Errabii T., Gandonou C. B., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Senhaji N.S. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2007. Vol. 29, № 2. P. 95–102. doi: 10.1007/s11738-006-0006-1.
8. Kunakh V.A. Mechanisms and some regularities of the somaclonal variability of plants. *Visnyk Ukr. tov-va henetykiv i selektsioneriv.* 2003. Vol. 1, № 1. p. 101–106.
9. Kulieva F.B., Shamina Z.B., Strogonov B.P. Effects of high concentrations of sodium chloride on the reproduction of *Crepis capillaries in vitro*. *Fiziologiya Rasteniy.* 1975. Vol. 22, № 1. p. 131–135.
10. Xiong L., Zhu J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 2002. Vol. 25, № 2. P. 131–139. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00782.x.
11. Zinchenko M.O., Dubrovna O.V., Bavol A.V. Mannitol cytogenetic effects on callus lines bread wheat resistant and unresistant to *G. graminis* var. *tritici*. *Fiziologiya I Biokhimiya Kul'turnykh Rasteniy.* 2012. Vol. 44, № 6. P. 508–515.
12. Pykalo S.V., Zinchenko M.O., Voloshchuk S.I., Dubrovna O.V. *In vitro* selection of winter triticale for resistance to water deficit. *Biotechnol. Acta.* 2015. Vol. 8, № 2. p. 69–77. doi: 10.15407/biotech8.02.069.
13. Pykalo S.V., Dubrovna O.V., Demydov O.A. *In vitro* selection of winter triticale for salt resistance. *Fakty eksperymentalnoi evoliutsii orhanizmv.* 2017. Vol. 20. P. 247–251.
14. Lakin G.F. Biometrics. (4th ed., rev.). Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
15. Pykalo S.V., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Cytogenetic features of callus cultures of winter triticale under osmotic stress action. *Fakty eksperymentalnoi evoliutsii orhanizmv.* 2015. Vol. 17. P. 230–235.
16. Pykalo S.V., Bavol A.V., Dubrovna O.V. Cytogenetic effect of sodium chloride on callus cultures of winter triticale. *Biotechnology for agriculture and environmental protection: proceedings are published materials of the XIIth International Scientific and Practical Conference daRostim 2016.* (Odessa, 07–10th September 2016). Odessa: I.I. Mechnikov Odessa National University, 2016. P. 201–202.
17. Kunakh V.A. Biotechnology of Medicinal Plants. Genetic and Physiologically-Biochemical basis. Kyiv: Logos, 2005. 730 p.
18. Vij S., Tyagi A. K. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnology Journal.* 2007. Vol. 5, № 3. P. 361–380. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00239.x.
19. Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Tishchenko E.N. Cytogenetical analysis of soybean tungsten-resistant cell line. *Fiziologiya I Biokhimiya Kul'turnykh Rasteniy.* 2010. Vol. 42, № 2. P. 125–131.

PYKALO S.V.¹, DUBROVNA O.V.²

¹ The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine, Ukraine, 08853, Kyiv region, Tsentralne v., Tsentralna str., 68, e-mail: pykserg@ukr.net

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

THE PLOIDY LEVEL OF TRITICALE PLANT REGENERANTS, OBTAINED BY *IN VITRO* SELECTION FOR RESISTANCE TO ABIOTIC STRESSES

Aim. To analyze the ploidy level of plant regenerants of winter triticale, obtained by *in vitro* selection for resistance to osmotic and salt stresses. **Methods.** By cytological analysis and flow cytometry methods there was determined the ploidy level in the plant regenerants of winter triticale obtained by *in vitro* selection for resistance to abiotic stresses. **Results.** The somaclonal variability of plant regenerants of winter triticale resistant to osmotic and salt stresses by ploidy level was observed. The cytological instability of resistant's regenerants was revealed that was due in appearance of aneuploidy plants. Plants with aneuploid chromosome set (38–41) were characterized by reduced viability and abnormal generative organs resulting they are not formed normal ears and not received seeds. **Conclusions.** Among the obtained regenerants euploids were in most cases indicating a selective advantage of hexaploid cells in ability to morphogenesis. **Keywords:** *Triticale*, plant regenerants, cytological analysis, aneuploids, abiotic stresses.