

УДК 57.085.23:633

## ЦИТОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ СТІЙКИХ ДО ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТРИТИКАЛЕ ТА РЕГЕНЕРАНТІВ ІЗ НИХ

С.В. ПИКАЛО<sup>1</sup>, О.В. ДУБРОВНА<sup>2</sup>, А.В. БАВОЛ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України

08853 Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне

e-mail: rykserg@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

e-mail: dubrovny@ukr.net

Досліджено вплив осмотичного стресу на цитогенетичну структуру стійких калюсних культур тритикале озимого та регенерантів із них. Встановлено, що сублетальна концентрація стресора (маніту) чинить виражений кластогенний ефект і викликає турбагенні порушення в клітинах калюсів. Аналізом генетичної структури клітинних популяцій упродовж тривалого культивування за сублетальної концентрації маніту виявлено вірогідне збільшення анеуплоїдії й частоти сегрегації геномів жита і пшениці. Серед отриманих рослин-регенерантів переважали еуплоїди, що свідчить про селективний пріоритет гексаплоїдних клітин до морфогенезу.

*Ключові слова:* *Triticosecale*, калюсні культури, маніт, цитологічний аналіз.

В останні роки значно зріс інтерес до нової зернової культури — тритикале (*Triticosecale* Wittmack), яка має потужний фізіолого-генетичний потенціал продуктивності [2]. Протягом онтогенезу рослини цієї культури зазнають впливу різних чинників навколишнього середовища, які негативно позначаються на їх рості, розвитку та урожайності. Одним із таких негативних чинників є посуха [1, 16].

При визначенні механізмів дії стресових чинників і природи стійкості рослин потрібно знати реакцію не лише цілої рослини або органа, а й функціонально різних тканин і клітин. На сьогодні в дослідженні стійкості рослин до різних стресових чинників перспективним є застосування культури ізольованих клітин, оскільки дає змогу вивчати дію селективних чинників на клітину в суворо контрольованих умовах культивування, виключати складні корелятивні взаємовідносини між різними органами і тканинами і, як наслідок, полегшувати дослідження самого процесу дії стресового чинника на клітинний метаболізм.

Встановлено, що абіотичні стресори індукують мінливість і нестабільність геному в культурі *in vitro*, які виявляються на різних рівнях досліджень [17, 21, 30]. На цитологічному рівні доведено, що під дією осмотичних речовин мітотична активність клітин знижується, що супроводжується значними морфологічними і цитохімічними змінами ядер та ядерець [20, 23, 24, 28]. Ці зміни виявлялися в деструктуризації, гомо-

генізації, вакуолізації, зменшенні середніх розмірів та появи поліморфних ядер. За осмотичного стресу відбувались значна конденсація ядер і фрагментація ДНК [3, 29]. Гіперосмолярність також створює вторинний окиснювальний стрес, який спричинює надмірна кількість активних форм кисню [19]. Значний цитотоксичний ефект осмотично активних речовин, зокрема маніту, встановлено при дослідженні в культурі *in vitro* клітин *Centaurea ragusina* L. [26] і *Triticum aestivum* L. [7]. Виявлено хромосомні аберації та аномалії мітозу, пов'язані з порушеннями веретена поділу.

Варто зазначити, що особливості цитогенетичної мінливості клітинних культур тритикале за дії осмотичного стресу практично не досліджені, тому їх вивчення сприятиме встановленню специфічних генетичних механізмів, які зумовлюють мінливість у процесі клітинної селекції та отриманні осмотолерантних форм.

Метою цієї роботи було вивчення дії сублетальної концентрації маніту на цитогенетичну структуру клітинних популяцій калюсних культур тритикале і регенерантів із них.

### Методика

Матеріал досліджень — калюсні культури, отримані з експлантів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин озимого гексаплоїдного тритикале лінії 38/1296. Для індукування калюсу використовували середовище Мурасіге—Скуга (МС) [25], доповнене 2,4-Д концентрацією 2,0 мг/л. Калюси культивували при 26 °С, інтенсивності освітлення 3—4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді. Стресовим чинником слугував маніт, який додавали до поживного середовища у сублетальній концентрації — 0,6 М. Летальні й сублетальні концентрації маніту в культурі тканин тритикале ми встановили в попередніх дослідженнях [15]. Контролем слугували калюсні культури, які вирощували на середовищі без стресового чинника.

Аналізували по 100—150 метафазних та анафазних пластинок у кожному варіанті досліду. Цитогенетичний аналіз калюсних культур проводили в період найбільшої мітотичної активності — на 5—7-му добу культивування в I, III і VI пасажах. Цитологічне вивчення здійснювали, виключивши передфіксаційний вплив на мітоз, за стандартною методикою фіксації (етанол : льодяна оцтова кислота 3 : 1). Калюси фарбували 2 %-м оцетоорсеїном, тимчасові препарати готували за стандартною методикою [14].

Цитогенетичний ефект маніту на культуру тканин тритикале визначали за зміною співвідношення клітин різного рівня плоїдності та частотою структурних перебудов хромосом. Генотоксичну дію маніту виявляли аналізом частот виникнення різних типів аномалій мітозу в клітинах калюсних культур. Враховували такі параметри, %: кількості клітин із хроматидними та хромосомними мостами, фрагментами, відставанням хромосом, мультиполярними мітозами на стадіях ана- й телофаз.

Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів проводили в клітинах кореневої меристеми за стандартною методикою давлених препаратів [14]. Матеріал фіксували в суміші етанол : льодяна оцтова кислота (3 : 1) протягом доби в холодильнику за температури 4 °С і переносили у 70 %-й етанол. Від фіксатора зразки відмивали кілька разів у дистильованій воді,

переносили для мацерації у 5 н розчин НСІ 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 10–15 метафаз. Вірогідність відмінностей між показниками оцінено за критерієм Стьюдента.

### Результати та обговорення

Клітинні популяції вихідних калюсів (контроль) характеризуються стабільно-гетерогенною структурою, де 70–88 % становлять 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 (табл. 1).

Всі клітинні культури тритикале виявили подібну реакцію на осмотичний стрес, тому аналіз дії маніту на генетичну структуру клітинних популяцій проведено на прикладі калюсної лінії № 5. Цитогенетичний аналіз калюсних культур показав високий ступінь гетерогенності і наявність значних розбіжностей у характері перебігу цитологічних процесів між калюсами, вирощуваними на контрольному та селективному середовищах.

При перенесенні калюсів на селективне середовище в I пасажі внаслідок зменшення числа гексаплоїдних клітин вірогідно збільшувалось до 11 % число анеуплоїдних клітин (рис. 1, *ε*), що більш як у 2 рази перевищувало цей показник у контролі (див. табл. 1). У калюсів, культивованих на селективному середовищі, також виявлено вірогідне збільшення числа диплоїдних (див. рис. 1, *б*) і тетраплоїдних (див. рис. 1, *з*) клітин.

Протягом усього циклу культивування за числом гаплоїдних (див. рис. 1, *а*), триплоїдних (див. рис. 1, *в*) і пентаплоїдних (див. рис. 1, *д*) клітин вірогідних відмінностей між контролем та дослідом не виявлено. Слід зазначити, що упродовж культивування калюсів поліплоїдних клітин майже не фіксували. Поодинокі клітини траплялися лише в умовах контролю.

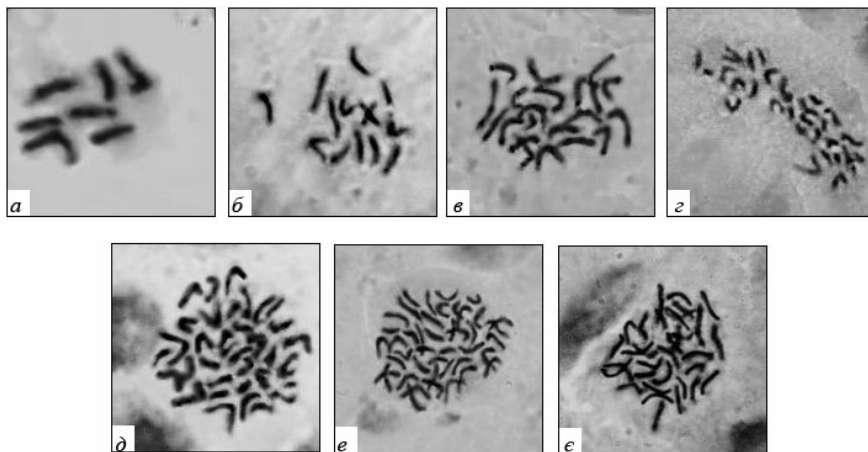


Рис. 1. Клітини різного рівня плоїдності калюсних культур тритикале:

*a* –  $2n = 1x = 7$ ; *б* –  $2n = 2x = 14$ ; *в* –  $2n = 3x = 21$ ; *г* –  $2n = 4x = 28$ ; *д* –  $2n = 5x = 35$ ; *е* –  $2n = 6x = 42$ ; *ε* –  $2n = 5x - 2 = 33$

ТАБЛИЦЯ 1. Частота клітин із різним числом хромосом у клітинах калюсних культур тритикале в процесі культивування на контрольному й селективному середовищах

Варіант досліджу	Досліджено метафаз, шт.	Кількість клітин із числом хромосом, %							
		2n = 1x	2n = 2x	2n = 3x	2n = 4x	2n = 5x	2n = 6x	2n > 6x	
Контроль	150	–	2,0±1,1	2,0±1,1	2,7±1,3	–	88,6±2,6	4,7±1,7	–
Лінія № 5	144	2,1±1,2	6,9±2,1*	4,2±1,7	8,3±2,3*	2,1±1,2	65,3±4,0*	11,1±2,6*	–
Контроль	134	1,5±1,1	3,7±1,6	3,0±1,5	4,5±1,8	–	80,6±3,4	6,7±2,2	–
Лінія № 5	128	3,1±1,5	10,2±2,7*	6,3±2,1	11,7±2,8*	3,1±1,5	40,8±4,3*	14,8±3,1*	–
Контроль	112	–	6,3±2,3	4,5±2,0	7,1±2,4	–	70,5±4,3	8,9±2,7	2,7±1,5
Лінія № 5	100	–	15,0±3,6*	8,0±2,7	16,0±3,7*	4,0±2,0	38,0±4,9*	19,0±3,9*	–

\*Відмінності порівняно з контролем вірогідні за  $p \leq 0,05$ .

Протягом III пасажу в калюсах, культивованих на селективному середовищі, на фоні зменшення числа еуплоїдних клітин спостерігали подальше вірогідне збільшення числа диплоїдних, тетраплоїдних та анеуплоїдних клітин. У VI пасажі зникали гаплоїдні й далі вірогідно збільшувалось число диплоїдних і тетраплоїдних клітин, а також число анеуплоїдних клітин (рис. 2).

Отже, при культивуванні калюсів на селективному середовищі з сублетальною концентрацією маніту вірогідно зростала частота сегрегації геномів, що виявлялось у збільшенні популяції клітин зі зменшеним відносно модального числом хромосом. Частота сегрегації підвищувалась з подовженням тривалості культивування. Слід також наголосити, що культура тритикале, яке є штучно синтезованим амфідиплоїдом і поєднує в собі геноми пшениці та жита, сама по собі характеризується певною цитогенетичною нестабільністю [27]. Тож унаслідок соматоклональної мінливості й дії осмотичного стресу в культурі *in vitro* нестабільність посилюється, що більшою мірою виявляється сегрегацією

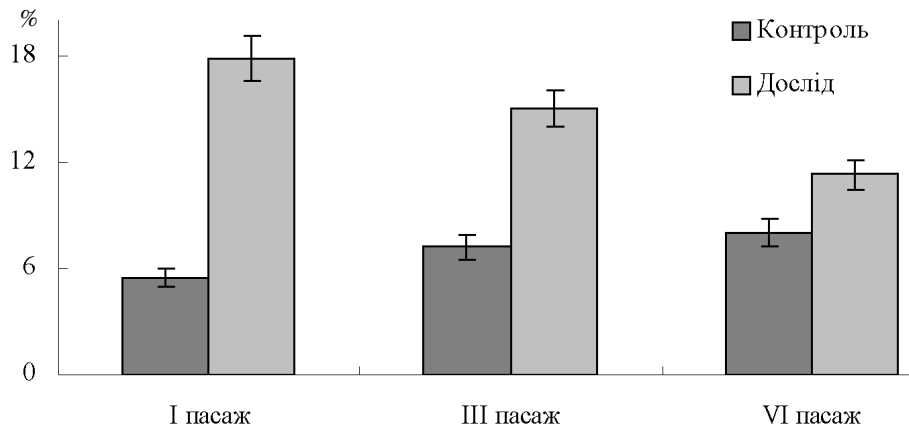


Рис. 2. Частота аберацій хромосом у клітинах калюсних культур тритикале в процесі культивування на контрольному і селективному середовищах

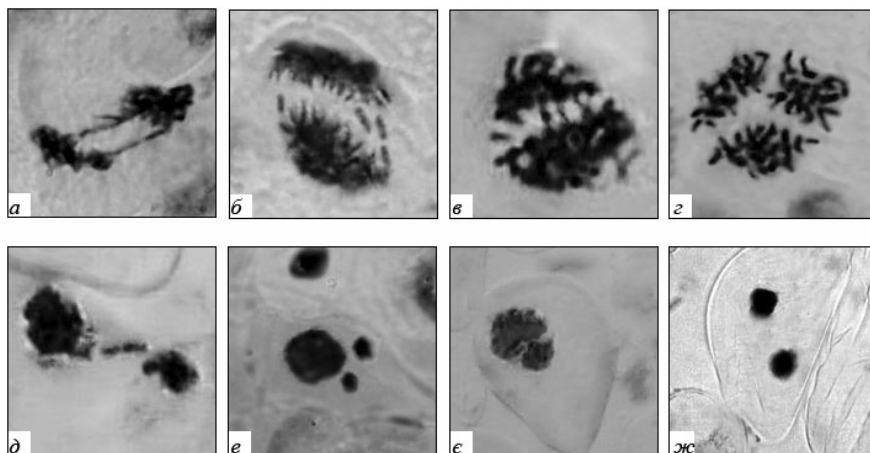


Рис. 3. Порушення мітозу в клітинах калюсу тритикале за культивування на селективному середовищі:

*a* — хроматидні мости; *б* — множинні фрагменти; *в* — множинні порушення; *г* — триполюсний мітоз; *д* — відставання хромосоми; *е* — мікроядра; *є* — лопатеве ядро; *ж* — двоядерна клітина

геномів пшениці та жита. До появи незбалансованих поліплоїдів із непарним числом хромосом (гаплоїди, триплоїди, пентаплоїди) може призводити сегрегація геномів під час еуплоїдних мітозів. Оскільки мультиполярні мітози (рис. 3, з) нерідко трапляються у процесі культивування калюсів тритикале, вони також можуть бути одним зі шляхів утворення анеуплоїдних клітин. Вже на перших етапах культивування спостерігали три- і багатополосні мітози, що й могло зумовити появу клітин різної плоїдності, в тому числі і з непарними наборами хромосом.

Відомо також, що клітини зі зміненим числом наборів хромосом у культурі *in vitro* можуть утворюватися двома шляхами, але в основі своєї вони нерозривно пов'язані з поділом клітин. Перший — це активування поділу передіснуючих у тканині експлантата клітин із тим чи іншим набором хромосом, другий — поява таких клітин *de novo* в результаті різних змін процесу мітотичного циклу у вигляді блокування чи випадіння окремих його стадій, а також у результаті порушень роботи мітотичного апарату та структурних перебудов хромосом [6, 10]. Пошкодження веретена поділу, яке виявляється у вигляді хромосом, що відстають (див. рис. 3, д) — ще один механізм появи таких клітин.

Наявність у середовищі сублетальної концентрації маніту призвела до підвищення частоти хромосомних аберацій. У I пасажі число клітин з абераціями в контрольному калюсі дещо перевищувало 5 %, тоді як у дослідних калюсах цей показник становив близько 17 %, тобто був більш ніж утричі вищий (див. рис. 2). Це означає, що високі концентрації маніту чинять виражений кластогенний ефект на калюсні культури тритикале. Більшість аберацій виявлено в клітинах у вигляді хроматидних мостів (див. рис. 3, а) і фрагментів (див. рис. 3, б). Як відомо, реалізовані пошкодження хромосом виявляються у вигляді фрагментів і мостів в анафазі цього ж клітинного циклу [11, 12]. Значне число аберацій у нашому експерименті було представлене саме хроматидними мостами, що відповідає збереженню у клітинних поколіннях дицентричних хромосом. Сумарне число абераційних анафаз із фрагментами становило близько 65 %, тобто у спектрі клітинних пошкоджень переважали «свіжі» розриви. Вірогідне збільшення їх числа свідчить про значний генотоксичний вплив маніту на хромосомний апарат клітин і його кластогенний ефект у сублетальній концентрації. Було виділено клітини з множинними порушеннями, тобто такі, які несли одночасно мости і фрагменти (див. рис. 3, в).

Протягом III пасажу в дослідних калюсах число клітин з абераціями істотно не змінилося, проте було вдвічі більшим, ніж у контролі. В VI пасажі частота хромосомних аберацій вірогідно не змінилася, проте порівняно з I пасажем неістотно знизилась. Це може бути пов'язано з адаптацією клітинної популяції до стресових умов.

Сумарне число аномалій мітозу, зумовлених порушеннями веретена поділу, в контролі не перевищувало 3 % (табл. 2). Виявлено багатополосні мітози (див. рис. 3, з), хромосоми, що відстають (див. рис. 3, д), клітини з лопатевими ядрами та мікроядрами (див. рис. 3, е, є), а також двоядерні (див. рис. 3, ж).

На селективному середовищі з 0,6 М маніту вже в I пасажі частота аномалій мітозу, пов'язаних із порушеннями веретена поділу, збільшилася до 13 % (див. табл. 2). Отримані результати підтвердили, що сублетальна концентрація маніту викликає також і турбагенні порушення в клітинах калюсних культур тритикале. Варто підкреслити, що серед

ТАБЛИЦЯ 2. Частота виникнення турбагенних ефектів у мітотичних клітинах калюсних культур тритикале на середовищі з 0,6 М маніту\*

Варіант досліджу	Клітини з аномаліями мітозу, % мітотичних клітин	Відставання хромосом, %	Мультиполярні мітози, %	Лопатеві ядра, %
I пасаж				
Контроль	3,4±1,5	0,7±0,6	2,0±1,1	0,7±0,6
Лінія № 5	13,4±2,8**	4,0±1,6	6,7±2,0**	2,7±1,3
III пасаж				
Контроль	4,8±1,7	1,4±0,9	2,0±1,1	1,4±0,9
Лінія № 5	11,3±2,6**	3,3±1,5	6,0±1,9**	2,0±1,1
VI пасаж				
Контроль	6,7±2,0	2,0±1,1	3,3±1,5	1,4±0,9
Лінія № 5	8,7±2,3	2,7±1,3	4,0±1,6	2,0±1,1

\*Досліджено 150 мітотичних клітин на варіант. \*\*Відмінності порівняно з контролем вірогідні за  $p \leq 0,05$ .

порушень мітозу більшість становили багатополюсні мітози (до 55 %). Відомо, що така аномалія клітинного поділу є виявом сильної анти-мікротрубочкової дії токсичних сполук [22]. Крім того, за сублетальної концентрації осмотично активної речовини в I пасажі зростає число клітин з мікроядрами (до 25—30 % загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значного генотоксичного впливу маніту на клітини [18]. Слід зазначити, що частка клітин з іншими патологіями мітозу, зокрема полікаріоцитами, була незначною — їх число не перевищувало 5 % загального числа клітин з аномаліями поділу.

Реститутивні клітини — клітини з лопатевими ядрами чи полікаріоцити — можуть утворюватись унаслідок виходу клітин із К-мітозу шляхом деконденсації хаотично розкиданих хромосом, минаючи стадію розходження хромосом та утворення клітинної стінки [13]. Дво-ядерні клітини утворюються внаслідок порушення клітинного поділу, що пов'язано із запізненням цитокінезу [5]. Такі ядерні аномалії інтерфазних клітин також характеризують турбагенний ефект маніту. Мікроядра можуть утворюватись унаслідок виходу з мітозу клітин з відставанням хромосом, що разом із багатополюсними мітозами зумовлює можливість розвитку анеуплоїдії [9].

Відомо, що цитогенетичні зміни клітин калюсів зумовлюють мінливість індукованих із них рослин-регенерантів [4]. Розроблена нами система культивування дає змогу вже у I пасажі, після перенесення стійких форм на регенераційне середовище, отримувати рослини-регенеранти. Під час цитологічного аналізу регенерантів, отриманих зі стійких калюсних культур, було виявлено рослини різного рівня плідності (табл. 3).

Підтверджено, що більшість рослин-регенерантів, індукованих зі стійких калюсних ліній, є гексаплоїдними, однак виявлено й анеуплоїдні форми. Серед 43 вивчених рослин 37 були гексаплоїдами, 6 — анеуп-

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

ТАБЛИЦЯ 3. Плоїдність рослин-регенерантів  $R_0$ , отриманих зі стійких калюсних ліній тритикале

Клітинна лінія	Досліджено регенерантів, шт.	Число гексаплоїдів, шт.	Число анеуплоїдів, шт.
1	5	5	—
2	8	7	1
3	11	9	2
4	6	5	1
5	13	11	2

лоїдами із числом хромосом 35—41. За подальшого культивування та укорінення отриманих гексаплоїдних регенерантів фенотипних відмінностей від вихідного морфотипу не виявлено. Рослини з анеуплоїдним набором хромосом характеризувались зниженою життєздатністю та аномальним розвитком генеративних органів, тому вони не сформували повноцінного колоса і не дали насіння.

Рівень плоїдності рослин-регенерантів відображає ступінь гетерогенності клітинних популяцій стійких калюсних культур. Слід зазначити, що рослини різного рівня плоїдності також отримані за регенерації зі стійких до комплексу стресових чинників (у тому числі до осмотичного стресу) калюсних культур пшениці [8]. Відомо, що з калюсів часто регенерують рослини з широкою варіабельністю за числом хромосом. У наших дослідженнях серед отриманих рослин переважно більшість становили еуплоїди, що свідчить про селективне переважання гексаплоїдних клітин до морфогенезу.

У результаті проведених досліджень ми виявили цитогенетичний ефект маніту в культурі тканин тритикале у процесі добору стійких до осмотичного стресу форм. Встановлено, що сублетальна концентрація стресового чинника спричинює кластогенний ефект і турбагенні порушення в клітинах калюсів. Аналізом генетичної структури клітинних популяцій упродовж тривалого культивування за сублетальної концентрації осмотично активної речовини виявлено вірогідне збільшення анеуплоїдії та частоти сегрегації геномів, що виявляється у зростанні популяцій клітин зі зменшеним відносно модального числом хромосом.

1. Авдеев Ю.И., Слащева Л.А. Устойчивость озимой тритикале к экстремальным абиотическим факторам среды в аридной зоне возделывания // Астрахан. вестн. эколог. образования. — 2014. — 29, № 3. — С. 84—87.
2. Біліт'юк А.П., Гірко В.С., Каленська С.М., Андрушків М.І. Тритикале в Україні. — К.: Арістей, 2004. — 388 с.
3. Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А. Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungeria victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // Цитология и генетика. — 2008. — 42, № 1. — С. 29—36.
4. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., ЧуGUNкова Т.В. Комплексная селекция in vitro на устойчивость клеточных линий кормовой свеклы к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам // Биополимеры и клетка. — 2000. — 16, № 2. — С. 111—120.
5. Довгалюк А.І. Порівняння цитогенетичної та антимікротрубочкової активності фітотоксичних металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2014. — 26 с.
6. Дубровна О.В., Бавол А.В. Мінливість геному пшениці в культурі in vitro // Цитология и генетика. — 2011. — 5, № 1. — С. 76—84.
7. Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Цитогенетичний ефект маніту на калюсні культури м'якої пшениці, стійкі й нестійкі до метаболітів *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — 44, № 6. — С. 508—515.



8. Зінченко М.О. Клітинна селекція пшениці на стійкість до комплексу стресових факторів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., 2014. — 20 с.
9. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. — Томск: Изд-во Томск. гос. ун-та, 1992. — 270 с.
10. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
11. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 6. Изменчивость и отбор в процессе адаптации к условиям выращивания *in vitro* // Биополимеры и клетка. — 2000. — **16**, № 3. — С. 159—185.
12. Кунах В.А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // Успехи соврем. генетики. — 1984. — **12**. — С. 30—62.
13. Кундельчук О.П., Тарасенко Л.В., Блюм Я.Б. Сравнение действия ампиротрофосметила на структуру клеток корня у чувствительных и устойчивых линий *Nicotiana plumbaginifolia* // Физиология растений. — 2002. — **49**, № 3. — С. 425—430.
14. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1988. — С. 168—170.
15. Пыкало С.В., Зінченко М.О., Волощук С.І., Дубровна О.В. Скринінг генотипів тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту в культурі апікальних меристем пагонів // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2014. — **12**, № 2. — С. 191—199.
16. Пыкало С.В., Зінченко М.О., Волощук С.І., Дубровна О.В. Селекция *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту // Biotechnol. Acta. — 2015. — **8**, № 2. — С. 69—77.
17. Тищенко Е.Н., Михальская С.И., Сергеева Л.Е. Нестабильность *RAPD*-ампликонов сои при клеточной селекции на устойчивость к оксианионам вольфрама и ванадия // Факторы экспериментальной эволюции организмов. — Киев: Логос, 2008. — Т. 4. — С. 205—210.
18. Blum A. Plant breeding for stress environment. — CRC Press. Israel, 1988. — 450 p.
19. Dat J., Vandenberghe S., Van Montagu M. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell. Mol. Life Sci. — 2000. — **57**. — P. 779—795.
20. Echenique G.V., Curvetto N.R. Effect of water stress upon cell division in root tips of *Eragrostis carvula* // Biol. Plant. — 1990. — **32**, N 2. — P. 153—160.
21. Errabii T., Bernard C., Gandonou C. et al. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures // Acta Physiol. Plant. — 2007. — **29**. — P. 95—102.
22. Fiskesjo G. In vitro toxicity testing protocol. — New York: Humana Press, 1995. — P. 119—127.
23. Hasegawa P., Bressan R., Handa S., Handa A. Cellular mechanisms of tolerance to water stress // Hort. Sci. — 1984. — **19**. — P. 371—377.
24. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress // Plant Cell Environ. — 2002. — **25**. — P. 239—250.
25. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — **15**. — P. 473—479.
26. Radic S., Prolc M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. // Environ. and Experim. Bot. — 2005. — **54**, N 3. — P. 213—218.
27. Soloviev A.A., Karlov G.I., Divashuk M.G., Bazaleev N.A. Morphological and cytogenetic characterization of translocated spring triticale line 131/7 // Acta Agricult. Serbica. — 2005. — **10**, N 19. — P. 17—25.
28. Verma D. Cytokinesis and building of the cell plate in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — **52**. — P. 751—784.
29. Xiong L., Zhu J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress // Plant Cell Environ. — 2002. — **25**. — P. 131—139.
30. Zhang J., Kirkham M. Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species // Plant Cell Physiol. — 1994. — **35**. — P. 785—791.

Отримано 22.06.2015

#### ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВЫХ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ КАЛЛЮСНЫХ КУЛЬТУР ТРИТИКАЛЕ И РЕГЕНЕРАНТОВ ИЗ НИХ

С.В. Пыкало<sup>1</sup>, О.В. Дубровна<sup>2</sup>, А.В. Бавол<sup>2</sup><sup>1</sup>Мироновский институт пшеницы имени В.Н. Ремесло Национальной академии аграрных наук Украины, Киевская обл., с. Центральное<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовано влияние осмотического стресса на цитогенетическую структуру устойчивых каллюсных культур тритикале озимого и регенерантов из них. Установлено, что сублеталь-

ная концентрация стрессового фактора (маннита) оказывает выраженный кластогенный эффект и вызывает турбагенные нарушения в клетках каллюса. Анализом генетической структуры клеточных популяций на протяжении длительного культивирования при сублетальной концентрации маннита выявлено достоверное увеличение анеуплоидии и частоты сегрегации геномов ржи и пшеницы. Среди полученных растений-регенерантов превалировали эуплоиды, что свидетельствует о селективном приоритете гексаплоидных клеток к морфогенезу.

CYTOLOGICAL ANALYSIS OF RESISTANT TO OSMOTIC STRESS CALLUS CULTURES OF TRITICALE AND REGENERANTS FROM THEM

*S.V. Pykalo<sup>1</sup>, O.V. Dubrovna<sup>2</sup>, A.V. Baval<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

v. Tsentral, Myronivka district, Kyiv region, 08853, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The effect of osmotic stress on cytogenetic structure of resistant callus cultures of winter triticales and regenerants from them was studied. It was established that sublethal concentrations of mannitol caused significant clastogenic effect and turbagenic disturbances in callus cells of triticales. Analysis of genetic structure of cell populations during long-term cultivation showed a significant increase in aneuploidy and frequency of genome segregation of wheat and rye. Among the obtained regenerants euploids were in most cases indicating a selective advantage of hexaploid cells in ability to morphogenesis.

*Key words:* *Triticosecale*, callus cultures, mannitol, cytological analysis.