

СКРИНІНГ *IN VITRO* СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ РІЗНОГО ЕКОЛОГО-ГЕОГРАФІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА СТІЙКІСТЬ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ

Пикало С.В., Демидов О.А., Юрченко Т.В., Харченко М.В., Рибка К.М.

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України
с. Центральне, Миронівський р-н, Київська обл. 08853, Україна
pykserg@ukr.net

Пшениця – провідна зернова культура в багатьох регіонах світу й один з основних продуктів харчування. Посуха є одним із найголовніших обмежуючих чинників довкілля, що знижують продуктивність рослин. Успіх селекції у створенні посухостійких форм пшениці багато в чому залежить від правильної оцінки ступеня їхньої стійкості. Поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінки стресостійкості рослин, біотехнологічні підходи набули значного поширення. Методом прямого добору проведено скринінг *in vitro* сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження на стійкість до водного дефіциту з використанням низькомолекулярного маніту в якості стрес-чинника. Досліджено процеси морфогенезу сортів пшениці в культурі апікальних меристем 3-добових проростків та встановлено, що у вивчених форм частота калюсогенезу та утворення морфогенного калюсу визначаються генотипом. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Виділено генотипи, які відрізнялись здатністю до росту на селективному середовищі з осмотично активною речовиною та зберігали ознаку стійкості протягом циклу культивування. Виявлено, що найбільшу стійкість до осмотичного стресу мали сорти пшениці м'якої озимої МІП Феєрія, Балада миронівська, МІП Валенсія, оскільки калюси цих генотипів за селективних умов відрізнялись підвищеним морфогенетичним потенціалом та мали найбільший рівень виживання. Сорти Самурай та Каталіус виявились найчутливішими до осмотичного стресу, так як у їх калюсів за селективних умов спостерігали масовий некроз. Генотипова реакція на осмотичний стрес у калюсній культурі сортів пшениці м'якої озимої виявлялась за різним рівнем виживання за дії стресового чинника. Культуру тканин *in vitro* можна використовувати як тест-систему для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного дефіциту. Отримані результати є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів посухостійкості пшениці та можуть застосовуватися як елементи селекційних програм. **Ключові слова:** пшениця м'яка озима, водний дефіцит, калюсна культура, маніт, стійкість.

***In vitro* screening of bread winter wheat varieties of different ecological and geographical origin for tolerance to water deficit.**

Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T., Kharchenko M., Rybka K.

Wheat is a leading cereal crop in many parts of the world and one of the staple foods. Drought is one of the main limiting environmental factors that reduce plant productivity. The success of selection in creating drought-resistant forms of wheat largely depends on the correct assessment of the degree of their tolerance. Along with morphological-anatomical and physiological-biochemical methods for assessing the stress tolerance of plants, biotechnological approaches have become widespread. *In vitro* screening of bread winter wheat varieties of different ecological and geographical origin for tolerance to water deficit was performed using low-molecular mannitol as a stress factor. The processes of morphogenesis of wheat varieties in the of apical meristems culture of 3-day-old seedlings were studied and it was found that in the studied forms the frequency of callusogenesis and morphogenic callus formation is determined by genotype. According to morphophysiological properties, there are two types of callus: morphogenic and non-morphogenic. Genotypes that differed in their ability to grow on a selective medium with osmotically active substance and remained a sign of stability during the cultivation cycle were isolated. It was found that the varieties of soft winter wheat MIP Feieria, Balada myronivska, MIP Valensiia had the greatest tolerance to osmotic stress, because the calluses of these genotypes under selective conditions had increased morphogenetic potential and had the highest survival rate. The varieties Samuray and Katalius were most sensitive to osmotic stress, as their callus under selective conditions observed mass necrosis. The genotypic response to osmotic stress in callus culture of bread winter wheat was found at different levels of stress. *In vitro* tissue culture can be used as a test system for screening wheat genotypes for tolerance to water deficit. The obtained results are a contribution to the study of both theoretical and practical aspects of drought tolerance of wheat and can be used as elements of breeding programs. **Key words:** bread winter wheat, water deficit, callus culture, mannitol, tolerance.

Постановка проблеми. Пшениця – найбільш розповсюджена продовольча культура не лише в Україні, а і в усьому світі [1; 2]. Збільшення урожайності є найважливішим критерієм у вирощуванні будь-яких сільськогосподарських культур, зокрема пшениці. Проте сучасна динаміка підвищення врожайності зернових не відповідає необхідним ритмам для задоволення потреб населення [3]. Генетичний потенціал вітчизняних сортів зернових злаків зна-

ходиться в межах 11–14 т/га, проте у виробничих умовах реалізується лише 45 % [4]. Серед природних чинників, що згубно впливають на процеси росту і розвитку рослин пшениці та призводять до зниження урожаю, є водний дефіцит, спричинений посухою [5; 6]. Несприятливі фактори щодо вирощування зернових культур висувають надзвичайно важливе завдання – створення нових сортів з потужним генетичним потенціалом високої продуктивності

та адаптивності для отримання стабільних валових зборів зерна [7]. Проведення досліджень стосовно оцінки генотипів пшениці на стійкість до посухи є однією з умов підвищення ефективності селекційного процесу цієї культури [8].

Слід зазначити, що оцінка генотипів на стійкість до абіотичних стресорів традиційними прийомами ускладнюється неможливістю створення відповідних екстремальних умов у польових дослідженнях. Задля успішного розв'язання проблеми стійкості рослин до абіотичних факторів середовища необхідно впроваджувати ефективні інноваційні методи. Останнім часом все більшої популярності набувають методи біотехнологій, які значно полегшують та прискорюють створення нових ліній і сортів зернових культур. Біотехнологічні методи скорочують тривалість селекційного процесу та збагачують генетичну мінливість, що є необхідною складовою створення конкурентоспроможних сортів [9; 10]. Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, де немає механізмів регуляції, що діють на рівні цілого організму [11, 12]. Метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовують для

вирішення прикладних завдань селекції різних сільськогосподарських рослин і, зокрема, пшениці [13]. Використання тканинних і клітинних культур дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і вважається важливим доповненням до класичних методів селекції пшениці.

Метою роботи є проведення скринінгу *in vitro* сортів пшениці м'якої озимої різного еколого-географічного походження на стійкість до водного дефіциту з використанням маніту як стрес-чинника.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень були 24 сорти пшениці м'якої озимої вітчизняної та зарубіжної селекції, які наведено в табл. 1. У досліді використовували насіння однієї репродукції та однакової фракції. Культуру калусної тканини отримували з апікальних меристем пагонів 3-добових стерильних проростків за методикою, розробленою О. М. Гончаруком зі співавторами [14]. Індукцію та культивування калусів проводили на середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [15], яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, AgNO₃ – 10 мг/л та 2,4-Д – 2 мг/л. Експланти культивували впродовж трьох тижнів у темряві за 26 °С, далі протягом двох тижнів за освітлення 3–4 клк, відносної вологості

Таблиця 1

Частота морфогенезу сортів пшениці м'якої озимої в культурі апікальних меристем пагонів

Сорт	Установа-оригіна́тор, країна	Частота індукції калусу, %	Частота утворення морфогенного калусу, %
Подільська	МІП, ІФРГ, Україна	89,3±2,4	56,5±3,9
МІП Ніка	МІП, Україна	97,8±1,2	66,7±3,7
МІП Відзнака	МІП, Україна	89,7±2,4	56,5±3,9
МІП Роксолана	МІП, Україна	88,1±2,6	58,4±3,9
Трудівниця миронівська	МІП, Україна	88,5±2,5	43,8±3,9
МІП Феєрія	МІП, Україна	86,3±2,7	55,4±3,9
МІП Дніпрянка	МІП, Україна	83,7±2,9	58,2±3,9
Балада миронівська	МІП, Україна	82,7±3,0	55,1±3,9
МІП Дарунок	МІП, Україна	80,5±3,1	59,7±3,9
МІП Ассоль	МІП, Україна	79,6±3,2	48,9±4,0
Естафета миронівська	МІП, Україна	79,5±3,2	45,5±3,9
МІП Вишиванка	МІП, Україна	78,1±3,3	58,9±3,9
Грація миронівська	МІП, Україна	77,3±3,3	43,2±3,9
МІП Княжна	МІП, Україна	75,5±3,4	49,6±4,0
МІП Валенсія	МІП, Україна	69,2±3,6	48,3±4,0
Турунчук	СГІ-НЦНС, Україна	81,5±3,1	49,3±4,0
Благодарка одеська	СГІ-НЦНС, Україна	79,1±3,2	48,8±4,0
Місія одеська	СГІ-НЦНС, Україна	77,7±3,3	41,3±3,9
Альбатрос одеський	СГІ-НЦНС, Україна	71,4±3,6	41,7±3,9
Поліська 90	ННЦ «ІЗ НААН», Україна	66,1±3,7	36,2±3,8
Скаген	Німеччина	71,5±3,6	54,5±3,9
Самурай	Німеччина	70,4±3,6	39,5±3,9
Каталіус	Німеччина	67,6±3,7	44,7±3,9
Торілд	Німеччина	67,2±3,7	38,4±3,8

Примітка: МІП – Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла, ІФРГ – Інститут фізіології рослин і генетики, СГІ-НЦНС – Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортоживчення, ННЦ «ІЗ НААН» – Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН»

повітря 70 % і 16-годинного фотоперіоду. Для кожного сорту було взято по 160 експлантів. Частоту індукції калюсу та утворення морфогенного калюсу по кожному варіанту визначали як відсоток до початкової кількості висаджених експлантів.

Одержані калюси культивували у чашках Петрі за температури 26 °С в темряві на селективному середовищі протягом чотирьох тижнів. Як селективний агент застосовували низькомолекулярний маніт, який додавали до модифікованого середовища МС у концентрації 0,6 М. Контролем слугувало середовище без маніту. Через 4 тижні визначали частку живих калюсів як відсоткове відношення кількості життєздатних калюсів до їх початкового числа. При цьому до мертвих відносили калюси, які побуріли на 2/3 своєї поверхні й більше, а решту вважали живими. Експериментально отримані дані обробляли методами статистичного аналізу з використанням прикладної програми MS Excel 2013.

Виклад основного матеріалу. Початок калюсогенезу в усіх досліджених форм спостерігали вже на третю-четверту добу культивування. При переході до дедиференціації на експлантах утворювалася калюсна тканина, і вони збільшувались у розмірах (рис. 1).

У процесі роботи було виявлено, що досліджувані генотипи пшениці м'якої озимої характеризуються різною здатністю до індукції калюсу, яка варіювала від 66,1 % до 97,8 % (табл. 1).

Найбільша частота індукції калюсу відмічена в сортів – МП Ніка (97,8 %), МП Відзнака (89,7 %), Трудівниця миронівська (88,5 %), МП Роксолана (88,1 %), МП Феєрія (86,3 %), МП Дніпрянка (83,7 %), Балада миронівська (82,7 %) та Турунчук (81,5 %), найменша – Поліська 90 (66,1 %), Торілд (67,2 %), Каталіус (67,6 %).

Після трьох-чотирьох тижнів культивування було виявлено два типи калюсу, які розрізняли за морфологічними властивостями: морфогенний калюс – щільний, жовтуватий, глобулярний, який виявився здатним на середовищі для регенерації індукувати розвиток морфогенних структур; неморфогенний калюс – пухкий і водянистий, при подальшому культивуванні якого спостерігався некроз (рис. 2).

Виявлено, що всі досліджувані сорти пшениці утворювали морфогенний калюс, однак із різною частотою. Найбільша частота його утворення виявлена в сортів: МП Ніка (66,7 %), МП Дарунок (59,7 %), МП Вишиванка (58,9 %), МП Роксолана (58,4 %), МП Дніпрянка (58,2 %), а найменша – Поліська 90 (36,2 %), Торілд (38,4 %), Самурай (39,5 %) (табл. 1).

Під час визначення виживаності калюсних культур пшениці на варіантах з манітом концентрацією 0,6 М найбільшу частку живих калюсів було виявлено в ряду сортів – МП Феєрія (42,9 %), Балада миронівська (42,3 %), МП Валенсія (39,6 %), МП Дарунок (38,1 %), МП Ассоль (37,3 %), Альбатрос одеський (36,7 %) (рис. 3).

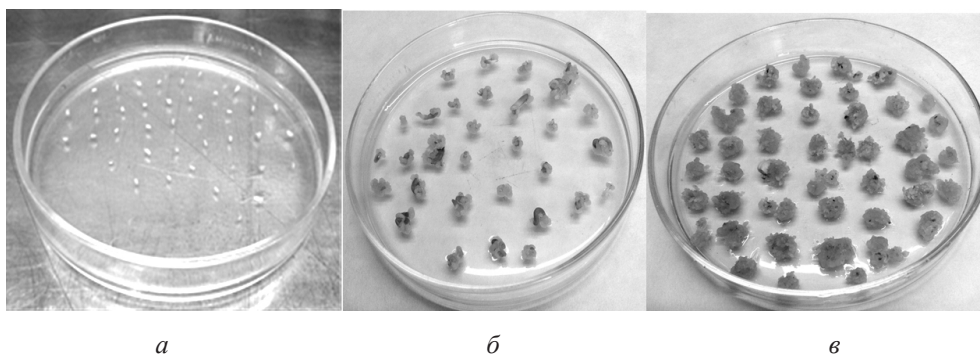


Рис. 1. Етапи індукції калюсу пшениці з апікальних меристем пагонів: а – вихідні експланти; б – початок калюсоутворення; в – сформовані калюси

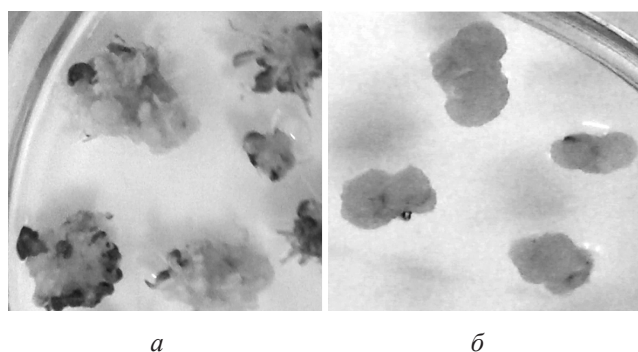


Рис. 2. Типи індукованих калюсів пшениці: а – морфогенні; б – неморфогенні

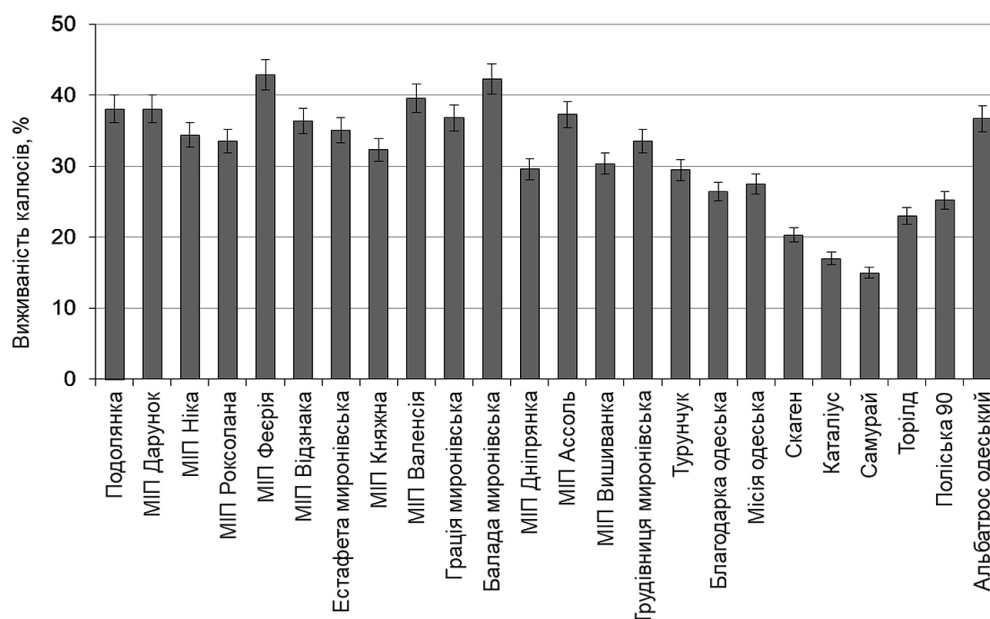


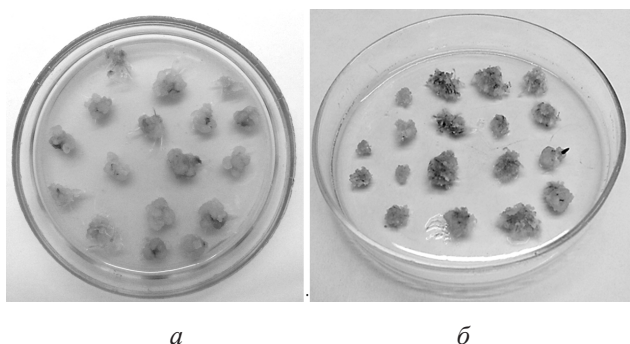
Рис. 3. Вживаність калюсів пшениці м'якої озимої на селективному середовищі з 0,6 М маніту

Вищевказані генотипи виявились найменш чутливими до осмотичного стресу, оскільки вони мали найвищу частку життєздатних калюсів, що продовжували свій ріст і проявляли ознаки морфогенезу за селективних умов (рис. 4). Нестійкі до осмотичного стресу калюси через 4–5 днів набували буро-коричневого кольору, а через 10–20 днів відмиralи. Стійкі калюси мали наступні морфологічні характеристики: щільний калюс з глобулярною структурою темно-жовтого кольору. Толерантність до осмотичного стресу була найменшою в сорту Самурай, так як у нього вживаність калюсів була найменшою – велика їх частка підлягала некрозу (рис. 5).

Таким чином, нами показано можливість застосування культури тканин *in vitro* як тест-системи для проведення скринінгу генотипів пшениці на стійкість до водного дефіциту. У багатьох роботах також показано застосування методу *in vitro* для оцінки селекційного матеріалу злакових на стій-

кість до несприятливих факторів середовища [16; 17]. Зокрема, єгипетські дослідники [18] встановили чітку позитивну кореляцію між вживаністю калюсів пшениці на селективних середовищах із різними концентраціями маніту і життєздатністю цих генотипів у польових умовах.

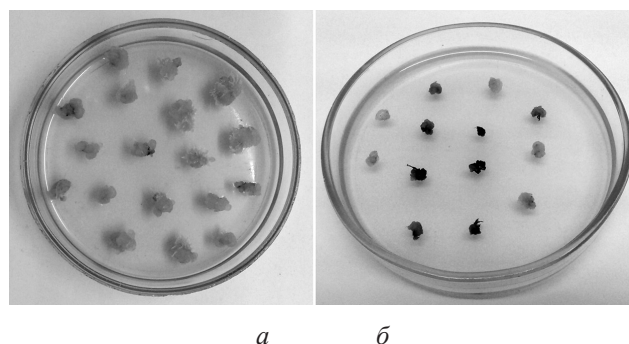
Головні висновки. Проведено скринінг *in vitro* сортів пшениці м'якої озимої на стійкість до водного дефіциту з використанням маніту в якості стрес-чинника. Виділено генотипи, які відрізнялись здатністю до росту на селективному середовищі з осмотично активною речовиною та зберігали ознаку стійкості протягом циклу культивування. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Виявлено, що найбільшу стійкість до осмотичного стресу мали сорти пшениці м'якої озимої МІП Феєрія, Балада миронівська та МІП Валенсія. У вивчених сортів відмічено генотипову залежність процесів морфогенезу в культурі



а

б

Рис. 4. Калюси сорту пшениці озимої МІП Княжна: а – контроль; б – селективне середовище з 0,6 М маніту



а

б

Рис. 5. Калюси сорту пшениці озимої Самурай: а – контроль; б – селективне середовище з 0,6 М маніту

in vitro. Отримані результати є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів посухостійкості пшениці та можуть застосовуватися як елементи селекційних програм. Подальший прогрес у вивченні посухостійкості пшениці буде

також залежати від впровадження інноваційних генетичних та біотехнологічних розробок, що неодмінно надасть селекціонерам потужні інструменти для виявлення генотипів з цінними господарськими ознаками.

Література

1. 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.
2. 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.
3. Ткачук В.І. Інновації як фактор підвищення ефективності виробництва зерна. *Ефективна економіка*. 2014. № 2. С. 1–3.
4. Васильківський С.П., Гудзенко В.М., Кочмарський В.С., Кириленко В.В. Реалізація потенціалу сортів зернових культур – шлях вирішення продовольчої проблеми. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 21. С. 47–51.
5. 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.
6. 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.
7. Корхова М. М., Уліч Л. І. Вивчення посухостійкості сортів озимої пшениці порівняльним експрес-методом. *Агробіологія*. 2010. Вип. 2(69). С. 113–115.
8. Пикало С., Демидов О., Юрченко Т., Хоменко С., Гуменюк О., Харченко М., Прокопів Н. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2020. Вип. 82. С. 63–79.
9. 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.
10. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К. : Логос, 2014. 375 с.
11. Дубровна О. В., Бавол А. В., Зінченко М. О. та ін. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2011. Т. 9. № 1. С. 10–16.
12. Dubrovna O. V., Baval A. V. Variability of the wheat genome during *in vitro* culture. *Cytology and Genetics*. 2011. Vol. 45. № 5. P. 333–340.
13. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
14. 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.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. № 3. P. 473–497.
16. Тагиманова Д. С., Ергалиева А. Ж., Райзер О. Б., Хапилина О. Н. Оценка генотипов яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость в условиях *in vitro*. *Биотехнология. Теория и практика*. 2013. № 2. С. 42–46.
17. Россеев В. М., Белан И. А., Россеева Л. П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2011. Т. 76. № 2. С. 32–34.
18. Ahmed A. Response of immature embryos *in vitro* regeneration of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol. *Journal of Agriculture Science*. 1999. Vol. 30. № 3. P. 25–34.