

УДК 633.11:631.523.085:581

## ВИВЧЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ЗАСОЛЕННЯ ГЕНОТИПІВ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО З ВИКОРИСТАННЯМ КУЛЬТУРИ ІЗОЛЬОВАНИХ МІКРОСПОР

С.В. ПИКАЛО, С.І. ВОЛОЩУК

*Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії  
аграрних наук України  
08853 п/в Центральне Миронівського району Київської області  
e-mail: pykserg@ukr.net*

Розроблено біотехнологічні умови добору стійких до засолення генотипів тритикале озимого в культурі ізольованих мікроспор. Встановлено, що концентрація 100 мМ NaCl в селективних середовищах дає змогу диференціювати генотипи тритикале за солестійкістю. Показано, що деякі гібриди стійкіші до засолення порівняно з вихідним сортом. Доведено можливість використання культури мікроспор як тест-системи для вивчення солестійкості генотипів тритикале озимого.

*Ключові слова:* *Triticale*, культура мікроспор, солестійкість.

Відносно новий ботанічний рід злакових — тритикале, створений селекціонерами шляхом схрещування пшениці та жита [1], поєднує низку господарсько-біологічних особливостей, властивих вихідним видам. До таких особливостей належать високий потенціал урожайності зерна та зеленої маси, підвищені адаптивні властивості, комплексний імунітет до грибних захворювань, високий вміст білка й лізину в зерні, а також основних поживних речовин у зеленій масі. Тритикале вирощують в Україні як продовольчу і зернофуражну культуру [20].

Селекція тритикале на стійкість до різного роду стресів є визначальною передумовою для підвищення пластичності й продуктивності цієї культури, дасть змогу розширити посіви зернових культур у районах із несприятливими погодними умовами, що важливо у зв'язку з глобальними змінами клімату [10]. Їстотне значення для селекційного вдосконалення тритикале має його стійкість до абіотичних чинників середовища: посухи, засолення й закислення ґрунтів, підвищених температур [17]. Однак селекція на стійкість до таких чинників традиційними методами ускладнюється неможливістю створення стресових умов за бажанням селекціонера в польових випробуваннях [7, 18]. Солестійкість поряд зі стійкістю до інших абіотичних чинників у сучасних умовах набуває дуже важливого значення [11, 12]. В Україні близько 5 млн га засоленних ґрунтів, із них 2,85 млн га — орні землі, тому актуальними є роботи зі створення солестійких форм [3]. Крім того, засолення чинить на рослину подібний фізіологічний вплив (осмотичний стрес), як і посуха, тому солестійкі форми характеризуються підвищеною стійкістю і до посухи [6, 15].

Багатогранність проблеми стійкості організмів до стресових чинників потребує застосування для свого вирішення нових підходів. Останнім часом одним із таких перспективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових форм сільськогосподарських культур, є використання методів біотехнології, зокрема клітинної селекції [4].

Біотехнологічні методи уможливають отримання рослин із бажаними ознаками, в тому числі з конкретними змінами відповідних метаболічних процесів, які забезпечують їх адаптацію до стресових умов [8]. При цьому селекція *in vitro* може вестися на ознаки, які проявляються на клітинному рівні, зокрема на збільшену експресію певних генів, що контролюють метаболічні шляхи, які забезпечують толерантність до абіотичних чинників [16].

Застосування андрогенних культур ізольованих мікроспор для клітинної селекції має низку переваг порівняно з іншими системами *in vitro*, оскільки культура початково є однорідною за клітинним складом системою і можливість регенерації із соматичних тканин виключається [9]. Тому добір *in vitro* і мутагенез значно полегшені, оскільки гаплоїдний стан дає змогу проявитись рецесивним генам.

Метою роботи була розробка методу добору стійких до засолення генотипів тритикале озимого з використанням культури мікроспор і хлориду натрію як селективного чинника.

## Методика

Об'єктом дослідження був сорт тритикале озимого Обрій селекції Миронівського інституту пшениці ім. В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України та чотири гібриди від схрещування з цим сортом інших сортів.

Андрогенні культури отримували через культуру ізольованого пилку модифікованим нами методом [2, 5]. Зрізане колосся, пилок у якого знаходився в стадії ранньої чи середньої одноядерної мікроспори, витримували у холодильній камері за температури 3–5 °С без освітлення протягом 6–14 діб. Матеріал стерилізували 0,25 %-м розчином гіпохлориду натрію протягом 7–10 хв із наступним промиванням соляною кислотою протягом 10 хв, потім тричі промивали стерильною дистильованою водою. В одному флаконі культивували  $10^5$  ізольованих мікроспор. Усі компоненти середовищ стерилізували фільтрацією. При приготуванні й модифікації поживних середовищ за основу брали середовища за прописом 190-2 і NPB99 [19].

Калюси першого пасажу пересаджували на селективні середовища з додаванням розчину NaCl концентрацією 100 і 200 мМ. Контролем слугувало середовище без вмісту хлориду натрію. Ембріоїди підраховували через 4 тижні культивування, регенеранти отримували за 6–7 тижнів на безгормональних середовищах.

Індекси толерантності до стресу розраховували за Фішером і Маурером [14], критерієм слугувала відносна кількість множинного пагоноутворення: індекс чутливості до стресу  $SSI = (1 - GY_s/GY_c)/(1 - D)$ ; індекс стретолерантності до засолення  $STI = (GY_s/GY_c) 100$ , де  $GY_s$  — середнє для генотипу число пагонів в умовах сольового стресу;  $GY_c$  — середнє для контролю;  $D$  — відношення середнього за всіма генотипами в умовах стресу до середнього у контролі.

**Результати та обговорення**

Ізольовані мікроспори на середовищі культивування зазвичай розвиваються шляхом прямого ембріодогенезу, тобто з мікроспори утворюється ембріодоподібна структура (ЕПС), яка в подальшому формує соматичні зародки, що потенційно можуть дати рослини-регенеранти. Для розширення можливості оцінювання одних і тих самих генотипів на різних селективних середовищах за різних значень селективного чинника, на наш погляд, більш придатними є калюсні культури, оскільки калюс можна розділити на кілька частин і кожен з них використати в різних варіантах експерименту. В разі добавляння у середовище культивування регуляторів росту з ЕПС утворювались калюси, з яких можлива регенерація від одного до кількох пагонів. Для множинного пагоноутворення випробувано чотири варіанти середовищ 190-2 і NPB99 із добавлянням 2,4-Д та ФОК концентраціями 2 та 1 мг/л і 90 г/л сахарози чи мальтози.

Серед досліджених варіантів кращим виявилось середовище 190-2 модифікації 1, оскільки в переважній більшості генотипів індукція калюсу й подальша регенерація найінтенсивніше відбувались саме в ньому (табл. 1, 2). У зв'язку з цим для подальших досліджень використовували середовище 190-2 модифікації 1.

Слід зазначити, що робіт стосовно добору *in vitro* на солестійкість генотипів тритикале виконано небагато. У наших експериментах калюсні культури з ізольованих мікроспор найактивніше утворювались на контрольному середовищі, тобто без добавляння NaCl. З підвищенням концентрації хлориду натрію частота калюсогенезу знижувалась: за концентрації NaCl 100 мМ — до 70 % відносно контролю, за 200 мМ — до 30 %, що свідчить про негативний вплив іонів Na<sup>+</sup> і Cl<sup>-</sup> (рис. 1).

Вилучення із середовища культивування регуляторів росту супроводжувалось індукцією ризогенезу та гомогенезу. При цьому з одного калюса могло утворитись кілька пагонів. З підвищенням концентрації хлориду натрію регенераційний потенціал калюсів значно пригнічувався. Якщо в контролі регенераційна здатність становила 60 % і більшість калюсів характеризувалась множинним пагоноутворенням, то на селективному середовищі вона зменшувалась до 20 % (рис. 2).

*ТАБЛИЦЯ 1. Вплив модифікацій поживного середовища на частоту індукції калюсогенезу в культурі ізольованого пилку*

Генотип	Частота індукції калюсу на поживних середовищах, %			
	1	2	3	4
Обрій	12,15	8,30	7,46	8,70
Обрій × Візерунок	12,21	11,37	8,22	12,59
Обрій × Степан	13,07	7,47	6,77	6,49
Обрій × Валентин 90	6,38	6,19	6,36	3,33
Обрій × Благодатне	8,79	6,74	6,73	7,07
Середнє	10,52	8,01	7,11	7,64
НІР	Генотип	Середовище	Взаємодії	
0,05	0,33	0,30	0,67	
0,01	0,44	0,39	0,88	

*П р и м і т к а.* Тут і в табл. 2: М — мальтоза; С — сахароза. 1–4 — варіанти середовищ (1 — 190-2 + М; 2 — 190-2 + С; 3 — NPB99 + М; 4 — NPB99 + С).

ТАБЛИЦЯ 2. Частота регенерації зелених пагонів на різних варіантах поживних середовищ

Генотип	Частота регенерації на поживних середовищах, %			
	1	2	3	4
Обрій	6,15	3,60	3,79	8,70
Обрій × Візерунок	9,18	4,74	4,52	5,59
Обрій × Степан	9,44	5,44	5,10	3,49
Обрій × Валентин 90	2,05	4,56	3,73	2,96
Обрій × Благодатне	15,82	4,07	3,73	4,10
Середнє	8,52	4,48	4,17	4,97
НІР	Генотип	Середовище	Взаємодії	
0,05	0,35	0,31	0,70	
0,01	0,46	0,41	0,92	

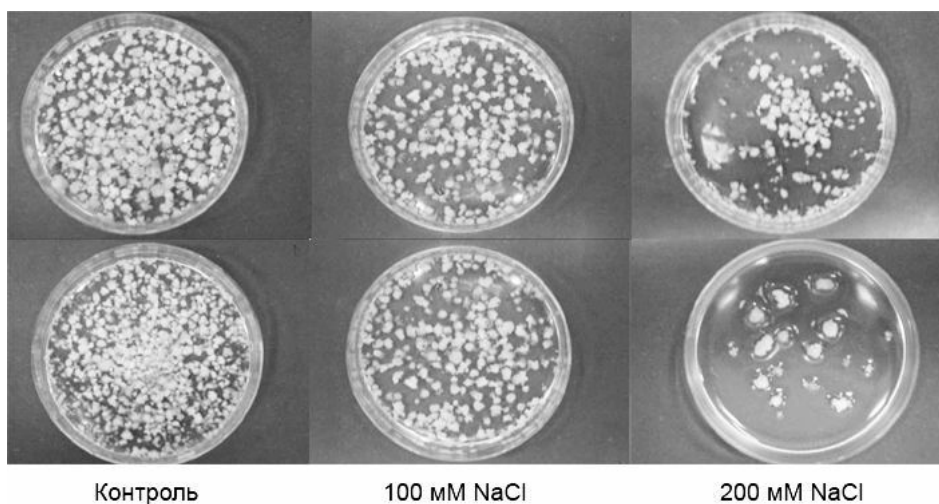


Рис. 1. Калюсоутворення на контрольному й селективному середовищах

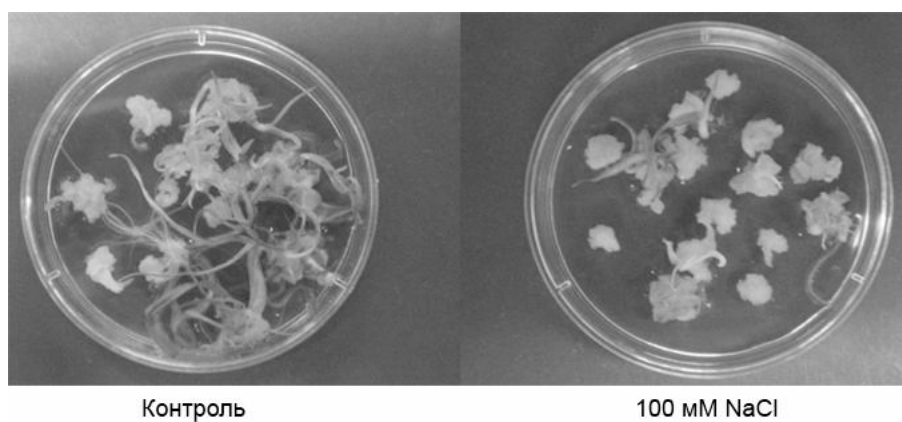


Рис. 2. Регенерація пагонів тритикале на контрольному й селективному середовищах

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ

ТАБЛИЦЯ 3. Вплив концентрації NaCl на відносну частоту множинного пагоноутворення в калюсній культурі андрогенного походження (% контролю STI)

Генотип	Концентрація NaCl, мМ		
	100	200	
Обрій	32,56	6,97	
Обрій × Візерунок	43,83	6,94	
Обрій × Степан	37,41	3,47	
Обрій × Валентин 90	9,10	0,86	
Обрій × Благодатне	47,31	7,74	
Середнє	34,04	5,19	
НІР	Генотип	Середовище	Взаємодії
0,05	0,57	0,44	0,98
0,01	0,74	0,57	1,29

Результати впливу хлориду натрію наведено в табл. 3 (відносні величини, виражені у відсотках щодо контролю, прийнятого для всіх сортів за 100 %). За добавляння NaCl у поживне середовище частка калюсів із множинним пагоноутворенням у всіх генотипів тритикале зменшувалась, але в кількісному відношенні між ними були відмінності. При цьому коефіцієнт кореляції між значеннями STI за 100 і 200 мМ NaCl був вірогідним ( $r = 0,79$ ,  $p < 0,05$ ).

Також використано індекс чутливості до стресу, який дає змогу оцінити відносну сприйнятливність кожного генотипу в досліджуваному наборі (табл. 4). Збільшення цього індексу свідчить про вищу чутливість генотипу до дії селективного чинника. Як видно з даних табл. 4, з підвищенням концентрації хлориду натрію в селективному середовищі зі 100 до 200 мМ різниця між генотипами за показником SSI стає невірогідною. При цьому кореляції між часткою множинного пагоноутворення в контролі й на селективному середовищі не виявлено, однак встановлено вірогідний кореляційний зв'язок ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,05$ ) між значеннями цього індексу за концентрацій NaCl у середовищі 100 і 200 мМ. Це дає

ТАБЛИЦЯ 4. Вплив концентрації NaCl на індекс сприйнятливості до стресу (SSI), оцінений за відотною кількістю множинного пагоноутворення калюсів андрогенного походження

Генотип	Концентрація NaCl, мМ	
	100	200
Обрій	1,028	0,979
Обрій × Візерунок	0,857	0,979
Обрій × Степан	0,954	1,016
Обрій × Валентин 90	1,386	1,035
Обрій × Благодатне	0,804	0,979
НІР 0,05		
Генотип		0,031
Середовище		0,041
Взаємодії		В.н.

Примітка. В.н. — відмінності невірогідні.

підставу припустити, що для оцінювання стійкості краще застосовувати нижчі концентрації селективного чинника й забезпечувати при цьому отримання більшого числа рослин-регенерантів.

Чутливість усіх генотипів, досліджених у нашій роботі, до сольового стресу відрізнялась за концентрації NaCl 100 мМ. Деякі з гібридних комбінацій мали меншу чутливість до сольового стресу *in vitro* порівняно з сортом Обрій. Можливо, у гібридних комбінаціях виявляються певні міжгенні взаємодії, які впливають на стійкість до засолення на клітинному рівні. Логічно припустити, що тут насамперед мають місце механізми кращої компартментації іонів Na<sup>+</sup> і Cl<sup>-</sup>, тоді як на рівні рослин висока толерантність до засолення може забезпечуватись механізмом виключення. Стосовно можливості добору на солестійкість на рівні калюсу, отриманого з мікроспор, є підстави її припускати, але для повного переконання потрібний аналіз потомства отриманих дигаплоїдних ліній, що буде предметом нашої подальшої роботи.

Отже, результати наших досліджень свідчать про негативний вплив сольового стресу на регенераційний потенціал калюсної культури тритикале, отриманої в культурі ізольованих мікроспор. Застосування селективних середовищ, що містять 100 мМ NaCl, дає змогу диференціювати генотипи тритикале за солестійкістю.

1. Білітюк А.П., Гірко В.С., Каленська С.М., Андрушків М.І. Тритикале в Україні. — К.: Арістей, 2004. — 388 с.
2. Волощук С.І., Заліський О.О., Філонченко П.О., Волощук Г.Д. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаплоїдних ліній тритикале // НБТ МІП ім. В.М. Ремесла. — Миронівка, 2012. — **11**. — С. 320–334.
3. Гнатенко О.Ф., Капшик М.В., Петренко Л.Р., Вітвіцький С.В. Грунтознавство з основами геології. — К.: Оранта, 2005. — 648 с.
4. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — **41**, № 6. — С. 463–475.
5. Пыкало С.В., Волощук С.І., Кочмарський В.С. Використання андрогенних культур для оцінки стійкості тритикале озимого до абіотичних факторів середовища // Зб. наук. праць ІБКЦБ. — 2013. — **17**, № 2. — С. 334–340.
6. Сергеева Л.Е. Изменение культуры клеток под воздействием стресса. — Киев: Логос, 2001. — 99 с.
7. Сечняк Л.К., Сулима Ю.Г. Тритикале. Всесоюз. акад. с.-х. наук им. Ленина. — М.: Колос, 1984. — 317 с.
8. Цильке Р.А. Некоторые аспекты генной инженерии у растений // Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Сб. науч. тр. — Новосибирск, 2002. — С. 17–23.
9. Шевченко В.Е., Гончаров С.В. Состояние и перспективы селекционной работы по тритикале в России // Биологические основы и методы селекции и семеноводства культурных растений / Сб. науч. тр. ВГАУ. — Воронеж, 1997. — С. 30–38.
10. Шленкер Р., Шекке Э. Успехи в селекции тритикале — результат международного сотрудничества // Междунар. агропром. журн. — 1991. — **1**. — С. 43–45.
11. Almansouri M., Kinet J., Lutts S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Plant Soil. — 2001. — **231**, N 2. — P. 243–254.
12. Aly M., Sabry S., Abdelfatah O., Elgharbawy H. In vitro screening for the effect of sea water salinity stress on growth and biochemical characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. // Int. J. Appl. Agr. Res. — 2007. — **2**, N 1. — P. 1–11.
13. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential — are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? // Aust. J. Agr. Res. — 2005. — **5**. — P. 1159–1168.
14. Fischer R.A., Maurer R. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield response // Ibid. — 1978. — **29**. — P. 897–912.
15. Gawande N.D., Mahurkar D.G., Rathod T.N. et al. In vitro screening of wheat genotypes for drought tolerance // Ann. Plant Physiol. — 2005. — **19**. — P. 162–168.

16. Ghannadha M.R., Omid M., Shahi R.A., Poustini K. A study of salt tolerance in genotype of bread wheat using tissue culture and germination test // Iran. J. Agr. Sci. — 2005. — **36**. — P. 75—85.
17. Jellis G.J. Crop plant resistance to biotic and abiotic factors: Combating the pressures on production systems in a changing world // Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors. — 2009. — **3**. — P. 15—20.
18. Koszegi B., Farshadfar E., Vagujfalvi A., Sutka J. Drought tolerance studies on wheat/rye disomic chromosome addition lines // Acta Agr. Hungar. — 1996. — **44**. — P. 121—126.
19. Liu W., Zheng M.Y., Konzak C.F. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Rep. — 2002. — **20**. — P. 821—824.
20. Ludlow M.M., Muchow R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments // Adv. Agr. — 1990. — **43**. — P. 107—153.

Отримано 14.02.2014

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАСОЛЕНИЮ ГЕНОТИПОВ ТРИТИКАЛЕ  
ОЗИМОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

*С.В. Пыкало, С.И. Волощук*

Мироновский институт пшеницы имени В.М. Ремесло Национальной академии аграрных наук Украины, п/о Центральное

Разработаны биотехнологические условия отбора устойчивых к засолению генотипов тритикале озимого в культуре изолированных микроспор. Установлено, что концентрация 100 мМ NaCl в селективных средах позволяет дифференцировать генотипы тритикале по солеустойчивости. Показано, что некоторые гибриды более устойчивы к засолению по сравнению с исходным сортом. Доказана возможность использования культуры микроспор как тест-системы для изучения солеустойчивости генотипов тритикале озимого.

THE STUDY OF TOLERANCE TO SALINITY OF WINTER TRITICALE GENOTYPES  
USING ISOLATED MICROSPORES CULTURE

*S.V. Pykalo, S.I. Voloshchuk*

V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
P.O. Tsentralne Myronivka district, Kyiv region, 08853, Ukraine

The biotechnological terms of selection of resistant winter triticale genotypes to salinity in isolated microspores culture were developed. The concentration of NaCl 100 mM in selective media allows to differentiate triticale genotypes for salt tolerance. It was found that some hybrids have higher resistance to salinity as compared to the original variety. The ability to use microspore culture as a test system for the study of salt tolerance of winter triticale genotypes was proven.

*Key words:* Triticale, microspore culture, resistance to salinity.