

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ПШЕНИЦІ ТА ТРИТИКАЛЕ НА СТІЙКІСТЬ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ

С. Пикало*, О. Демидов, Н. Прокопик, С. Волощук, М. Харченко,
Т. Юрченко, С. Хоменко, О. Гуменюк

*Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України
с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл. 08853, Україна
e-mail: pykserg@ukr.net*

За використання селективної системи з низькомолекулярним манітом проведено селекцію *in vitro* і здійснено добір калюсних ліній пшениці м'якої озимої та ярої, тритикале озимого, стійких до модельованого водного дефіциту. Для отримання форм, стійких до осмотичного стресу, в представленій роботі використано методи культури тканин і органів *in vitro*, прямої та ступінчастої селекції *in vitro* і статистичного аналізу даних. У всіх досліджуваних генотипів виділено по дві стійкі калюсні лінії, які мали високий рівень виживання на селективному середовищі з 0,6 М манітом і зберегли морфогенетичний потенціал. Ступінчаста селекція *in vitro* виявилася ефективнішою, оскільки в результаті її застосування виділено більшу кількість стійких калюсних форм і отримано більше рослин-регенерантів. Зі стійких ліній індуковано рослини-регенеранти й оптимізовано їхнє дорошування, укорінення та переведення в умови *in vivo*. Формування рослин-регенерантів із калосів відбувалося шляхом як геморизогенезу, так і соматичного ембріодогенезу. Оцінка рослин-регенерантів пшениці та тритикале, отриманих зі стійких калосів, виявила підвищений рівень толерантності до водного дефіциту. Стійкість до осмотичного стресу виділених *in vitro* клітин збереглася в індукованих рослинах і на організмовому рівні забезпечила підвищення толерантності до водного дефіциту. Результати досліджень можуть свідчити про те, що рослини-регенеранти пшениці та тритикале, отримані шляхом клітинної селекції, мають генетично обумовлену ознаку стійкості до стресового фактора. Розроблена методика добору *in vitro* генотипів пшениці та тритикале на стійкість до водного дефіциту може застосовуватися в подальших дослідженнях як елемент біотехнологічних і селекційних програм. Шляхом клітинного добору загалом отримано 48 осмотостійких соматоклональних варіантів, у тому числі пшениці м'якої озимої – 15 рослин, пшениці м'якої ярої – 14, тритикале озимого – 19, які є цінним селекційним матеріалом і будуть залучені до створення нових сортів інтенсивного типу зернових колосових культур.

Ключові слова: пшениця, тритикале, селекція *in vitro*, рослини-регенеранти, осмотичний стрес

Збільшення урожайності є найбільш важливим критерієм у вирощуванні будь-яких сільськогосподарських рослин. Несприятливі погодні умови протягом вегетації майже завжди супроводжуються низьким рівнем урожайності як озимих, так і ярих культур та невисокими валовими зборами зернової продукції [15].

Серед природних чинників, що найбільш негативно впливають на всі фізіологічні процеси росту й розвитку рослин і врешті-решт призводять до втрат урожаю, є водний дефіцит, викликаний посухою [24, 30]. Шкідлива дія посухи полягає, в першу чергу, у зневодненні та порушенні метаболічних процесів у рослинах, що призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і, як наслідок, до зниження

кількості накопиченої рослинами органічної речовини [23]. Очікується, що з прогресуючим глобальним потеплінням клімату періодичність повторення посух по роках буде тільки посилюватися. Основний напрям вирішення цього завдання – створення сортів із високим генетичним потенціалом продуктивності, які можуть реалізувати його незалежно від лімітів середовища. Саме тому одним із найважливіших напрямів сучасної генетики, селекції та біотехнології є створення культурних рослин, толерантних до несприятливих умов довкілля. У зв'язку зі складним механізмом появи ознаки посухостійкості у рослин створення нових стійких сортів на основі наявних методів класичної селекції є досить складним завданням. Принципово новим підходом на сьогоднішній день є поєднання традиційної селекції з методами біотехнології [12, 25]. На особливу увагу заслуговує клітинна селекція, яка значно полегшує та прискорює традиційний селекційний процес створення нових ліній і сортів [4, 25]. Селекція *in vitro* ґрунтується на використанні культури тканин і клітин – біологічної системи, де немає механізмів регуляції, що діють на рівні цілого організму. За умов *in vitro* можна задавати різні параметри, подібні до тих, у яких в подальшому ростимуть дорослі рослини, в тому числі й екстремальні умови вирощування [22]. Для імітації *in vitro* стресового ефекту водного дефіциту застосовують живильні середовища, доповнені осмотично активними речовинами, такими як поліетиленгліколь або маніт [5]. Слід відмітити, що, порівняно з непроникаючим поліетиленгліколем, маніт проникає у рослинну клітину та знижує нормальний водний потенціал, чим спричиняє зневоднення й гальмування багатьох фізіологічних і метаболічних процесів [2]. Єгипетські дослідники [21] встановили чітку позитивну кореляцію між виживаністю калюсів пшениці на селективних середовищах із різними концентраціями маніту і життєздатністю цих генотипів у польових умовах.

На даний час селективні системи для добору стійких до водного дефіциту форм розроблені для багатьох злакових культур, проте в літературі практично не можна знайти двох однакових схем клітинної селекції *in vitro*. Схема добору залежить від виду рослини, ознаки, за якою отримують стійкі форми, особливостей калюсо- і морфогенезу, методики проведення експериментів, вивченості дії стресового чинника та інших суб'єктивних причин. Клітинна селекція таких зернових колосових культур як пшениця і тритикале на посухостійкість має важливе теоретичне і практичне значення, проте ні у вітчизняній, ні в зарубіжній літературі належного висвітлення так і не отримала. Незважаючи на те, що культура *in vitro* злакових вже певний час використовується як об'єкт досліджень, до сьогодні рослини з триби *Gramineae* вважаються одними з найскладніших для біотехнологічних робіт. Серед головних проблем, що обмежують застосування клітинних технологій у селекції злакових, є низька частота регенерації рослин із культивованих клітин і тканин. Одним із ключових чинників, що впливає на ефективність біотехнологічних робіт зі злаковими культурами, є вибір відповідного типу експланта. Останнім часом значно зріс інтерес до апікальної меристеми пагонів як найперспективнішого експланта для злакових культур, оскільки порівняно з незрілими зародками його перевагою є можливість подолати генотипові особливості форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, і можливість отримати значну кількість вихідного матеріалу за короткий час [3, 31]. Даний тип експланта широко використовують як джерело калюсної тканини, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу – до 90 % [20, 31]. Представлена у попередніх дослідженнях оптимізована система отримання повноцінних регенерантів пшениці [3, 10] та тритикале [11] в культурі апікальних меристем пагонів дає змогу успішно отримувати достатню кількість рослин. Враховуючи доступність даного типу експланта за будь-якої пори року та зруч-

ність роботи з ним, доцільним і актуальним завданням, на наш погляд, є розробити аналогічну селективну систему для добору посухостійких генотипів злакових. У зв'язку з цим метою роботи було провести селекцію *in vitro* для одержання стійких до водного дефіциту калюсних ліній і рослин-регенерантів пшениці м'якої озимої та ярої і тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів із використанням маніту як стрес-чинника.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень були перспективні генотипи зернових колосових культур селекції Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН України (МІП): лінія Еритроспермум 60068 (пшениця м'яка озима), гібрид F₂ Елегія миронівська / Краса Полісся (пшениця м'яка яра), лінія КС 6 (тритикале озиме), які характеризуються високими господарсько-цінними показниками. Зразки насіння отримано вирощуванням у польових умовах селекційних розсадників МІП 2017 р.

Для отримання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1 % розчином КМnO₄ протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували в 1 % розчині AgNO₃ і поміщали в 96 % етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було триразове промивання стерильною дистильованою водою. Отримане простерилізоване насіння пророщували на світлі при 24 °С на безгормональному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [28]. Як експланти використовували апікальну меристему пагона тридобових стерильних проростків [3]. Розмір експлантів варіював у межах 1,5–2,0 мм.

Культуру калюсної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, AgNO₃ – 10 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д [3]. Експланти культивували за 26 °С в темряві упродовж трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували за освітлення 3–4 клк, відносної вологості повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду ще протягом трьох тижнів. Як селективний агент застосовували низькомолекулярний маніт, який додавали до модифікованого середовища МС у концентраціях 0,2; 0,4 та 0,6 М. Для кожного генотипу було взято по 200 калюсів.

Для добору осмостійких калюсних ліній проводили пряму та ступінчасту клітинну селекцію [7]. Прямий добір проводили за схемою: індукція калюсу та його розмноження (2 пасажі) → селективне середовище з 0,6 М маніту (3 пасажі) → середовище МС (1 пасаж) → селективне середовище з 0,6 М маніту (2 пасажі) → регенерація пагонів (1 пасаж). Ступінчасту селекцію проводили за схемою: індукція калюсу та його розмноження (2 пасажі) → селективне середовище з 0,2 М маніту (1 пасаж) → селективне середовище з 0,4 М маніту (1 пасаж) → селективне середовище з 0,6 М маніту (1 пасаж) → середовище МС (1 пасаж) → селективне середовище з 0,6 М маніту (2 пасажі) → регенерація пагонів (1 пасаж). Після кожного пасажу (тривалістю три тижні) визначали частку живих калюсів як відсоткове відношення кількості життєздатних калюсів до їхнього початкового числа. При цьому до мертвих залучали калюси, які побуріли на 2/3 своєї поверхні і більше, а решту вважали живими.

Для індукції морфогенезу калюси переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК). Частоту регенерації пагонів визначали як відсоткове відношення кількості калюсів, що утворили хоча б один пагін, до початкового числа калюсів. Калюси, що утворювали пагони, переносили на модифіковане середовище МС [7] із половинним вмістом макроелементів та доповнене нафтилоцтовою кислотою концентрацією 1 мг/л для укорінення.

Аналіз стійкості індукованих рослин-регенерантів до осмотичного стресу проводили, використовуючи розроблену нами систему пересадок на живильні середовища зі стресовим чинником і без нього. Селективні середовища (модифіковане середовище МС)

містили сублетальну дозу маніту (0,6 М), визначену нами для пшениці [8] та тритикале [9] у попередніх дослідженнях. Регенеранти пасажували за схемою: селективне середовище з 0,6 М маніту (2 пасажі) → середовище МС (1 пасаж). Стійкість рослин визначали за рівнем їхнього виживання в селективних умовах.

У подальшому регенеранти пересаджували у стерильний ґрунт і залишали у вологій камері на 7–14 діб, після чого вже вирощували в умовах вегетаційного будиночка до фази повної стиглості зерна. Регенеранти озимих культур попередньо яровизували в холодильній камері за температури +4 °С протягом 50 діб.

За статистичної обробки даних визначали похибку середнього арифметичного та довірчий інтервал t-критерію Стьюдента [18].

Результати і їхнє обговорення

У попередніх дослідженнях [8, 9] нами виявлено, що концентрація маніту 0,8 М для переважної більшості калюсних культур зернових була летальною, тому для проведення селекції *in vitro* ми використовували концентрацію маніту 0,2–0,6 М за ступінчастої селекції та 0,6 М – за прямої. Життєздатність калюсів перевіряли в селективних і неселективних умовах, а також порівнювали ефективність застосування прямої та ступінчастої клітинної селекції (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка виживання калюсів зернових культур на селективному середовищі з манітом за прямого та ступінчастого добору

Метод добору	Пасаж	Концентрація маніту, М	Частка живих калюсів, %		
			Еритроспермум 60068 (пшениця м'яка озима)	Елегія миронівська / Краса Полісся (пшениця м'яка яра)	КС 6 (тритикале озиме)
Прямий	1	0,6	42,0±3,5	37,0±3,4	49,0±3,5
	3	0,6	25,5±3,1	20,5±2,9	27,5±3,2
	6	0,6	9,5±2,1	8,0±1,9	11,0±2,2
Ступінчастий	1	0,2	68,5±3,3	74,5±3,1	79,5±2,9
	2	0,4	47,5±3,5	51,5±3,5	59,5±3,5
	3	0,6	20,5±2,9	25,5±3,1	36,5±3,4
	6	0,6	11,0±2,2	9,5±2,1	12,5±2,3

Виявлено, що за прямого добору на середовищі з 0,6 М маніту до кінця першого пасажу виживало від 37 до 49 % калюсів.

Після трьох пасажів у селективних умовах частка живих калюсів у досліджуваних генотипів становила 20,5–27,5 %. Після пасажу на середовищі без селективного фактора і перевірки росту в селективних умовах у лінії Еритроспермум 60068 пшениці м'якої озимої було отримано 9,5 % резистентних калюсів, гібриду F₂ Елегія миронівська / Краса Полісся пшениці м'якої ярої – 8,0 %, лінії КС 6 тритикале озимого – 11,0 %.

Окрім прямого добору, ми проводили також ступінчасту селекцію, яка полягала у поступовому збільшенні вмісту в середовищі маніту. При цьому клітинні лінії, культивовані на середовищах із низьким вмістом осмотика, пересаджували на середовища з вищою його концентрацією, що підвищувало тиск стресового агента. За ступінчастого добору до кінця 6-го пасажу на середовищах з 0,6 М маніту було зафіксовано від 9,5 до 12,5 % живих калюсів. Таким чином, ступінчастий добір виявився ефективнішим, оскільки в результаті його застосування виділено більше стійких калюсних форм.

У ході культивування калюсів на стресових фонах із різними концентраціями маніту зменшувалась і їхня морфогенна здатність. Нестійкі до осмотичного стресу калюси через

4–5 днів набували буро-коричневого кольору, а через 10–20 днів, залежно від дози осмотика, відмиralи. Калюсні лінії зі стійкістю до водного дефіциту мали такі морфологічні характеристики: щільний калюс із глобулярною структурою жовтого кольору (рис. 1).

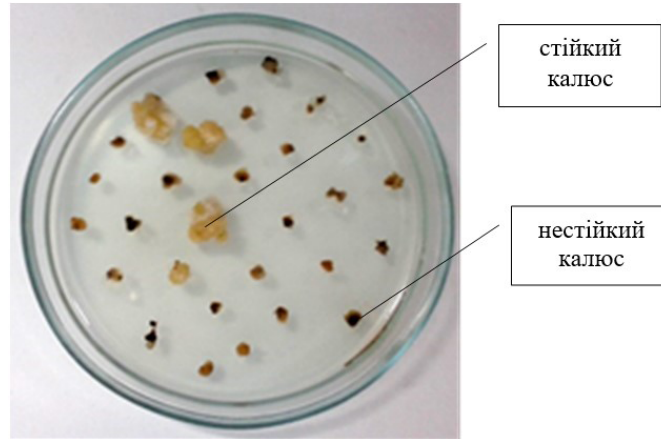


Рис. 1. Калюси лінії КС 6 тритикале озимого 21-ї доби 5-го пасажу культивування (живильне середовище МС + 2 мг/л 2,4-Д + 0,6 М маніт; температура культивування 26 °С)

У результаті селекції за послідовних субкультивувань було виділено калюсні лінії, які росли на селективних середовищах з 0,6 М маніту і стабільно зберігали ознаку резистентності (табл. 2).

Для одержання більшої вибірки досліджуваного матеріалу і, як наслідок, більш достовірних результатів виділені стійкі калюси розділяли на дрібніші шматочки і знову висаджували на середовище МС для нарощування їхньої біомаси.

Таблиця 2

Частота регенерації пагонів на модифікованому середовищі МС
зі стійких калюсних ліній

Генотип	Калюсна лінія	Частота регенерації пагонів за різних методів добору, %		Частота регенерації укорінених рослин-регенерантів за різних методів добору, шт.	
		прямий	ступінчастий	прямий	ступінчастий
Еритроспермум 60068 (пшениця м'яка озима)	Контроль		35,5±3,4		25
	60068/1	6,5±1,7*	–	9	–
	60068/2	–	9,5±2,1*	–	14
Елегія миронівська / Краса Полісся (пшениця м'яка яра)	Контроль		30,0±3,2		22
	1031/1	5,5±1,6*	–	10	–
	1031/2	–	7,5±1,9*	–	13
КС 6 (тритикале озиме)	Контроль		29,0±3,2		27
	6/1	7,5±1,9*	–	11	–
	6/2	–	9,0±2,0*	–	16

Примітка: * різниця між контролем і дослідом достовірна за $p \leq 0,05$

Як відомо, стабільна регенераційна здатність є необхідною умовою практичного застосування культури тканин у клітинній селекції, яка спрямована на отримання стійких форм рослин [4, 27]. Слід відмітити, що довготривале культивування калюсних ліній усіх досліджуваних генотипів призводило до зниження їхньої регенераційної здатності, оскільки наявність у живильному середовищі маніту викликала різке пригнічення морфогенних властивостей. Як зазначається в літературних джерелах [27, 29], проблема отримання пов-

ноційних рослин зі стійких клітинних ліній є однією з найбільш важливих і складних у селекції *in vitro*. Відомо, що регенерація з таких форм значно ускладнена, що і є головною причиною низької частоти утворення рослин-регенерантів. Більшість дослідників пояснюють це явище появою мутаційних змін [17, 27]. Під час досліджень у морфогенних калюсів після зняття селективного чинника часто спостерігали тільки ризогенез (утворення коренів), що також показано у працях інших дослідників. У роботі О. Єрещенко та Л. Хлебової [6] показано досить високий рівень ризогенезу у калюсів за дії осмотика, що істотно знизило вихід регенерантів, але підвищило загальну частоту утворення морфогенних калюсів. Автори також встановили, що генотипи зі середньою і низькою стійкістю до дефіциту вологи знижували в умовах осмотичного стресу свій регенераційний потенціал щодо контролю на 70–92 %.

У наших експериментах частота регенерації пагонів зі стійких калюсних ліній коливалася в межах 5,5–9,5 %, що достовірно нижче, ніж у контролі всіх генотипів. Варто підкреслити, що за проведення ступінчастого добору в отриманих осмотостійких клітинних ліній досліджуваних форм частота регенерації пагонів і, як наслідок, кількість індукованих регенерантів були трохи вищими, ніж за прямого. Формування рослин-регенерантів із калюсів відбувалося двома шляхами: 1) соматичний ембріодогенез – процес розвитку зародкоподібної біполярної структури (ембріюда), що утворюється асексуально зі соматичних клітин; 2) геморизогенез – одночасний розвиток пагонів і коренів (рис. 2).

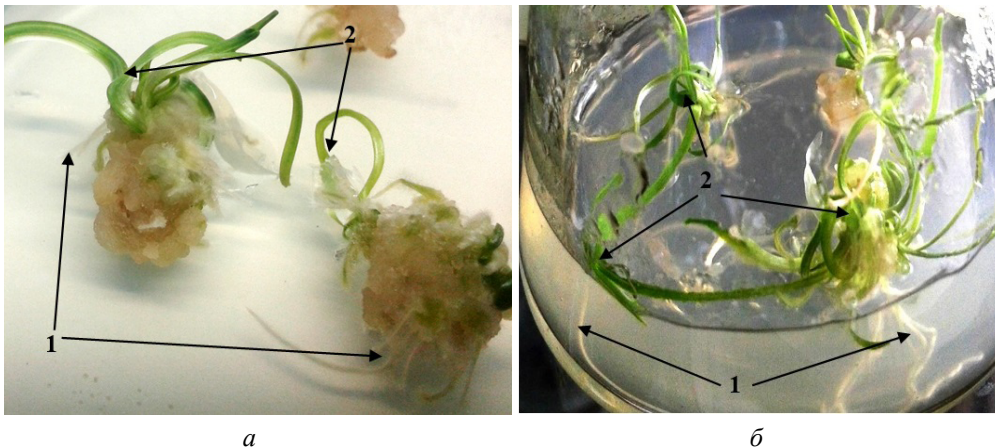


Рис. 2. Шляхи формування рослин-регенерантів лінії Еритроспермум 60068 пшениці м'якої озимої у культурі *in vitro* (живильне середовище МС + 1 мг/л БАП + 0,5 мг/л ІОК; температура культивування 26 °С): а – прямий органогенез за типом геморизогенезу ; б – соматичний ембріодогенез. Тут і далі: 1 – утворення коренів; 2 – утворення пагонів

Відомо, що соматичний ембріодогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки в даному разі формування рослини починається із проростання зародка, який має всі сформовані органи [1].

За результатами досліджень у пшениці м'якої озимої та ярої і тритикале озимого було виділено по 2 стійкі калюсні лінії, які мали високий рівень виживання на селективних середовищах з 0,6 М маніту і зберігали морфогенетичний потенціал. Зі стійких калюсних ліній отримано рослини-регенеранти, які в подальшому аналізували на стійкість до осмотичного стресу.

Оскільки стійкість до водного дефіциту визначається на клітинному рівні, то індуковані зі стійких тканин рослини також можуть виявляти дану ознаку. Однак отримана

у процесі клітинної селекції стійкість може мати як генетичну, так і епігенетичну природу [29]. Тому через гетерогенність калюсів, яку вони частково зберігають навіть після тривалого культивування на селективних середовищах, початок рослини-регенеранту може дати й нестійка клітина [14, 29]. У зв'язку з цим необхідно проводити аналіз толерантності отриманих рослин-регенерантів до стресу. Надійно оцінити стійкість рослини до того чи іншого стресора можна, аналізуючи її ріст за умов штучно змодельованого стресового чинника. Тому наступним етапом дослідження став аналіз рівня осмостійкості рослин-регенерантів, отриманих шляхом селекції *in vitro*. Аналіз рівня стійкості до водного дефіциту в одержаних рослин проводили, використовуючи розроблену нами систему пересадок на живильні середовища зі стресовим чинником і без нього. Виявлено, що після трьох пасажів культивування зберігали нормальний ріст від 61,5 до 72,7 % рослин, що може свідчити про наявність у них генетично обумовленої ознаки стійкості до стресора (табл. 3).

Таблиця 3

Кількість регенерантів зі стійкістю до водного дефіциту після перевірки на стабільність ознаки

Генотип (культура)	Калюсна лінія	Кількість висаджених рослин, шт.	Зберігали нормальний ріст після 3-х пасажів	
			шт.	%
Еритроспермум 60068 (пшениця м'яка озима)	Контроль	25	0	0
	60068/1	9	6	66,7
	60068/2	14	9	64,3
Елегія миронівська / Краса Полісся (пшениця м'яка яра)	Контроль	22	0	0
	1031/1	10	6	60,0
	1031/2	13	8	61,5
КС 6 (триликале озиме)	Контроль	27	0	0
	6/1	11	8	72,7
	6/2	16	11	68,8

Слід зазначити, що не всі отримані рослини виявилися стійкими, а це нерідко спостерігали й інші автори. Так, у роботі М. Зінченко [7] показано, що під час селекції *in vitro* пшениці м'якої на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту із 96 отриманих регенерантів лише 59 (61,5 %) були стійкими. В. Ступко зі співавторами [16] встановили, що зі 7 зразків пшениці м'якої ярої, відібраних на селективному середовищі з NaCl, лише 4 (57,1 %) продемонстрували значну стійкість до високої концентрації солі. Бельгійські дослідники [26] виявили, що серед 30 регенерантів твердої пшениці, отриманих шляхом селекції *in vitro* на посухостійкість, лише 13 (43,3 %) рослин були перспективними для подальшої селекційної роботи. У всіх перелічених вище роботах автори підкреслюють, що певна частина калюсних ліній, які пройшли весь цикл добору, не виявила стійкості на рівні цілих рослин. Деякі вчені подібне явище пояснюють тим, що стійкість на клітинному рівні часто може мати епігенетичну природу [17, 29].

Порівнюючи генотипи досліджуваних культур за рівнем осмотолерантності між собою, варто звернути увагу на те, що у триликале за результатами обох методів добору отримано найвищу частку живих калюсів і, як наслідок, найбільшу кількість стійких регенерантів. О. Рибалка зі співавторами [13] серед решти ключових переваг триликале над пшеницею відзначають також підвищену його стійкість до стресових чинників довкілля, зокрема, до посухи. Ці висновки цілком підтверджені результатами польових випробувань у селекційному розсаднику МПП [19]. Отримані дані конкурсного сорто випробування дають підстави стверджувати, що триликале має досить високий потенціал зернової

продуктивності та підвищену адаптивність до несприятливих умов вирощування. Поряд із цим, погіршення екологічної ситуації викликає нагальну необхідність поліпшити стійкість цієї культури до низки абіотичних факторів, що дасть змогу розширити його посіви в районах із несприятливими кліматичними умовами.

Після перевірки на стійкість до водного дефіциту рослини-регенеранти вирощували в умовах вегетаційного будиночка до стадії повної стиглості зерна, після чого було отримано насіння R₁. Щоб з'ясувати генетичну природу стійкості, подальші дослідження отриманого матеріалу будуть спрямовані на аналіз збереження ознаки у насінневих поколіннях із використанням фізіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних методів.

Таким чином, з використанням селективної системи з низькомолекулярним манітом проведено пряму і ступінчасту селекцію *in vitro*, здійснено добір калюсних ліній пшениці та тритикале, стійких до осмотичного стресу. Ступінчастий добір виявився ефективнішим, оскільки в результаті його застосування виділено більше стійких калюсних форм. Зі стійких культур індуковано рослини-регенеранти й оптимізовано їхнє дорощування, укорінення та переведення в умови *in vivo*. Оцінка рослин-регенерантів пшениці та тритикале, отриманих зі стійких калюсних ліній, виявила підвищений рівень толерантності до водного дефіциту. Стійкість до осмотичного стресу виділених *in vitro* клітин збереглася в індукованих рослинах і на організмовому рівні забезпечила підвищення толерантності до водного дефіциту. Показано, що лінія КС 6 тритикале озимого менш чутлива до водного стресу порівняно з іншими досліджуваними генотипами. Отримані стійкі до осмотичного стресу соматоклональні варіанти є цінним селекційним матеріалом і будуть залучені до створення нових сортів інтенсивного типу зернових колосових культур.

Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи «Генетичні засади якісних та кількісних господарсько-цінних ознак, розробка сучасних біотехнологій створення та оцінки вихідного матеріалу і підвищення ефективності методів поліпшення генотипів рослин» («Біотехнологія і генетика в рослинництві»), номер держреєстрації № 0116U004006.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Батыгина Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 6. С. 888–898.
2. Генерозова И. П., Маевская С. Н., Шугаев А. Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 1. С. 45–52.
3. 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.
4. Дубровна О. В., Моргун Б. В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 463–476.
5. Дубровная О. В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам // Физиология растений и генетика. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
6. Ерещенко О. В., Хлебова Л. П. Клеточная селекция яровой твердой пшеницы на устойчивость к дефициту влаги // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VIII Всерос. науч-практ. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых с междунар. участием (Бийск, 20–22 мая 2015 г.). Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. С. 232–236.
7. Зінченко М. О. Клітинна селекція м'якої пшениці на стійкість до комплексу стресових чинників: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15. К., 2014. 200 с.

8. Пикало С. В., Демидов О. А., Прокопик Н. І. та ін. Скринінг *in vitro* гібридів F₂ пшениці ярої на стійкість до водного дефіциту // ScienceRise: Biological Science. 2018. № 3(12). С. 12–18.
9. Пикало С. В., Зінченко М. А., 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. Т. 12. № 2. С. 191–199.
10. Пикало С. В., Прокопик Н. І., Юрченко Т. В. Морфогенез гібридів F₂ пшениці ярої в культурі апікальних меристем пагонів // Біотехнологія – інноваційний шлях розвитку селекції рослин: тези доповідей Міжнар. наук. конф. (Одеса, 8–10 жовтня 2018 р.). Одеса: Астропринт, 2018. С. 37–38.
11. Пикало С. Калюсогенез та регенерація рослин тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2015. Вип. 69. С. 20–26.
12. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46. № 1. С. 3–18.
13. Рибалка О. І., Моргун В. В., Моргун Б. В., Починок В. М. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале // Физиология растений и генетика. 2015. Т. 47. № 2. С. 95–111.
14. Соловых Н. В. Диагностика солеустойчивости растений рода *Rubus* биотехнологическим методом // Вестн. МичГАУ. 2010. № 1. С. 68–72.
15. Солодушко М. М. Продуктивність озимих та ярих зернових колосових культур в Степу України // Бюл. Ін-ту сільського господарства степової зони. 2013. № 4. С. 18–22.
16. Ступко В. Ю., Луговцова С. Ю., Зобова Н. В. Полевая оценка результативности создания *in vitro* стрессоустойчивых форм ячменя и пшеницы // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 6. С. 11–14.
17. Тищенко Е. Н., Дубровная О. В. Эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК генов и трансгенов растений. К.: Логос, 2004. 232 с.
18. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 379 с.
19. Харченко М. В. Адаптивність сортів тритикале озимого в умовах Лісостепу України // Миронівський вісник. 2016. Vol. 2. P. 129–140.
20. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // In Vitro Cell. Develop. Biol.–Plant. 2002. Vol. 38. N 2. P. 163–167.
21. Ahmed A. Response of immature embryos *in vitro* regeneration of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol // J. Agric. Sci. 1999. Vol. 30. N 3. P. 25–34.
22. Al-Jobori K. M., Al-Tamemy L. H. N. Selection for drought tolerance genotypes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under *in vitro* conditions based on molecular approaches // Biochem. Cell. Arch. 2018. Vol. 18. N 1. P. 181–188.
23. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2005. Vol. 24. N 1. P. 23–58.
24. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? // Austr. J. Agricult. Res. 2005. Vol. 56. N 11. P. 1159–1168.
25. Farshadfar E., Amiri R. *In vitro* application of integrated selection index for screening drought tolerant genotypes in common wheat // Acta agriculturae Slovenica. 2016. Vol. 107. N 2. P. 335–344.
26. Hsissou D., Bouharmont J. *In vitro* selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Agronomie. 1994. Vol. 14. N 2. P. 65–70.

27. *Lestari E. G.* *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance // *Biodiversitas*. 2006. Vol. 7. N 3. P. 297–301.
28. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.
29. *Rai M. K., Kalia R. K., Singh R.* et al. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress // *Environ. Exper. Bot*. 2011. Vol. 71. N 1. P. 89–98.
30. *Wang X., Xu Y., Li J.* et al. Identification of two novel wheat drought tolerance-related proteins by comparative proteomic analysis combined with virus-induced gene silencing // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. Vol. 19. N 12. P. 4020.
31. *Zhang S., Zhang H., Zhang M. B.* Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol*. 1996. Vol. 148. N 6. P. 667–671.

Стаття: надійшла до редакції 28.11.18

доопрацьована 20.02.19

прийнята до друку 26.03.19

IN VITRO SELECTION OF WHEAT AND TRITICALE FOR TOLERANCE TO WATER DEFICIT

**S. Pykalo*, O. Demydov, N. Prokopik, S. Voloshchuk, M. Kharchenko,
T. Yurchenko, S. Khomenko, O. Humeniuk**

*The V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, NAAS of Ukraine
Tsentralne, Myronivka district, Kyiv region 08853, Ukraine
e-mail: pykserg@ukr.net*

The *in vitro* selection with application of selective system based on low molecular mannitol and the selection of callus lines of winter and spring bread wheat and winter triticale being resistant to simulated water deficit were carried out. In the presented work to obtain resistant to osmotic stress forms methods of plant tissue culture, direct and gradual *in vitro* selection, statistical evaluation were used. Among all genotypes studied a two resistant callus lines were identified that had a high survival rate on the selective medium with 0.6 M mannitol and maintained morphogenetic potential. A gradual *in vitro* selection was more effective, because resulted by the selection more resistant callus forms were identified and more plant regenerants were obtained. Plant regenerants from the resistant lines were induced and their rearing, rooting and transfer to *in vivo* conditions were optimized. The formation of plant regenerants from calli took place through both gemmorrhizogenesis and somatic embryogenesis. Evaluation of wheat and triticale plant regenerants obtained from resistant calli showed increased level of their tolerance to water deficit. Tolerance to osmotic stress of isolated *in vitro* cells was survived in plant regenerants, this resulted in increasing tolerance to water deficit at whole plant level. The research results may indicate that the wheat and triticale plant regenerants obtained by *in vitro* selection have a genetically determined trait of resistance to stress factor. The developed method of *in vitro* selection of wheat and triticale genotypes for tolerance to water deficit can be used in further research as elements of biotechnological and breeding programs. In general, 48 osmotic stress-tolerant somaclonal variants were obtained by cell selection, including 15 plantlets of winter bread wheat, 14 plantlets of spring bread wheat and 19 plantlets of winter triticale, which is valuable breeding material and will be involved in the creation of new cereal varieties of intensive type.

Keywords: wheat, triticale, in vitro selection, plant regenerants, osmotic stress