УДК 633.11:57.085.23
DOI https://doi.org/10.32846/2306-9716/2021.eco.3-36.15

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР НА СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ У МИРОНІВСЬКОМУ ІНСТИТУТІ ПШЕНИЦІ ІМЕНІ В. М. РЕМЕСЛА

Пикало С.В., Демидов О.А., Юрченко Т.В., Рибка К.М., Харченко М.В., Прокопік Н.І.
Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла
Національної академії аграрних наук України
вул. Центральна, 2, 08853, с. Центральне, Київська область
pykserg@ukr.net

Зерновий сектор є основною складовою частиною сільськогосподарського виробництва в Україні. Вирощування високих урожаїв зернових культур і підвищення їхніх валових зборів – пріоритетний напрям у розвитку вітчизняного сільського господарства. Абіотичні чинники середовища суттєво знижують продуктивність зернових культур. Створення стійких сортів, здатних забезпечувати високу і стабільну продуктивність за екстремальних умов довкілля, набуває особливої актуальності. Одним з інноваційних напрямів, що дає змогу розширити спектр вихідного матеріалу й активізувати селекційний процес, спрямований на створення високопродуктивних стійких сортів, є клітинна селекція. Селекція *in vitro* надає можливість розширити генетичне різноманіття рослин, безпосередньо діючи на генетичний апарат, та створити системи прямого добору стійких генотипів. У представленому огляді наведено результати експериментальних досліджень щодо клітинної селекції пшениці та тритикале на стійкість до абіотичних стресів (водний дефіцит, засолення, низькі температури, забруднення іонами алюмінію) у Миронівському інституті пшениці імені В.М. Ремесла. Окреслено основні напрями, методи добору та оцінювання, а також можливості, перспективи і проблеми важливого напряму біотехнології рослин. Методом клітинної селекції в інституті створено низку стійких ліній зернових культур, більшість з яких залучено в селекційний процес створення високопродуктивних конкурентоспроможних сортів із високим адаптивним потенціалом. Незважаючи на значні досягнення у використанні клітинних технологій, потребує вирішення низка методичних проблем, які перешкоджають упровадженню біотехнологічних розробок у практику. Подальший прогрес у клітинній селекції залежить не лише від розвитку клітинних технологій, а й більш глибокого пізнання молекулярних механізмів регуляції та експресії генів стійкості. Вивчення особливостей та механізмів геномної мінливості *in vitro* зернових культур за дії абіотичних стресорів та пошуки шляхів її регуляції дадуть змогу більш ефективно використовувати технологію клітинної селекції. *Ключові слова:* зернові культури, клітинна селекція, водний дефіцит, засолення, низькі температури, іони алюмінію, стійкість.

***In vitro* selection of grain crops for tolerance to abiotic stressors at the V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat. Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T., Rybka K., Kharchenko M., Prokopik N.**

The grain sector is the main component of agricultural production in Ukraine. Growing high yields of grain crops and increasing their gross harvests is a priority in the development of domestic agriculture. Abiotic environmental factors significantly reduce the productivity of grain crops. The creation of resistant varieties that can provide high and stable performance in extreme environmental conditions is of particular relevance. *In vitro* selection is one of the innovative directions that allows expanding the range of starting material and intensifying the selection process aimed at creating highly productive tolerant varieties. *In vitro* selection makes it possible to expand the genetic diversity of plants by directly acting on the genetic apparatus and to create systems for the direct selection of tolerant genotypes. This review presents the results of experimental studies on the cell selection of wheat and triticale for tolerance to abiotic stresses (water deficit, salinity, low temperatures, contamination with aluminium ions) at the V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat. The main directions, methods of selection and assessment, as well as the possibilities, prospects and problems of an important area of plant biotechnology are determined. A number of tolerant lines of grain crops have been created at the institute by the method of cell selection, most of which are involved in the breeding process of creating highly productive competitive varieties with high adaptive potential. Despite significant advances in the use of cell technologies, a number of methodological problems need to be solved that prevent the introduction of biotechnological developments into practice. Further progress in cell selection depends not only on the development of cell technologies, but also on a deeper understanding of the molecular mechanisms of regulation and expression of tolerance genes. The study of the features and mechanisms of in vitro genomic variability of grain crops under the action of abiotic stressors and the search for ways of its regulation will make it possible to use the technology of cell selection more efficiently. *Key words:* cereals, *in vitro* selection, water deficit, salinity, low temperatures, aluminium ions, tolerance.

Постановка проблеми. Останніми роками наша країна стала одним з основних гравців на світовій арені в секторі виробництва сільськогосподарської продукції [1]. Серед сільськогосподарських культур, які вирощують у світі та нашій країні, зернові культури займають перше місце, тому вирощування високих урожаїв зернових і підвищення їхніх валових зборів – пріоритетний напрям у розвитку вітчизняного сільського господарства.

Пшениця є однією з головних зернових культур у світі, а тому займає перше місце у світі за посівними площами (близько 230 млн га) і валовим збором зерна (понад 766,4 млн т) [2]. Вона є однією з тих культур, що становлять основу харчового раціону людства та має високий споживчий попит, тому в разі нестачі на ринку їй дуже важко знайти відповідні замінники [3]. Поширеність цієї культури зумовлена її високою біологічною пластичні-

стю щодо екологічних умов і перш за все високою поживністю зерна, з якого отримують багато харчових продуктів [4; 5].

Тритикале – вперше цілеспрямовано й успішно створений людиною міжвидовий гібрид нової зернової культури. Тритикале набуває популярності у світі як культура кормового, харчового й технічного напрямів технологічного використання зерна [6]. Воно характеризується активним накопиченням листково-стеблової маси, тому може використовуватися на корм як у вигляді зеленої маси, силосу чи сінажу, так і у формі зерна [7].

Збільшення врожайності є найважливішим критерієм у вирощуванні будь-яких сільськогосподарських культур. Варто зазначити, що сучасна динаміка підвищення врожайності зернових не відповідає необхідним ритмам для задоволення потреб населення [8]. Генетичний потенціал вітчизняних сортів зернових злаків знаходиться в межах 11–14 т/га, проте у виробничих умовах реалізується лише 45% [9]. Існує багато чинників, що не дають можливості повною мірою втілити детермінований спадковий потенціал сортів. Несприятливі погодні умови протягом вегетаційного періоду часто призводять до зниження врожайності як озимих, так і ярих культур, що, як наслідок, призводить до недоотримання валових зборів зернової продукції [10]. Унаслідок глобальних кліматичних змін, збільшення площ зрошуваних земель на території України, що спричиняє вторинне засолення ґрунтів, неконтрольованого внесення мінеральних добрив, а також діяльності підприємств металургійної та хімічної промисловості виникає нагальна потреба створення сортів зернових культур, стійких до абіотичних чинників середовища.

Актуальність дослідження. Численні дослідження [11–13] свідчать, що стійкість зернових до стресових чинників довкілля є вкрай важливою ознакою і набуває особливої актуальності, адже дає можливість розширити посіви в регіонах із несприятливими кліматичними умовами. Несприятливі чинники щодо вирощування зернових культур в Україні висувають надзвичайно важливе завдання – створення нових сортів із потужним генетичним потенціалом високої продуктивності та адаптивності для отримання стабільних валових зборів зерна [14]. Для підвищення адаптивності слід збагачувати генофонд культурних рослин різними методами. Тому одним із пріоритетних напрямів генетики, селекції та біотехнології є створення сортів зернових культур, толерантних до шкідливого впливу таких екологічних чинників довкілля, як посуха, екстремальні температури, засолення, забруднення іонами токсичних металів тощо [15].

Слід зазначити, що добір генотипів на стійкість до абіотичних стресорів традиційними прийомами ускладнюється неможливістю створення відповідних екстремальних умов у польових дослідженнях. До того ж добір стійких рослин безпосередньо в полі є досить тривалим процесом та потребує відповідних умов середовища для фенотипового прояву ознаки, а тому передбачає залучення значних матеріальних ресурсів. Наприклад, часто буває важко або навіть неможливо створити два фони вирощування (оптимальний і стресовий), що необхідно для оцінки стійкості до будь-якого стресового чинника. Зважаючи на це, створення нових стійких сортів зернових культур на основі існуючих підходів класичної селекції сьогодні є досить непростим завданням.

Багатогранність проблеми стійкості рослин до стресових чинників потребує інноваційних ефективних підходів. Задля успішного розв'язання проблеми стійкості рослин до абіотичних факторів середовища необхідно впроваджувати ефективні інноваційні методи, які сприятимуть добору генотипів із цінними господарськими ознаками. Останнім часом усе більшої популярності набувають методи біотехнологій, які значно полегшують та прискорюють створення нових ліній і сортів зернових культур. Слід зауважити, що нині біотехнологічні підходи вважаються одними із сучасних прийомів у сільськогосподарській практиці [16; 17]. За свідченням багатьох авторів [16; 18; 19], біотехнології мають значний вплив на генетичне вдосконалення рослин та зростання їх урожайності, а тому успішно застосовуються селекціонерами. Біотехнологічні методи скорочують тривалість селекційного процесу та збагачують генетичну мінливість, що є необхідним складником створення конкурентоспроможних сортів [20].

Виклад основного матеріалу. Одним із новітніх біотехнологічних підходів є клітинна селекція, яка значно прискорює процес створення нових сортів та ґрунтується на використанні культури тканин і клітин *in vitro* [17; 21; 22]. При цьому за умов *in vitro* можна створювати різні параметри, схожі з тими, де зростають цілі рослини, зокрема й екстремальні умови вирощування [23]. Окрім того, стійкі генотипи можна ідентифікувати шляхом порівняння росту індукованих калюсів на селективному середовищі за присутності і відсутності стресового агента. За використання клітинної селекції надається можливість одержання нових генотипів зі змінами відповідних метаболічних процесів, які забезпечують адаптацію рослин до екстремальних умов середовища [24].

Клітинна селекція є одним із ключових напрямів сучасної біотехнології, який одержав широке практичне застосування як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і сомаклональних варіацій [18; 25]. Цей метод уважається розвитком мутаційної селекції і реалізується на рівні клітин із застосуванням техніки *in vitro*. Хоча це й надає більш широкі можливості, однак створює певні труднощі в силу необхідності регенерації з окремих клітин повноцінних рослин [17; 21].

Технології клітинної селекції злакових культур базуються на загальних механізмах стійкості для ізольованих клітин та цілих рослин [19; 20]. Нині

селективні системи стосовно добору генотипів, стійких до несприятливих чинників довкілля, розроблені для багатьох зернових культур, однак у літературі практично неможливо знайти аналогічних схем клітинної селекції. Для створення ефективних біотехнологічних схем необхідно проводити підбір селективного фактора, умов культивування експлантів, дослідження послідовності й відтворення результатів на етапах добору.

Можливість одержання стійких рослин за клітинної селекції лежить в основі сомаклональної мінливості, мутагенної дії регуляторів росту поживного середовища, а також дією селективного агента [20; 22]. У злаків селекцію *in vitro* проводять переважно на калюсах, оскільки інші технології (культура протопластів, суспензії, пиляків, ізольованих мікроспор, ембріокультура) сьогодні ще недостатньо розроблені [21]. Порівняно з клітинними перевагами калюсних культур є коротший період необхідного культивування та менша генетична нестабільність [23; 24].

Одним із показників, що характеризують стійкість генотипів до модельованого стресу, є швидкість росту калюсних культур за селективних умов. Показано, що швидкість росту і морфогенез калюсів на різних етапах культивування можуть зазнавати суттєвих змін [17; 18]. Це пов'язано з тим, що одержання калюсів передбачає пристосування клітин до умов *in vitro*. Як наслідок цього, може змінюватися чутливість калюсів до модельованого *in vitro* стресу [24; 25].

До недоліків калюсних культур відносять те, що у певної частини клітин токсичні рівні селективного агента згладжуються сусідніми клітинами і тому вони уникають селективного тиску [17; 21]. Окрім того, існує можливість фенотипового маскування, тобто коли клітина має стійкість завдяки виробленню певної речовини, то ця речовина може передаватися крізь плазмодесми прилеглим чутливим клітинам і надавати їм стійкості. Оскільки переважна більшість клітин калюсів безпосередньо не контактує із селективним агентом, то відібрані калюси можуть являти собою суміш змінених клітин та клітин дикого типу [18; 23]. Саме тому варто застосовувати декілька циклів добору за прямої та ступінчастої клітинної селекції.

Хоча культура *in vitro* злакових уже тривалий час і використовується як об'єкт досліджень, та все ж нині рослини з триби *Gramineae* вважаються складними для біотехнологічних маніпуляцій. Однією з проблем, що обмежують використання техніки *in vitro* для злакових, є низька регенерація рослин із культивованих тканин. Серед важливих чинників, що впливають на результативність біотехнологічних робіт зі злаками, є вибір оптимального типу експлантат, адже досі не вирішена проблема його надійності, доступності будь-якої пори року та здатності до індукції калюсу з високим регенераційним потенціалом [26]. Зазвичай вибирається той тип експланта, який найбільш зручний для проведення експериментів і сприяє ефективному одержанню достовірних результатів. Нині питання стосовно біотехнологічно оптимального експланта й удосконалення способів реалізації його морфогенетичного потенціалу лишається актуальним. Як експланти для одержання калюсу із соматичних клітин використовують незрілі та зрілі зародки, молоді суцвіття та сегменти молодих листків [26; 27]. Зрілі зародки, які зручні для роботи протягом усього року, широко використовуються для отримання морфогенетично активних калюсних культур злакових [17].

Незрілі зародки є традиційним експлантом у зернових колосових культур. Це зумовлено його високою інтенсивністю проліферації і компетентністю всіх тканин зародка за культивування *in vitro*, що дає змогу виключити вплив зниження проліферативної функції клітин на результати експериментів [28]. Проте застосування такого типу експланта має деякі недоліки, до яких належать короткий період використання в культурі та значні затрати часу для отримання донорних рослин.

Останніми роками дослідники багатьох країн світу досить широко використовують апікальні меристеми конусів наростання пагонів. Перевагою цього експланту є можливість подолання генотипових особливостей форм, що характеризуються низькою регенераційною здатністю, можливість одержання суттєвої кількості вихідного матеріалу за короткий проміжок часу та його доступність будь-якої пори року [29; 30]. Культуру апікальних меристем широко застосовують як джерело калюсної тканини для проведення селекції *in vitro*, оскільки меристемні сегменти пагонів містять пул клітин, що активно діляться і характеризуються високою частотою індукції калюсу [31; 32].

Представлена нами у попередніх дослідженнях оптимізована система отримання повноцінних регенерантів пшениці [33; 34] та тритикале [35–38] в культурі апікальних меристем пагонів дала змогу успішно отримати достатню кількість рослин. Показано, що культуру апікальних меристем пагонів можна використовувати як тест-систему для проведення скринінгу генотипів пшениці та тритикале на стійкість до водного дефіциту [39–41] і засолення [42].

Окрім того, ефективність регенерації рослин із різних типів експлантів залежить від того, на якій стадії розвитку (оптимальній або неоптимальній) вони були відібрані для отримання первинних калюсів. Оскільки зазвичай орієнтиром у подібних випадках служить розмір експланта, то ефективність регенерації може варіювати від експерименту до експерименту [27].

Слід зауважити, що отримання калюсів і подальша регенерація з них рослин є невід'ємними складниками багатьох рослинних біотехнологій. У роботі М.І. Соболєвої та І.В. Логінова [43] здійснено спробу визначити залежність морфогенної здатності клітинних культур пшениці м'якої ярої

від різних чинників. Як зазначають автори, тотипотентність і проліферація тісно пов'язані між собою єдиним молекулярним механізмом, вимикання або порушення якого призводить у культурі *in vitro* до формування неморфогенного калюсу. Н.М. Круглова і А.А. Катасонова [44] під час культивування *in vitro* зародків м'якої пшениці виявили, що основною умовою формування морфогенних калюсів є інокуляція експлантів із рослин на певній стадії органогенезу, яка характеризується певним цитогістологічним статусом зародка. Уведення ж експлантів у культуру *in vitro* на більш ранній або пізній стадії призводило до індукції неморфогенних калюсів. Дослідники підсумували, що потенціал зародка пшениці стосовно реалізації калюсогенезу є значно ширшим, аніж його морфогенетична здатність.

У контексті реалізації біотехнологічних та генетико-селекційних програм учені-селекціонери Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МІП) методом клітинної селекції одержали стійкі сомаклональні лінії зернових культур, більшість з яких уже залучено в селекційний процес щодо створення високопродуктивних конкурентоспроможних сортів із високим адаптивним потенціалом. Науковці МІП провели значний обсяг робіт щодо оцінки та добору *in vitro* генотипів зернових культур на стійкість до абіотичних стресів: посухи, засолення, низьких температур, забруднення іонами алюмінію.

1. Клітинна селекція на посухостійкість. Водний дефіцит, викликаний посухою, серед природних чинників найбільш згубно впливає на всі фізіологічні процеси росту і розвитку рослин та спричиняє суттєву втрату врожаю [45]. Шкідлива дія посухи полягає у зневодненні рослин і порушенні метаболічних процесів у них. Це, своєю чергою, призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і зниження кількості накопиченої рослинами органічної речовини [46]. Стрес, викликаний посухою, є причиною прямих або непрямих пошкоджень рослин, що зумовлені інактивацією ферментів, порушенням біохімічних процесів, накопиченням токсичних речовин, витоком іонів, дефіцитом живлення та іншими причинами [47]. Очікується, що з прогресуючим глобальним потеплінням періодичність посух із роками буде лише посилюватися [48].

На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється у толерантності клітин до присутності у поживному середовищі осмотично активних речовин. Для моделювання *in vitro* водного стресу використовують такі осмотики, як високомолекулярний поліетиленгліколь (ПЕГ) або низькомолекулярний маніт [49]. Слід підкреслити, що для отримання посухостійких рослин як селективного фактора переважно використовується ПЕГ. У силу своєї високої молекулярної маси ПЕГ не здатний проникати через мембрану клітини, аби змінити її водний потенціал [50]. Механізм імітації ним умов водного дефіциту у культивованих клітинах схожий із тим, що наявний у клітинах цілих рослин за посушливих умов [51]. Значно рідше під час добору та оцінки *in vitro* стійких до водного стресу генотипів використовують маніт [52]. Варто зауважити, що порівняно з непроникаючим ПЕГ маніт проникає у клітину рослини та знижує нормальний водний потенціал, спричиняючи зневоднення та гальмування фізіологічних та метаболічних процесів [53; 54].

Для проведення селекції *in vitro* зернових колосових культур (пшениці м'якої озимої, пшениці м'якої та твердої ярої, тритикале озимого) на стійкість до водного дефіциту співробітниками МІП було здійснено підбір летальних та сублетальних концентрацій маніту [55; 56]. Згідно з результатами досліджень, концентрація маніту 0,8 М виявилася летальною для переважної більшості зразків, а 0,6 М – сублетальною. Використовуючи селективну систему з манітом, було проведено пряму та ступінчасту клітинну селекцію та здійснено добір стійких до водного стресу калюсів [57]. Ступінчаста селекція *in vitro* виявилася ефективнішою, оскільки в результаті її застосування одержано більше число стійких калюсних ліній і отримано більше рослин-регенерантів. Також виділено стійкі калюсні лінії, що мали високий рівень виживання на селективному середовищі з умістом 0,6 М маніту та зберігали морфогенетичний потенціал. Зі стійких культур отримано рослини-регенеранти, оптимізовано їх дорощування, укорінення, а також переведення до умов *in vivo*. Оцінка рослин-регенерантів зернових культур, отриманих зі стійких калюсів, виявила в них підвищений рівень стійкості до посухи. З індукованих регенерантів одержано насіннєве потомство R_1 та підтверджено його стійкість до модельованого водного дефіциту. Виділено регенеранти зі значною стрес-толерантністю, що може свідчити про утворення генного комплексу, відповідального за підвищення стійкості біотехнологічним шляхом.

Таким чином, експериментально обґрунтовано та підтверджено можливість методом клітинної селекції одержання посухостійких рослин зернових культур. Також установлено низку стрес-індукованих змін у геномі, які проявилися на цитологічному та молекулярно-генетичному рівнях [58; 59].

2. Клітинна селекція на солестійкість. Засолення ґрунтів, що пов'язане з надлишковою концентрацією розчинних солей натрію в орному шарі ґрунту, завдає аграрному виробництву непоправної шкоди. Сьогодні через безсистемні та безконтрольні меліоративні заходи значна площа земель піддається згубному впливу сольового стресу. Шкідлива дія засолення зумовлена порушенням осмотичного балансу клітин, а також прямим токсичним ефектом на фізіологічні та біохімічні процеси у клітині [60]. Створення сортів із високим потенціалом продуктивності, які можуть реалізувати його незалежно від лімітів середовища, є основним засобом розв'язання цієї проблеми.

Для отримання солестійких ліній основних зернових культур шляхом клітинної селекції як селективного агента найчастіше застосовують хлорид натрію. Науковці МІП спільно зі співробітниками Інституту фізіології рослин і генетики НАН України методом прямого добору провели скринінг *in vitro* генотипів тритикале озимого на стійкість до засолення за виживанням калюсів на селективних середовищах із хлористим натрієм у концентраціях 0,6; 0,9; 1,2 та 1,5% [42]. Показано, що зі зростанням концентрації стресового чинника помітно гальмувався ріст калюсів, що вказує на токсичний ефект хлористого натрію. У результаті виділено генотипи, калюси яких мали здатність рости на селективному середовищі з хлоридом натрію протягом усього циклу культивування. Згодом підвищену солестійкість виділених генотипів було також підтверджено у польових умовах.

Результати проведеної роботи підтвердили необхідність використання техніки *in vitro* як тест-системи для скринінгу зразків на стійкість до сольового стресу. У подальшому на основі розробленої біотехнологічної системи шляхом селекції *in vitro* за використання хлористого натрію здійснено добір калюсних ліній тритикале на солестійкість [61; 62]. Використовуючи прямий та ступінчастий добір, було отримано стійкі калюсні лінії, які мали приріст біомаси на селективному середовищі та зберігали високий морфогенетичний потенціал. Стійкість виділених калюсів збереглася у одержаних рослинах і на рівні цілого організму забезпечила підвищення толерантності до сольового стресу. Результати засвідчили, що отримані шляхом клітинної селекції регенеранти мають генетично зумовлену стійкість до стресового чинника.

Слід зазначити, що використання культури ізольованих мікроспор має низку переваг порівняно з іншими системами *in vitro*, оскільки вона від самого початку є одноклітинною системою, унаслідок чого зникає можливість регенерації рослин із соматичних тканин [63]. При цьому добір *in vitro* суттєво полегшений, адже гаплоїдний стан дає змогу проявитися рецесивним генам. Тому співробітники МІП розробили метод добору солестійких генотипів пшениці та тритикале в культурі ізольованих мікроспор із використанням хлористого натрію як стресового агента [64; 65]. Як критерій визначення стійкості було використано такий показник, як відносна кількість калюсів із множинним пагоноутворенням. Установлено, що зі зростанням дози хлориду натрію значно знижувався регенераційний потенціал калюсів. У результаті виявлено, що хлористий натрій у дозі 0,1 М (0,6%) дає змогу диференціювати генотипи зернових за солестійкістю, та доведено можливість використання культури ізольованих мікроспор для вивчення солестійкості селекційного матеріалу.

3. Клітинна селекція на стійкість до низьких температур. Морозостійкість – це здатність рослин переносити без незворотних шкідливих наслідків низькі температури. Незадовільний стан посівів озимих культур переконує у нагальній потребі проведення агротехнічних і селекційних досліджень у напрямі підвищення морозостійкості рослин [66], тому ця ознака є одним із необхідних складників адаптивності сортів пшениці озимої [13]. Відмінності між сортами та гібридами щодо рівня морозостійкості можуть змінюватися у різних країнах відповідно до змін кліматичних умов. Під час створення сортів цієї культури однією з найважливіших властивостей рослин, що потребує уваги на всіх етапах селекційної роботи, є здатність протистояти несприятливим умовам зимівлі, зокрема стійкість до низької температури та до її коливань протягом зимового періоду [67; 68].

У лабораторії МІП із використанням модельного набору сортів пшениці озимої було здійснено проморожування калюсних культур у температурному діапазоні від –8° до –24°С [69]. Науковцями встановлено, що температура –8°С спричиняла зменшення приросту біомаси калюсів, не пригнічуючи регенераційної здатності. Оптимальною для більшості калюсних культур виявилася температура –12°С, а –16°С – летальною. Разом із тим, незважаючи на отримані результати, диференціювати генотипи за ознакою морозостійкості авторам так і не вдалося.

У тому, що за умов *in vitro* складно проводити добір селекційного матеріалу зернових на морозостійкість, Л. Сергєєва зі співавторами [70] вбачають три причини: 1) система *in vitro* перешкоджає прямому контакту клітин із холодним повітрям; 2) теплоємність агару істотно знижує стресове навантаження; 3) якісний склад поживного середовища підтримує життєздатність культури. У результаті відзначено незбереження ознаки в нащадків, тому виявити рівень морозостійкості та виділити стійкі генотипи можливо лише після прямої стресової дії на інтактну рослину, що коректно проводиться виключно за умов *in vivo*.

4. Клітинна селекція на стійкість до забруднення іонами алюмінію. Більше половини ґрунтів у світовому землеробстві мають підвищену кислотність, негативний вплив якої на рослини здебільшого посилюється внаслідок наявності рухомих іонів алюмінію [71]. Токсичні іони алюмінію позначаються на процесах росту та продуктивності впродовж усіх етапів онтогенезу рослин злакових, однак протягом ювенільного періоду більший вплив вони мають на розвиток кореневої системи, ніж паростка [72]. Відомо, що за вмісту рухомого алюмінію 3–4 мг/100 г ґрунту пригнічується ріст рослин, а за концентрації 7–8 мг/100 г ґрунту вони гинуть [73]. Тому створення сортів, здатних протидіяти токсичному впливу іонів алюмінію без зниження врожайності, можливо є єдиним розв’язанням проблеми вирощування рослин на кислих ґрунтах.

Як відомо, ізольовані рослинні клітини акумулюють алюміній набагато швидше й є більш чутливими до стресу, ніж клітини у складі цілого організму [74]. Тому для оцінки алюмостійкості рослин зернових поширення набули біотехнологічні підходи з використанням культури тканин *in vitro*, які застосовуються для скринінгу стійких генотипів, створення та ідентифікації сомаклональних варіантів із підвищеною стійкістю, а також для вивчення реакції клітин на токсичність іонів алюмінію. При цьому стійкі форми можна ідентифікувати шляхом порівняння росту калюсів на кислому середовищі за присутності і відсутності іонів алюмінію.

У відділі біотехнології, генетики і фізіології МІП розроблено та запатентовано [75] спосіб добору *in vitro,* стійких до іонів алюмінію генотипів тритикале, що ґрунтується на токсичній дії стресового чинника, спрямованій проти виживання нестійких форм. При цьому добори генотипів проводять на калюсах, культивуючи їх на штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій етилендіамінтетраацетату алюмінію. Використання запропонованого способу дає можливість упродовж коротких термінів відібрати значну кількість алюмостійких генотипів тритикале і, як наслідок, забезпечує скорочення тривалості селекційного процесу. Новим є те, що добори генотипів на алюмостійкість проводять на калюсах, що культивуються на штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій етилендіамінтетраацетату алюмінію, за рівнем їх виживання в селективних умовах, приростом сирої маси та частотою регенерації з них пагонів. Метод ґрунтується на технологіях *in vitro*, тому дає змогу значно прискорити добір стійких до іонів алюмінію генотипів тритикале. Переваги запропонованого способу над традиційними полягають в економії місця, більшій швидкості скринінгу селекційного матеріалу, а також можливості працювати з великими вибірками генотипів та контролювати умови зовнішнього середовища.

Головні висновки. Таким чином, нами наведено результати експериментальних досліджень стосовно клітинної селекції основних зернових колосових культур у Миронівському інституті пшениці імені В.М. Ремесла НААН України. Шляхом клітинного добору отримано низку стійких сомаклональних ліній, які є цінним селекційним матеріалом і залучені до створення нових сортів. Варто підкреслити, що для практичного використання клітинних біотехнологій із метою оцінки та добору стійких генотипів злакових необхідно, щоб ступінь стійкості на рівні культури клітин і цілої рослини тісно корелював, чого не завжди можливо досягти. Цей напрям потребує також поглибленого дослідження геномної мінливості та генетичної стабільності клітин, що культивуються в умовах ізольованого росту на штучних поживних середовищах. Окрім того, скринінг та добір селекційного матеріалу злакових на клітинному рівні не завжди виправдані та ефективні з економічного погляду. Разом із тим використання тканинних і клітинних культур здебільшого дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і у багатьох країнах світу вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин.

Література

1. Голомша Н.Є., Дзядикевич О.Я. Перспективи світового ринку зерна. *Економіка АПК*. 2016. № 8. С. 49–52.
2. FAO. Crop Prospects and Food Situation – Quarterly Global Report. № 4. December 2019. Rome. 46 p. URL: http://www.fao.org/3/ca7236en/ca7236en.pdf.
3. Результати селекції пшениці озимої на стійкість проти основних збудників хвороб в Миронівському Інституті пшениці / Г.М. Ковалишина та ін. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія «Агрономія»*. 2018. № 294. С. 96–103.
4. Черенков А.В., Гасанова І.І., Солодушко М.М. Пшениця озима – розвиток та селекція культури в історичному аспекті. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2014. № 6. С. 3–6.
5. Жемела Г.П., Кузнецова О.А. Вплив сортових властивостей на продуктивність та якість зерна пшениці м’якої озимої. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2012. № 3. С. 23–25.
6. Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *Journal of Agricultural Science* 2005. Vol. 143. № 5. P. 329–346.
7. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале / О.І. Рибалка та ін. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47. № 2. С. 95–111.
8. Гринчук Т. Підходи до аналізу сучасного стану зерновиробництва у сільськогосподарських підприємствах регіону та факторів, які впливають на його розвиток. *Науковий вісник Одеського національного економічного університету*. 2015. № 9. С. 48–60.
9. Реалізація потенціалу сортів зернових культур – шлях вирішення продовольчої проблеми / С.П. Васильківський та ін. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2017. Т. 21. С. 47–51.
10. Авдеев Ю.И., Слащева Л.А. Устойчивость озимой тритикале к экстремальным абиотическим факторам среды в аридной зоне возделывания. *Астраханский вестник экологического образования.* 2014. Т. 29. № 3. С. 84–87.
11. Орловская О.А. Хотылева Л.В. Оценка устойчивости к биотическим и абиотическим факторам гибридов озимой тритикале, созданных на основе образцов различного эколого-географического происхождения. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2013. Т. 14. С. 77–83.
12. Blum A. The abiotic stress response and adaptation of triticale – a review. *Cereal Research Communications* 2014. Vol. 42, Iss. 3. P. 359–375.

13. Вплив змін клімату на особливості морфологічного аналізу при оцінці стану перезимівлі пшениці м'якої озимої / О.М. Кучеренко та ін. *Селекція і насінництво*. 2013. Вип. 103. С. 107–114.
14. Дубовик Н.С., Кириленко В.В., Дергачов О.Л. Вихідний матеріал для селекції пшениці м'якої озимої за пластичністю та стабільністю. *Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області*. 2015. Вип. 18. С. 132–138.
15. Сорти пшениці м'якої озимої, стійкі до впливу негативних чинників довкілля / Н.В. Булавка та ін. *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*. 2018. Т. 14. № 3. С. 255–261.
16. 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.
17. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.
18. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика.* 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
19. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany.* 2011. Vol. 71. № 1. P. 89–98.
20. Lestari E.G. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*. 2006. Vol. 7, Iss. 3. P. 297–301.
21. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 6. С. 463–476.
22. Maluszynski M., Ahloowalia B. S., Sigurbjörnsson B. Application of in vivo and in vitromutation techniques for crop improvement. *Euphytica.* 1995. Vol. 85. № 1–3. P. 303–315.
23. Дубровная О.В. Селекция *in vitro* пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49. № 4. С. 279–292.
24. Зінченко М.О., Дубровна О.В., Бавол А.В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудника офіобольозу та водного дефіциту. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2012. Т. 10. № 1. С. 20–27.
25. Зинченко М.А., Дубровная О.В., Бавол А.В. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость к комплексу стрессовых факторов и анализ полученных форм. *Известия Самарского отделения РАН*. 2013. Т. 15. № 3(5). С. 1610–1614.
26. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2008. Т. 40. № 2. С. 150–156.
27. Пикало С.В., Волощук С.І., Волощук Г.Д. Регенерація рослин тритикале озимого в культурі різних типів експлантів. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія»*. 2015. Вип. 1(34). С. 71–79.
28. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетический компетентный эксплант. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 2. Р. 124–131.
29. Atak N., Muharemm K., Khavar K., Saglam S., Özcan S., Ciftci C.Y. Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes. *African Journal of. Biotechnology.* 2008. Vol. 7. № 11. P. 1765–1768.
30. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46. № 3. С. 245–251.
31. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2011. Т. 11. С. 237–241.
32. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5. №1/2. С. 3–10.
33. Морфогенетичні процеси в культурі апікальних меристем пагонів пшениці та їх взаємозв'язок / С.В. Пикало та ін. *Миронівський вісник*. 2019. Вип. 8. С. 59–72.
34. Регенераційний потенціал перспективних ліній пшениці м'якої озимої у культурі апікальних меристем пагонів / С.В. Пикало та ін. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 298–303.
35. Pykalo S.V., Zinchenko M.O., Voloshchuk S.I., Dubrovna O.V. Morphogenesis of winter triticale in shoot apical meristem culture. In Biotekhnologiya: dostizheniya i perspektivy razvitiya: materialy I Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii (Sept. 25–26, 2014). Pinsk, 2015. P. 29–34.
36. Пикало С. Калюсогенез та регенерація рослин тритикале озимого в культурі апікальних меристем пагонів. *Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна*. 2015. Вип. 69. С. 20–26.
37. Пыкало С.В. Биотехнология получения растений-регенерантов тритикале в культуре различных типов эксплантов. *Austrian Journal of Technical and Natural Sciences*. 2015. № 5–6. С. 34–39.
38. Регенераційна здатність тритикале в культурі апікальних меристем пагонів залежно від генотипу та віку експланта / С.В. Пикало та ін. *Миронівський вісник*. 2017. Вип. 4. С. 102–113.
39. Pykalo S.V., Zinchenko M.O., Voloshchuk S.I., Dubrovna O.V. Screening of winter triticale genotypes for resistance to water deficit in *in vitro* culture of shoot apical meristems. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2014. Vol. 12. № 2. P. 191–199.
40. Скринінг *in vitro* гібридів F_2 пшениці ярої на стійкість до водного дефіциту / С.В. Пикало та ін. *ScienceRise: Biological Science*. 2018. Вип. 3(12). С. 12–18.
41. Скринінг *in vitro* перспективних ліній пшениці м'якої озимої на стійкість до водного дефіциту / С.В. Пикало та ін. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 245–251.
42. Pykalo S.V., Dubrovna O.V. Screening of genotypes of winter triticale for resistance to saline stress in the shoot apical meristem culture. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2017. Vol. 13. № 3. P. 277–284.
43. Soboleva M.I., Loginov I.V. Statistical parameters reflecting morphogenetic capacity of soft spring wheat calluses. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 51. № 2. P. 257–265.
44. Круглова Н.Н., Катасонова А.А. Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. Т. 41. № 2. С. 124–131.

45. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research.* 2005. Vol. 56. № 11. P. 1159–1168.
46. Raveena, Bharti R., Chaudhary N. Drought resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 2019. Vol. 8. № 9. P. 1780–1792.
47. Mwadzingeni L., Shimelis H., Dube E., Laing M.D., Tsilo T.J. Breeding wheat for drought tolerance: Progress and technologies. *Journal of Integrative Agriculture.* 2016. Vol. 15. № 5. P. 935–943.
48. Makar O.O., Patsula O.I., Kavulych Y.Z., Batrashkina T.I., Bunio L.V., Kozlovskyy V.I., Vatamaniuk O., Terek O.O., Romanyuk N.D. Excized leaf water status as a measure of drought resistance of Ukrainian spring wheat. *Studia Biologica.* 2019. Vol. 13. № 2. P. 41–54.
49. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів / О.В. Дубровна та ін. Київ : Логос, 2012. 428 с.
50. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (Medicago sativa L.). *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 1996. Vol. 22. № 3–4. P. 30–39.
51. Gawande N.D., Mahurkar D.G., Rathod T.H., Jahagirdar S.W., Shinde S.M. In vitro screening of wheat genotypes for drought tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*. 2005. Vol. 19. № 2. P. 162–168.
52. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* / О.В. Дубровна та ін. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2011. Т. 9. № 1. С. 10–16.
53. 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.
54. Ahmed A. Response of immature embryos *in vitro* regeneration of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol. *Journal of Agricultural Science.* 1999. Vol. 30. № 3. P. 25–34.
55. Pykalo S.V. *In vitro* selection of genotypes of winter triticale for resistance to osmotic stress. In Dosiahnennia henetyky, selektsii i roslynnytstva dlia pidvyshchennia efektyvnosti zernovyrobnytstva: zbirnyk tez Mizhnar. naukovo-prakt. konf. molodykh vchenykh (June 18, 2014). Myronivka, 2014. P. 46.
56. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до водного дефіциту / С.В. Пикало та ін. *Biotechnologia Acta*. 2015. Т. 8. № 2. С. 69–77.
57. Селекція *in vitro* пшениці та тритикале на стійкість до водного дефіциту / С.В. Пикало та ін. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2019. Вип. 80. С. 21–30.
58. Bavol A.V., Velikozhon L.G., Pykalo S.V., Dubrovna O.V. IRAP-analysis of triticale plants regenerants, resistant to water deficit. *Factors in Experimental Evolution of Organisms.* 2016. Vol. 19. P. 73–78.
59. Pykalo S.V., Dubrovna O.V. Variability of the triticale genome in culture *in vitro*. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52. № 5. P. 385–393.
60. Richards R.A., Dennett C.W., Qualset C.O., Epstein E., Norlyn J.D., Winslow M.D. Variation in yield of grain and biomass in wheat, barley, and triticale in a salt-affected field. *Field Crops Research*. 1987. Vol. 15. № 3–4. P. 277–287.
61. Pykalo S.V., Dubrovna O.V., Demydov O.A. Cell selection of winter triticale for resistance to saline stress. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2017. Vol. 20. P. 247–251.
62. Пикало С.В., Дубровна О.В. Селекція *in vitro* тритикале озимого на стійкість до засолення та аналіз отриманих форм. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49. № 4. С. 312–320.
63. Волощук С.І. Індукований андрогенез у селекції тритикале озимого. *Вісник аграрної науки*. 2014. № 3. С. 36–40.
64. Пикало С.В., Волощук С.І. Вивчення стійкості до засолення генотипів тритикале озимого з використанням культури ізольованих мікроспор. *Физиология растений и генетика*. 2014. Т. 46. № 3. С. 267–273.
65. Пикало С.В., Волощук С.І., Кочмарський В.С. Використання андрогенних культур для оцінки стійкості тритикале озимого до абіотичних факторів середовища. *Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2013. Вип. 17. Т. 2. С. 334–340.
66. Моргун В.В., Логвиненко В.Ф. Селекція сортів озимої пшениці на високу зимо- та морозостійкість. Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. Київ, 2001. Т. 2. С. 204–211.
67. Пірич А.В. Морозостійкість нових сортів пшениці м'якої озимої миронівської селекції. *Миронівський вісник*. 2018. Вип. 7. С. 85–92.
68. Литвиненко М.А., Лифенко С.П. Вплив строків сівби і сублетальних зимових температур на виживаність та врожайність озимої пшениці. *Вісник аграрної науки*. 2004. № 5. С. 27–31.
69. Колючий В.Т., Власенко В.А., Борсук Г.Ю. Селекція, насінництво і технології вирощування зернових колосових культур у Лісостепу України. Аграрна наука : Київ, 2007. С. 226–258.
70. Сергєєва Л., Хоменко Л., Броннікова Л. Біотехнологія пшениці. Нові підходи до оцінювання морозистійкості генотипів пшениці озимої. *Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Серія «Біологічні науки»*. 2018. Т. 8. № 381. С. 23–27.
71. Barcelo J., Poschenrieder C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany.* 2002. Vol. 48. № 1. P. 75–92.
72. Dinev N., Stancheva I. Effect of aluminum on the growth of wheat, rye, and triticale. *Journal of Plant Nutrition.* 1993. Vol. 16. № 3. P. 461–469.
73. Zhang X.G., Jessop R.S. Differential responses to selection for aluminium stress tolerance in triticale. *Australian Journal of Agricultural Research.* 2002. Vol. 53. № 12. P. 1295–1303.
74. Conner A.J., Meredith C.P. Large scale selection of aluminum-resistant mutants from plant cell culture: expression and inheritance in seedlings. *Theoretical and Applied Genetics.* 1985. Vol. 71. № 2. P. 159–165.
75. Спосіб добору *in vitro* стійких до іонів алюмінію генотипів тритикале озимого: пат. 136957 Україна: МПК A01H 1/04. No 201901582; заявл. 18.02.2019; опубл. 25.09.2019, Бюл. № 18. 4 с.