

КИРІЄНКО А. В.^{1,2✉}, ПАРІЙ М. Ф.², СИМОНЕНКО Ю. В.^{1,2}, КУЧУК М. В.¹, ЩЕРБАК Н. Л.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148 б, e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

² Всеукраїнський науковий інститут селекції,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 30

✉ anastasija.kirienko@gmail.com, (063) 349-25-86

ВИКОРИСТАННЯ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ МОЛОДИХ ПРОРОСТКІВ ДЛЯ ІНДУКЦІЇ КАЛЮСОГЕНЕЗУ *TRITICUM SPELTA* L. ТА *TRITICUM AESTIVUM* L.

Мета. Розробка ефективної системи калюсогенезу із експлантів апікальних меристем для гексаплоїдної пшениці, зокрема спельти (*Triticum spelta* L.). **Методи.** Рослинним матеріалом для роботи обрано генотип спельти «Європа» та пшениці м'якої «Бунчук». У якості експлантів використовували апікальні меристеми 3-денних проростків пшениці. Для індукції калюсогенезу використано 4 типи живильних середовищ, що містили різні концентрації 2,4-Д, піклорама, НОК, нітрату срібла. Для утворення калюсів експланти культивували на відповідному живильному середовищі у темряві протягом 21 доби за + 25°C. **Результати.** Утворені калюси були майже прозорими, переважно рихлими та не перевищували 8 мм. Позитивний ефект на калюсогенез виявили 2,4-Д та піклорам; найменш ефективною була дія НОК. **Висновки.** Найбільш універсальним та оптимальним живильним середовищем для індукції калюсогенезу спельти та пшениці м'якої виявилось середовище МС, що містило 2 мг/л 2,4-Д та 10 мг/л нітрату срібла. Для нього загальний відсоток калюсогенезу був вищим від 80 %.

Ключові слова: калюсогенез, спельта (*Triticum spelta* L.), пшениця м'яка, калюс, апікальні меристеми.

У світі щорічно виробляється більше 600 мільйонів тонн зерна пшениці, приблизно 95 % з нього припадає саме на гексаплоїдну пшеницю (пшеницю м'яку та спельту), і лише 5 % на пшеницю тверду [1]. З огляду на це нові форми гексаплоїдних видів пшениць, що мають покращені господарсько-цінні ознаки, є перспективними, потребують розвитку та впровадження.

Існують різні підходи до створення нового рослинного матеріалу, що буде стійким до несприятливих факторів біогенного та абіогенного походження та мати вищий показник врожайності. Зокрема, це можна робити методами

традиційної селекції (як приклад, для підвищення продуктивності або стійкості проти вилягання); хімічним мутагенезом (коли, наприклад, потрібно, аби рослини набули стійкості до гербіцидів). Можна використовувати генно-інженерні підходи, зокрема *Agrobacterium*-опосередковану генетичну трансформацію для перенесення генів стійкості до гербіцидів або комах або для редагування генів за технологією CRISPR-Cas9 [2]. Якщо перші два методи в основному ґрунтуються на проведенні польових досліджень, то останній вимагає генно-інженерного втручання і може бути здійснений лише за відповідних умов.

Так, для генетичної трансформації та отримання біотехнологічних рослин, що будуть відрізнятися від вихідних певними покращеними якостями, можна використовувати калюси, отримані із різних видів експлантів. Відомо, що пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) піддається введенню в культуру *in vitro*, в результаті чого можна отримати репродуктивні рослини-регенеранти [3, 4], натомість сьогодні важко знайти інформацію щодо ефективної системи калюсогенезу та регенерації іншого гексаплоїдного виду пшениці – спельти (*Triticum spelta* L.). Експланти для цієї мети можуть бути різними – зрілі та незрілі зародки, базальні частини молодих листків та апікальні меристеми. У цьому випадку важливо, аби клітини експланта характеризувалися активною проліферацією, високою регенераційною активністю та були недиференційованими. Для виконання цих умов добре підходять апікальні меристеми, які можна ізолювати від молодих проростків. Чим молодшою буде рослинна тканина, тим більша вірогідність того, що відсоток регенерації буде вищим.

У якості індукторів для калюсогенезу із експлантів апікальних меристем можна використовувати похідні штучних ауксинів, зокрема дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4-Д), нафти-

лоцтову кислоту (НОК) та піклорам [3, 5]. Співвідношення цих речовин між собою може сприяти утворенню калюсу та його росту.

Апікальні меристеми є центром недиференційованих рослинних клітин, який займає апікальне положення в пагоні. Цей пул клітин є досить пластичним, характеризується високою регенераційною активністю та здатністю формувати нові бічні пагони у процесі росту рослини [6]. Проліферація меристематичних клітин залежить від співвідношення ауксинів та цитокінінів. Зважаючи на вищесказане, апікальні меристеми можна використовувати як експланти для отримання калюсів та їх наступної генетичної трансформації щодо перенесення або редагування генів господарсько-цінних ознак [7].

Матеріали і методи

Для роботи як вихідний рослинний матеріал було обрано 2 генотипи гексаплоїдної пшениці, детальна інформація про які представлена у таблиці 1. Досліджувані зразки, залучені з Національного центру генетичних ресурсів рослин України (НЦГРРУ), також є частиною робочої колекції ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції».

Поверхневу стерилізацію зерна проводили шляхом його замочування у 96 % етиловому спирті протягом 5 хвилин, а потім у 5 % гіпох-

лориті натрію – 10 хвилин. Відмивали зерно щонайменше тричі у стерильній дистильованій воді.

Як субстрат для пророщування використовували диски із фільтрувального паперу, які розміщували на чашках Петрі та попередньо змочували стерильною дистильованою водою. На одну чашку поміщали 45–55 зернівок. Пророщення проводили за температури + 25 С та режиму освітлення 16/8 протягом 3 діб.

Для введення в культуру *in vitro* використовували апікальні меристеми. Для виділення апікальних меристем брали молоді проростки довжиною 4–10 мм. Крім цього, здійснювали оцінку проростання зерна, для чого було зроблено 12 повторів (4 типи живильних середовищ та 3 повтори для кожного), та використали таку формулу: $(P \cdot 100) / Z$, де, Z – загальна кількість зернівок для відповідного повтору, P – кількість проростків.

Для індукції калюсогенезу використовували 4 різних живильних середовища (MSC – Murashige Skoog Callusogenesis) на основі базового середовища MS (Murashige Skoog) [8]. У таблиці 2 наведена інформація щодо їх компонентного складу. Для попередження бактеріальної контамінації використовували антибіотик цефтриаксон у концентрації 150 мг/л. Кількість повторів для кожного живильного середовища та генотипу складала три повтори.

Таблиця 1. Загальна характеристика робочих генотипів гексаплоїдної пшениці

№ п.п.	Вид	Сорт	Тип	Країна походження	2n	Тип розвитку	Рік врожаю
1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Бунчук	пшениця м'яка	Україна	42	озимий	2017
2	<i>Triticum spelta</i> L.	Європа	спельта	Україна	42	озимий	2017

Таблиця 2. Компонентний склад живильних середовищ, використаних для індукції калюсогенезу

Живильне середовище	Ауксини	Амінокислоти	Нітрат срібла	Вітаміни	Джерело вуглецю
MSC 1	1 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л піклорам	–	–	Вітаміни MS	3 % цукор
MSC 2	2 мг/л 2,4-Д	–	10 мг/л	Вітаміни MS	3 % цукор
MSC 3	2 мг/л 2,4-Д 1 мг/л НОК	150 мг/л L-аспарагін	10 мг/л	B5 за Гамборгом [9]	3 % цукор
MSC 4	0,3 мг/л піклорам 1 мг/л НОК	–	7 мг/л	Вітаміни MS	3 % цукор

Експланти культивували у темряві за + 25 С протягом 21 доби, оцінка калюсогенезу проводилася кожні 7 діб.

Відсоток калюсогенезу рахували за такою формулою: $(K \cdot 100) / E$, де K – загальна кількість отриманих калюсів, а E – початкова кількість експлантів.

Середній показник калюсогенезу визначали як суму із трьох значень, поділену на кількість повторів.

Результати та обговорення

Першим етапом роботи було здійснення оцінки ефективності проростання зерна кожного генотипу на мінімальному субстраті. У якості такого субстрату нами були обрані диски із фільтрувального паперу. Такий підхід має свої переваги, зокрема, якщо поверхнева стерилізація зерна була проведена неефективно, то відсутність джерела поживних речовин інгібує проростання грибкових спор, окрім того, це дозволяє економити живильне середовище та показує, наскільки великим є потенціал проростання зерна за відсутності допоміжних речовин. Результати такої оцінки представлені у таблицях 3 та 4.

Нами було встановлено, що генотип спельти «Європа» демонструє значно вищу ефективність проростання на мінімальному субстраті порівняно із пшеницею м'якою «Бунчук».

Так, середній відсоток проростання зерна через 3 доби після висадження на мінімальний субстрат для спельти «Європа» склав $81,5 \% \pm 6,1 \%$ (табл. 4), у той час як для пшениці м'якої сорту «Бунчук» – $61,2 \pm 11,1 \%$ (табл. 3). Така різниця у 20 % може бути цілком адекватною, оскільки у цьому випадку ми маємо справу не лише із різними сортами гексаплоїдної пшениці, а й із різними таксономічними видами – пшеницею м'якою та спельтою. Це означає, що їхнє зерно може дещо відрізнятися за кількісним та якісним складом речовин, що буде певною мірою впливати на швидкість та ефективність проростання зерна загалом. Так чи інакше, обидва генотипи мають ефективність проростання зерна вищу від 50 %, що дозволяє використовувати їх як вихідний субстрат для одержання апікальних меристем. Чим вищим буде показник проростання зерна, тим більше з нього можна буде отримати експлантів та калюсів у майбутньому.

Для цього дослідження нами було використано 4 типи живильних середовищ для індукції калюсогенезу. Усі вони містили в якості регуляторів росту ауксини у різній концентрації та співвідношенні. Результати ефективності калюсогенезу на кожному з цих середовищ представлені у таблиці 5.

Таблиця 3. Ефективність проростання зерна через 3 доби для генотипу *T. aestivum* L. «Бунчук»

Повтор	Кількість зернівок	Кількість проростків	Відсоток проростання (%)
1	55	35	63,63636
2	54	39	72,22222
3	57	29	50,87719
4	54	21	38,88889
5	50	30	60
6	50	38	76
7	50	34	68
8	50	37	74
9	54	33	61,11111
10	52	27	51,92308
11	54	36	66,66667
12	43	22	51,16279
Середній відсоток проростання (%)	61,20736		
Стандартне відхилення (%)	11,19671		

Таблиця 4. Ефективність проростання зерна через 3 доби для генотипу *T. spelta* L. «Європа»

Повтор	Кількість зернівок	Кількість проростків	Відсоток проростання (%)
1	48	37	77,08333
2	45	38	84,44444
3	38	30	78,94737
4	46	34	73,91304
5	44	34	77,27273
6	54	39	72,22222
7	50	46	92
8	50	40	80
9	50	42	84
10	52	47	90,38462
11	56	46	82,14286
12	44	38	86,36364
Середній відсоток проростання (%)	81,56452		
Стандартне відхилення (%)	6,163722		

Таблиця 5. Відсоток калусогенезу досліджуваних генотипів через 21 день культивування на різних живильних середовищах

№ п.п.	Генотип	Живильні середовища			
		MSC 1	MSC 2	MSC 3	MSC 4
1	<i>T. aestivum</i> «Бунчук»	65,4 % ± 7,7 %	80,01 % ± 3,1 %	42,7 % ± 11,1 %	52,1 % ± 10,5 %
2	<i>T. spelta</i> «Європа»	84,6 % ± 7,8 %	80,1 % ± 12,1 %	40,8 % ± 8,1 %	16,3 % ± 2,2 %

Як видно з таблиці 5, оптимальним живильним середовищем для індукції калусогенезу виявилось MSC 2, яке містило 2 мг/л 2,4-Д та 10 мг/л нітрату срібла. Цікаво, що для таких різних генотипів спельти та пшениці м'якої ефективність калусогенезу на цьому живильному середовищі виявилася майже однаковою (на рівні 80 %), що може свідчити про певну універсальність середовища MSC 2 для різних генотипів гексаплоїдної пшениці.

Загалом на цьому живильному середовищі калуси утворювалися та росли найкраще та найшвидше. Так, на рисунку на прикладі генотипу спельти «Європа» показано, як проходив цей процес. Уже на 7 день калусогенезу в середньому майже половина експлантів для обох генотипів формувала калуси розміром від 3 до 6 мм, а до 21 доби вони сягали до 8 мм. Ці калуси були світлі, ледь прозорі і до 21 доби поступово набували легкого жовтого відтінку. На 7 день калуси були дуже рихлими, натомість, починаючи з 14 доби, вони поступово ущільнюва-

лись, і в цей же час у поодиноких випадках спостерігали ризогенез, що був загалом меншим 10 %. Оскільки калус формувався по краях апікальної меристеми, то в цілому десь до 14 доби меристеми подовжувалися паралельно із ростом калусу і поступово перетворювалися на структури, що за 16-кратного збільшення нагадували світло-зелені листки.

Із наукової літератури відомо, що у певних концентраціях у живильному середовищі нітрат срібла здатен чинити як індукуючу, так інгібуючу дію щодо до калусогенезу. Так, відомо, що оптимальною концентрацією нітрату срібла для формування калусу є 4 мг/л, натомість його занадто висока концентрація приблизно 12 мг/л здатна призвести до зменшення ефективності утворення калусу. Натомість низькі концентрації нітрату срібла (приблизно 2 мг/л) або його повна відсутність ведуть до збільшення некрозу рослинної тканини [7]. У нашому дослідженні для живильного середовища MSC 2 концентрація нітрату срібла була 10 мг/л.

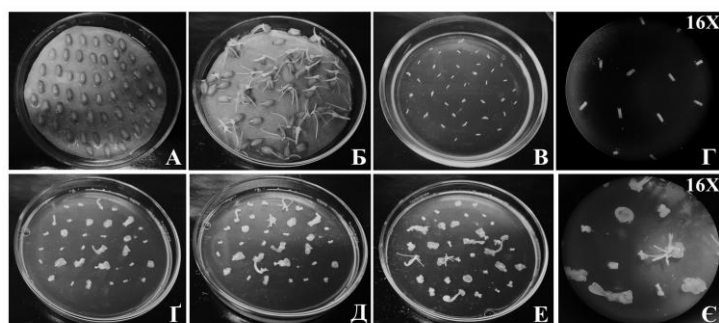


Рис. Стадії одержання калюсів із апікальних меристем 3-денних проростків для генотипу *T. spelta*. «Європа» на живильному середовищі MSC 2: А) зерно після поверхневої стерилізації; Б) 3-денні проростки; В) експланти апікальних меристем на живильному середовищі для калюсогенезу; Г) експланти при 16-кратному збільшенні; Г) 7-денні калюси; Д) 14-денні калюси; Е) 21-денні калюси; Є) 21-денні калюси за 16-кратного збільшення.

Хоча з фахової літератури відомо, що така висока концентрація цього агента може призвести до зменшення числа калюсів, проте, з іншого боку, серед сформованих калюсів вона підвищує відсоток ембріогенних утворень, які в подальшому зможуть регенерувати у повноцінні рослини [7]. За нашими спостереженнями, за такого високого вмісту нітрату срібла дійсно некроз тканин був відсутній і калюси виглядали більш здоровими, такими, що в перспективі здатні сформувати регенеранти (однак це ствердження потребує подальших досліджень).

Окрім середовища MSC 2, калюси непогано утворювалися та росли на живильному середовищі MSC 1, що містило 1 мг/л 2,4-Д та 0,5 мг/л піклорама (табл. 5). Можна сказати, що у цьому випадку калюс спелти ріс навіть трохи краще ($84,6\% \pm 7,8\%$ проти $80,1\% \pm 12,1\%$). Проте утворені калюси зберігали рихлість своєї структури до 21 доби, їх розмір здебільшого не перевищував 4–5 мм, і вони не утворювали коренів та листкоподібних структур. Для генотипу пшениці м'якої це живильне середовище виявилося менш ефективним у порівнянні із попереднім.

Варто сказати, що з наукових літературних даних відомо, що позитивний ефект на утворення калюсу чинять синтетичні похідні ауксинів, зокрема 2,4-Д, піклорам та дікамба [3]. У нашій роботі ми не використовували дікамбу, проте взяли до розгляду дві інші вищезазначені сполуки. Як видно з таблиці 5, 2,4-Д та піклорам дійсно позитивно впливають на калюсогенез досліджуваних нами генотипів, що демонструють приклади із живильними середовищами MSC 1 так MSC 2. Раніше для пшениці твердої встановлено, що оптимальною концентрацією регуляторів росту 2,4-Д, піклорама та дікамби є

2 – 2,5 мг/л [3]. У нашому дослідженні, зокрема на прикладі живильного середовища MSC 2 (2 мг/л 2,4-Д), показано, що ця концентрація дійсно є оптимальною і за неї калюси дійсно ростуть найкраще (табл. 5).

Загалом найменш придатним для одержання калюсів спелти стало живильне середовище MSC 4, яке містило у своєму складі 0,3 мг/л піклорама, 1 мг/л НОК та 7 мг/л нітрату срібла. Так, для цього генотипу відсоток калюсогенезу склав лише $16,3\% \pm 2,2\%$, в той час як для пшениці м'якої – $52,1\% \pm 10,5\%$ (табл. 5). Утворені калюси були рихлими та дрібними, їх розмір не перевищував 3–4 мм і до 21 доби вони набували світло-коричневого відтінку, що може бути свідченням накопичення певних метаболітів та старіння калюсної маси. На додачу до всього на поодиноких калюсах спостерігали некротичний ефект, проте він був незначним. Його наявність можна частково пояснити трохи нижчою концентрацією нітрату срібла, ніж у випадку із середовищем MSC 2.

Натомість найменш ефективним для калюсогенезу пшениці м'якої стало середовище MSC 3, де у якості індукторів калюсогенезу були узяті 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НОК, 10 мг/л нітрату срібла та додатково 150 мг/л L-аспарагіну. Тут рівень калюсогенезу для пшениці м'якої склав лише $42,7\% \pm 11,1\%$, а для спелти був ще нижчим – $40,8\% \pm 8,1\%$ (табл. 5). Морфологічно калюси не дуже відрізнялися від попереднього випадку живильного середовища (були рихлі та дрібні). Хоча некрозу тканини ми не спостерігали, проте калюси формувалися дуже погано та повільно, що частково можна пов'язати із сумарно високим вмістом ауксинів у живильному середовищі.

Загалом, якщо брати до уваги результати, представлені у таблиці 5, то можна зробити висновки, що для індукції калюсогенезу спельти найкраще підходять живильні середовища, що містять 2,4-Д.

Отримані нами результати є першим етапом у розробці та створенні ефективної системи для введення в культуру *in vitro* та отримання репродуктивних рослин-регенерантів спельти.

Висновки

Ефективність проростання зерна на 3 добу на мінімальному субстраті відрізнялася для генотипів спельти сорту «Європа» (81,5 % ± 6,1 %) та пшениці м'якої «Бунчук» (61,2 ± 11,1 %), що може бути пов'язане із генетичними особливостями цих зразків.

Серед 4 типів живильних середовищ для індукції калюсогенезу досліджуваних генотипів

найбільш придатним виявилось те, що містило 2 мг/л 2,4-Д та 10 мг/л нітрату срібла. Загальний відсоток калюсогенезу був вищим від 80 %.

Найменш ефективним для калюсогенезу спельти «Європа» стало живильне середовище, що містило 0,3 мг/л піклораму, 1 мг/л НОК та 7 мг/л нітрату срібла. Середній відсоток калюсогенезу склав 16,3 % ± 2,2 %.

Пшениця м'яка сорту «Бунчук» найповільніше та найгірше утворювала калюси на середовищі із 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НОК, 10 мг/л нітрату срібла та 150 мг/л L-аспарагіну. Відсоток калюсогенезу для цього генотипу був 42,7 % ± 11,1 %.

Генотип спельти «Європа» для кращого утворення калюсів потребував наявності у живильному середовищі 2,4-Д.

References

1. Shewry P. Wheat. *J. of Exper. Bot.* 2009. Vol. 60, № 6. P. 1537–1553. doi: 10.1093/jxb/erp058.
2. Meiling J., Jiantao G., Zhiwen Z., Shuaifeng G., Xueyong Z., Long M.,. Wheat functional genomics in the era of next generation sequencing: An update. *The Crop Journal.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 22–31. doi: 10.1016/j.cj.2017.09.003.
3. Satyavathi V., Jauhar P., Elias E., Rao M. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Sci.* 2004. Vol. 44. P. 1839–1846. doi: 10.2135/cropsci2004.1839.
4. Sticklen B., Oraby F. Invited review: shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. *J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2005. Vol. 41. P. 187–200. doi: 10.1079/IVP2004616.
5. Sears R., Deckard E. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. *J. Crop Science.* 1982. Vol. 22, № 3. P. 546–550. doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200030027x.
6. Anwaar A., Heng Z., Wengling W., Sticklen M.B. Shoot apical meristem: *in vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2002. Vol. 38. P. 163–167. doi: 10.1079/IVP2001267.
7. Wu L., Wei Y., Zheng Y. Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Rus. J. of Plant Phys.* 2006. Vol. 53, № 4. P. 530–534. doi: 10.1134/S1021443706040157.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *J. Phys. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
9. Gamborg O., Miller R., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *J. Exp. Cell Res.* 1968. Vol. 50, № 1. P. 151–158. doi: 10.1016/0014-4827(68)90403-5.

KYRIENKO A. V.^{1,2}, PARIJ M. F.², SYMONENKO Yu. V.^{1,2}, KUCHUK M. V.¹, SHCHERBAK N. L.¹

¹ Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148 b, e-mail: anastasija.kirienko@gmail.com

² Ukrainian Scientific Institute of Plant Breeding (VNIS), Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 30

CALLUS INDUCTION FROM SHOOT APICAL MERISTEM IN *TRITICUM SPELTA* L. AND *TRITICUM AESTIVUM* L.

Aim. To develop an effective protocol for callus induction from shoot apical meristem in *Triticum spelta* L. and *T. aestivum* L. **Methods.** Plant material: spelt “Europe” and common wheat “Bunchuk”. For this research we used shoot apical meristems from 3-days plants. For callus induction we proposed 4 media with different concentration of 2,4-D, picloram, NAA and AgNO₃. Explants were growing in dark during 21 day at + 25 C. **Results.** Calli were transparent and mild, less than 8 mm. For callus induction positive effect were shown on media with 2,4-D and picloram. At the same time, NAA was not such effective. **Conclusions.** In our research was shown, that the best media for spelt callus induction should have 2 mg/l 2,4-D and 10 mg/l AgNO₃.

Keywords: callusogenesis, spelt (*Triticum spelta* L.), common wheat, callus, shoot apical meristem.