

СКРИНІНГ *IN VITRO* СОРТІВ ПШЕНИЦІ ТВЕРДОЇ ОЗИМОЇ НА ПОСУХОСТІЙКІСТЬ В КУЛЬТУРІ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ

Пикало С.В.¹, Демидов О.А.¹, Куманська Ю.О.², Юрченко Т.В.¹, Харченко М.В.¹

¹Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України
08853, с. Центральне

²Білоцерківський національний аграрний університет
пл. Соборна, 8/1, 09117, м. Біла Церква
pykserg@ukr.net

Пшениця є однією з важливих сільськогосподарських культур, оскільки використовується у виробництві борошна та кормів. Пшениця тверда вважається основною сировиною для виробництва макаронів і крупи. Сучасні сорти пшениці повинні володіти високими хлібопекарськими і круп'яними властивостями та бути адаптованими до умов навколишнього середовища. Посуха належить до загрозливих обмежувальних чинників довкілля, що знижують продуктивність сільськогосподарських рослин і призводять до значних економічних збитків. Одним із пріоритетних напрямів селекції пшениці є створення сортів, толерантних до водного дефіциту. Успіх селекції у створенні посухостійких форм значно залежить від правильної оцінки ступеня їхньої стійкості. Поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінки стресостійкості рослин, біотехнологічні підходи набули значного поширення. У статті викладено результати щодо скринінгу *in vitro* сортів пшениці твердої озимої на посухостійкість в культурі незрілих зародків з використанням маніту в якості стрес-чинника. Різна генотипова реакція на осмотичний стрес у культурі *in vitro* проявлялась у неоднаковій реакції калюсів на дію селективного агента. У результаті досліджень виділено сорти пшениці твердої озимої, які характеризувались здатністю до росту на селективному середовищі за осмотиком та зберігали ознаку стійкості протягом циклу культивування. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Встановлено, що концентрація 0,6 М маніту дозволяє диференціювати генотипи пшениці твердої озимої за посухостійкістю. Виявлено, що найбільшу стійкість до осмотичного стресу мали сорти Таврія і МІП Лакомка, оскільки їх калюси за селективних умов відрізнялись підвищеним морфогенетичним потенціалом та мали найбільший рівень виживання. У вивчених сортів відмічено генотипову залежність процесів морфогенезу в культурі незрілих зародків. Отримані результати є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів посухостійкості пшениці та можуть застосовуватися як елементи селекційних програм. Культуру незрілих зародків можна використовувати як тест-систему для проведення скринінгу генотипів пшениці на посухостійкість. *Ключові слова:* пшениця тверда озима, посуха, калюс, незрілий зародок, маніт, стійкість.

***In vitro* screening of winter durum wheat varieties for drought tolerance in immature embryo culture. Pykalo S., Demydov O., Kumanska Yu., Yurchenko T., Kharchenko M.**

Wheat is one of the most important agricultural crops as it is used in the production of flour and feed. Durum wheat is considered the main raw material for the production of pasta and groats. Modern wheat varieties must have high baking and cereal properties and be adapted to environmental conditions. Drought is one of the threatening limiting environmental factors that reduce the productivity of agricultural plants and lead to significant economic losses. One of the priority areas of wheat breeding is the creation of varieties tolerant to water deficit. The success of breeding in creating drought-tolerant forms depends on a correct assessment of the degree of their tolerance. Along with morphological-anatomical and physiological-biochemical methods for assessing plant stress tolerance, biotechnological approaches have become widespread. The article presents the results of *in vitro* screening of durum winter wheat varieties for drought tolerance was carried out in immature embryo culture using mannitol as a stress factor. Different genotypic responses to osmotic stress in *in vitro* culture were manifested in the unequal response of calli to the action of a selective agent. As a result of the research, varieties of durum winter wheat were isolated that were characterized by the ability to grow on a selective medium with osmosis and retained the trait of tolerance during the cultivation cycle. Based on morphophysiological properties, two types of callus are distinguished: morphogenic and non-morphogenic. It has been established that a concentration of 0.6 M mannitol makes it possible to differentiate the genotypes of durum winter wheat by drought tolerance. It was revealed that the varieties Tavriia and MIP Lakomka had the greatest tolerance to osmotic stress, since their calli under selective conditions were distinguished by increased morphogenetic potential and had the highest level of survival. In the studied varieties, a genotypic dependence of the processes of morphogenesis in immature embryo culture was noted. The results obtained are a definite contribution to the study of both theoretical and practical aspects of drought tolerance in wheat and can be used as elements of breeding programs. The immature embryo culture can be used as a test system for screening wheat genotypes for drought tolerance. *Key words:* durum winter wheat, drought, callus, immature embryo, mannitol, tolerance.

Постановка проблеми. Пшениця – основний продукт харчування більшості половини населення земної кулі та є основним енергетичним джерелом життєдіяльності людського організму [1]. Зерно твердої пшениці (*Triticum durum* Desf.) та продукти його переробки є джерелом білку, життєво важливих амінокислот, вуглеводів, мінеральних елементів

і вітамінів, надзвичайно корисних для людини [2]. Використовують його досить широко в хлібопекарській, круп'яній, кондитерській галузях харчової промисловості, зокрема для виробництва високоякісних макаронних виробів. Тверда пшениця порівняно з м'якою майже не осипається, менше уражується хворобами та шкідниками, стійкіша до вилягання [3].

У світовому землеробстві посівні площі під пшеницею твердою за останні 15 років розширилися з 15,5 до 18,3 млн га, що становить близько 5–7 % від загального світового пшеничного клину [4].

Збільшення врожайності є найбільш важливим критерієм при вирощуванні будь-яких сільськогосподарських рослин. Існує багато чинників, що не дають можливості повністю реалізувати детермінований спадковий потенціал сортів. Серед природних чинників, що найбільш негативно впливають на фізіологічні процеси росту і розвитку рослин і, як наслідок, спричиняють втрати врожаю, є водний дефіцит, викликаний посухою [5]. Шкідлива дія посухи полягає у зневодненні рослин і порушенні у них метаболічних процесів, що призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і, в кінцевому результаті, до зниження кількості накопиченої рослинами органічної речовини [6]. Стрес, викликаний посухою, є причиною прямих або непрямих пошкоджень рослин, що обумовлені інактивацією ферментів, порушенням біохімічних процесів, накопиченням токсичних речовин, витоком іонів, дефіцитом живлення та іншими причинами [7]. Очікується, що за прогресуючого глобального потепління періодичність посух за роками буде посилюватись [8].

Селекція пшениці на посухостійкість є визначальною передумовою для підвищення її пластичності й продуктивності та дає змогу розширити посіви цієї культури у районах із несприятливими кліматичними умовами. Успіх селекції пшениці на стійкість до водного дефіциту значною мірою залежить від правильної оцінки цієї ознаки у створюваних сортах [9]. Слід зазначити, що оцінка генотипів на посухостійкість традиційними прийомами ускладнюється неможливістю створення відповідних екстремальних умов у польових дослідженнях. Багатогранність проблеми стійкості рослин до стресових чинників для її успішного розв'язання потребує інноваційних ефективних підходів. Принципово новим підходом на сьогоднішній день є застосування методів біотехнології, що значно полегшує та прискорює традиційний селекційний процес щодо створення нових ліній і сортів пшениці. Варто зазначити, що за останні десятиліття біотехнологічні підходи набули значного поширення і стали одними з новітніх інструментів сільськогосподарських досліджень [10; 11]. У поєднанні з традиційною практичною селекцією біотехнології належить вагомий внесок у розвиток нових методів генетичного поліпшення рослин та підвищення їх продуктивності, а тому вона успішно застосовується селекціонерами всього світу [12]. Біотехнологічні підходи прискорюють селекцію сільськогосподарських культур завдяки скороченню часу, необхідного для створення сортів з поліпшеними характеристиками, а також доповнюють та розширюють генетичну мінливість, що є невід'ємною умовою для отримання нових сортів

із заданими ознаками [11; 12]. Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, де немає механізмів регуляції, що діють на рівні цілого організму [12; 13]. Метод культури тканин та органів *in vitro* нині широко використовують для вирішення прикладних завдань селекції різних сільськогосподарських рослин [14]. Використання тканинних і клітинних культур дає можливість ефективно прискорити селекційний процес і вважається важливим доповненням до класичних методів селекції пшениці.

За умов *in vitro* можна задавати різні параметри, подібні до тих, у яких у подальшому зростатимуть дорослі рослини, у тому числі й екстремальні умови вирощування. При цьому стійкі форми можна ідентифікувати шляхом порівняння росту калусів на селективному середовищі за наявності і відсутності стресового агента. На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється у толерантності клітин до наявності у живильному середовищі осмотично активних речовин. Для імітації *in vitro* стресового ефекту водного дефіциту застосовують такі осмотики, як високомолекулярний поліетиленгліколь або низькомолекулярний маніт [15; 16].

Одним із ключових чинників, що впливає на ефективність біотехнологічних робіт зі злаковими культурами, є вибір відповідного типу експланта. Для отримання калусу з соматичних клітин використовують незрілі та зрілі зародки, незрілі суцвіття, сегменти колеоптиля, мезокотиля та молодих листків, апікальні меристеми пагонів [17; 18]. Як відомо, незрілі зародки є традиційним експлантом у злаків [19]. Вибір такого типу експланта зумовлений високою інтенсивністю проліферації і компетентністю всіх тканин зародка при культивуванні *in vitro*. Це дає підстави виключити вплив зниження проліферативної функції клітин, характерного для спеціалізованих тканин, на результати експериментів.

Метою роботи є проведення скринінгу *in vitro* сортів пшениці твердої озимої на посухостійкість у культурі незрілих зародків з використанням маніту як стрес-чинника.

Матеріали і методи. Матеріалом досліджень були сорти пшениці твердої озимої вітчизняної селекції, серед яких сорти Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН (Бурштин, Гавань, Лагуна, Таврія, Золоте руно, Крейсер, Континент) і Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МП Лакомка). Культура калусної тканини була ініційована з незрілих зародків, ізольованих на 12–15 добу після запилення. Незріле насіння польових рослин витримували 2 доби у холодильнику при температурі +4 °С, стерилізували 70 % етанолом протягом 3 хв, 30 % комерційним препаратом «Білізна» 5 хв, а також 0,01 Н розчином HCl 3 хв, після того тричі промивали стерильною дистильованою водою. Після видалення зародка із зернівки для індукції калусо-

генезу його висаджували у чашки Петрі із живильним середовищем Мурасіге-Скуга [20] (МС) щитком вгору. Для кожного сорту було взято по 160 експлантів. Культуру калюсної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило 2 мг/л 2,4-Д. Експланти культивували при 26 °С в темряві впродовж трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді ще протягом трьох тижнів. 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 сортів спостерігали вже з п'ятої доби культивування, при переході до дедиференціації на експлантах утворювалася калюсна тканина (рис. 1).

В ході роботи виявлено, що частота індукції калюсу досліджуваних сортозразків варіювала від 73,0 % до 49,6 % (табл. 1). Найбільшу частоту калюсоутворення спостерігали в сортів: Таврія (73,0 %), МІП Лакомка (72,3 %), Континент (69,1 %), найменшу – Золоте руно (49,6 %), Гавань (53,7 %).

При перенесенні на світло було виявлено два типи калюсу, які розрізнялися за морфофізіологічними властивостями: морфогенний, здатний до регенерації, що містив агрегати клітин із щільних сегментів жовтувато-білого кольору з ділянками зелених хлорофіловмісних клітин, і неморфогенний, не здатний

до морфогенезу, що складався з м'яких водянистих клітин білого кольору, при подальшому культивуванні яких спостерігали некроз (рис. 2).

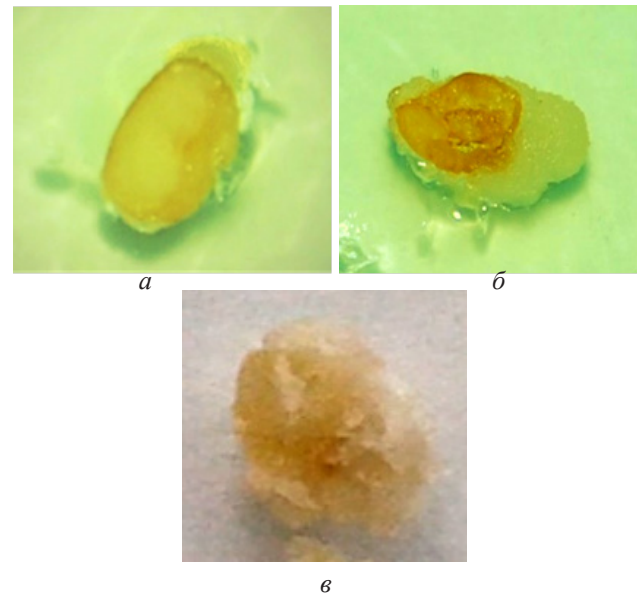


Рис. 1. Етапи індукції калюсу пшениці з незрілих зародків: а – вихідний експлант; б – початок калюсоутворення; в – сформований калюс

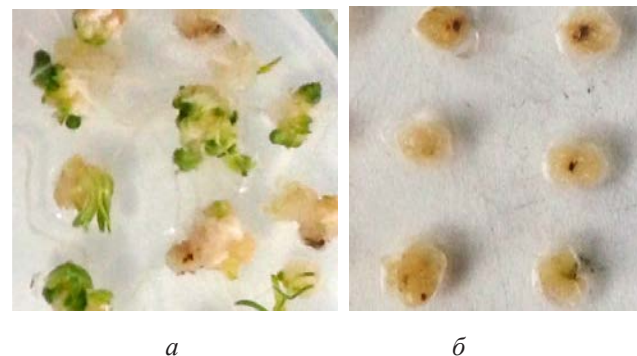


Рис. 2. Типи індукованих калюсів пшениці: а – морфогенні; б – неморфогенні

Вартозазначити, що отримання морфогенних калюсів і подальша регенерація з них рослин – невід'ємна частина багатьох рослинних біотехнологій [12].

Таблиця 1

Частота морфогенезу пшениці твердої озимої в культурі незрілих зародків

Сорт	Установа-оригіатор	Частота індукції калюсу, %	Частота утворення морфогенного калюсу, %
МІП Лакомка	МІП НААН	72,3±3,5	39,2±3,9
Бурштин	СГІ-НЦНС НААН	56,2±3,9	34,8±3,8
Гавань	СГІ-НЦНС НААН	53,7±3,9	30,6±3,6
Лагуна	СГІ-НЦНС НААН	56,6±3,9	34,8±3,8
Таврія	СГІ-НЦНС НААН	73,0±3,5	35,8±3,8
Золоте руно	СГІ-НЦНС НААН	49,6±4,0	24,9±3,4
Крейсер	СГІ-НЦНС НААН	63,5±3,8	27,6±3,5
Континент	СГІ-НЦНС НААН	69,1±3,7	33,5±3,7

Примітка: МІП – Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла, СГІ-НЦНС – Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

Найбільша частота утворення морфогенного калюсу виявлена в сортів МПП Лакомка (39,2 %), Таврія (35,8 %), найменша – Золоте руно (24,9 %) і Крейсер (27,6 %) (табл. 1).

У подальшому усі морфогенні калюси пересаджували на селективне середовище з 0,6 М маніту. Під час визначення виживаності калюсних культур пшениці твердої озимої на варіантах з манітом найбільшу частку живих калюсів спостерігали в сортів Таврія (33,4 %) і МПП Лакомка (30,7 %). Ці сорти виявились найменш чутливими до осмотичного стресу, оскільки мали найвищу частку життєздатних калюсів, що продовжували свій ріст і проявляли ознаки морфогенезу за селективних умов (рис. 3).

Нестійкі до осмотичного стресу калюси через 4–5 днів набували буро-коричневого кольору, а через 10–20 днів відмирили. Стійкі калюси мали щільну глобулярну структуру та темно-жовтий колір (рис. 4).

Стійкість до осмотичного стресу була найменшою в сорту Лагуна, оскільки у нього виживаність калюсів була найменшою – 15,3 %.

Таким чином, результати роботи підтвердили 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 стійкість до несприятливих факторів середовища

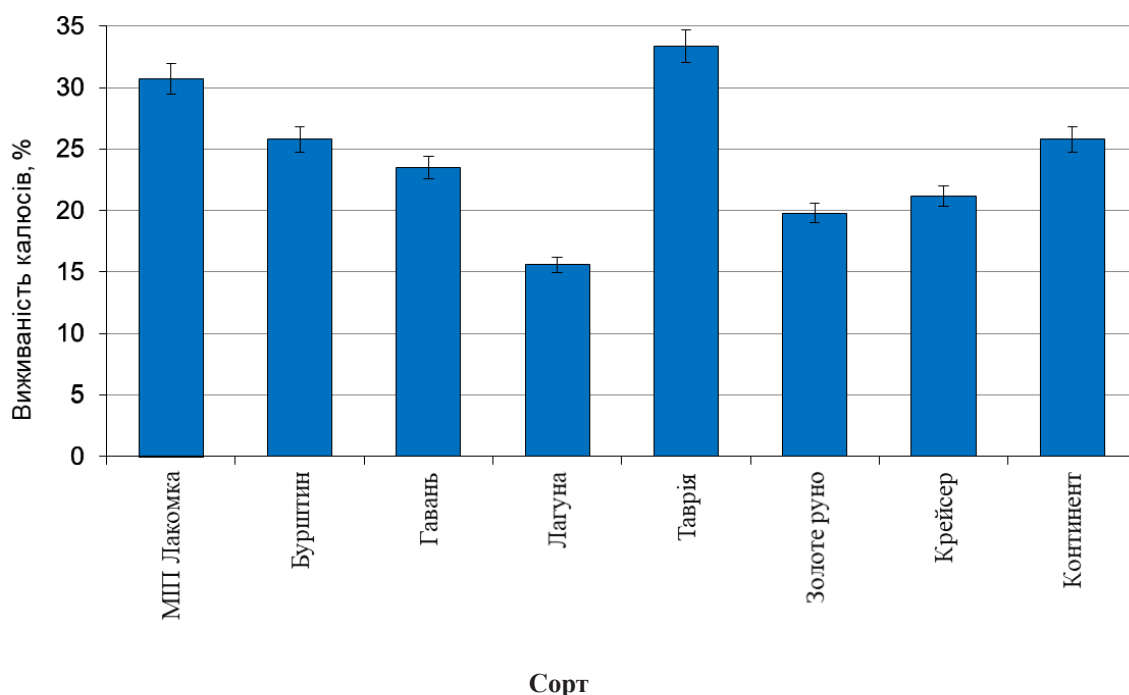


Рис. 3. Вживаність калюсів пшениці твердої озимої на селективному середовищі з 0,6 М маніту

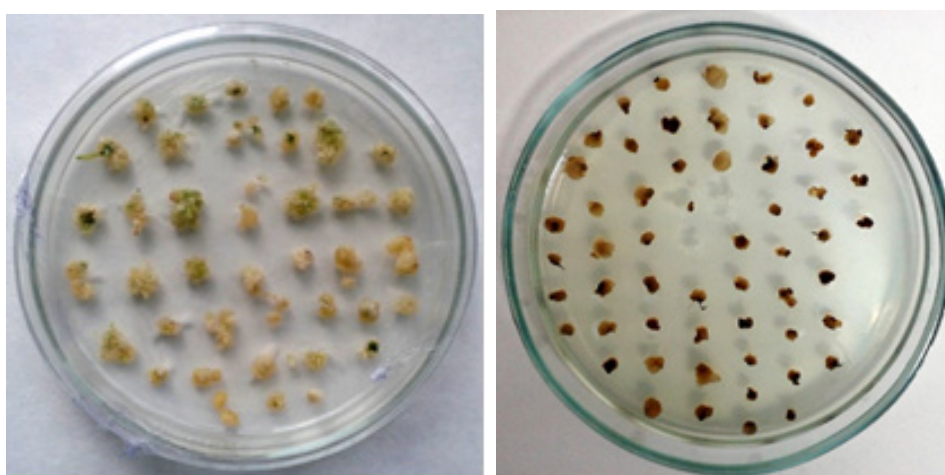


Рис. 4. Стійкі (а) та нестійкі (б) калюси пшениці твердої озимої на селективному середовищі з 0,6 М маніту

[10, 13, 15]. Зокрема, на прикладі генотипів м'якої пшениці виявлено істотний прямий кореляційний зв'язок між реакціями клітинних систем *in vitro* на водний дефіцит і посухостійкістю рослин у польових випробуваннях [21].

Головні висновки. Проведено скринінг *in vitro* сортів пшениці твердої озимої на посухостійкість в культурі незрілих зародків з використанням маніту в якості стрес-чинника. Різна генотипова реакція на осмотичний стрес у культурі *in vitro* проявлялась у неоднаковій реакції калюсів на дію селективного агента. У результаті досліджень виділено сорти пшениці твердої озимої, які характеризувались здатністю

до росту на селективному середовищі з осмотиком та зберігали ознаку стійкості протягом циклу культивування. За морфологічними властивостями виділено два типи калюсу: морфогенний і неморфогенний. Встановлено, що концентрація 0,6 М маніту дозволяє диференціювати генотипи пшениці твердої озимої за посухостійкістю. Виявлено, що найбільшу стійкість до осмотичного стресу мали сорти Таврія і МПП Лакомка, оскільки їх калюси за селективних умов відрізнялись підвищеним морфогенетичним потенціалом та мали найбільший рівень виживання. У вивчених сортів відмічено генотипову залежність процесів морфогенезу в культурі незрілих зародків.

Література

1. Demydov O., Khomenko S., Fedorenko M., Kuzmenko Ye., Pykalo S. Stability and plasticity of collection samples of durum spring wheat in the Forest-Steppe conditions of Ukraine. *American Journal of Agriculture and Forestry*. 2021. Vol. 9. No 2. P. 83–88. DOI: 10.11648/j.ajaf.20210902.16
2. Любич В.В. Хвороби і шкідники різних сортів пшениці твердої озимої. *Збірник Уманського НУС*. 2022. Вип. 1(100). С. 7–16. DOI: 10.31395/2415-8240-2022-100-1-7-16
3. Sabanci K., Aslan M. F., Durdu A. Bread and durum wheat classification using wavelet based image fusion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020. Vol. 100(15). P. 5577–5585. DOI: 10.1002/jsfa.10610
4. Франченко Л.О. Вирощування твердої пшениці в Україні – крок до поліпшення її конкурентоспроможності на світовому ринку. *Ефективна економіка*. 2013. № 7. С. 1–4.
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. Iss. 11. P. 1159–1168. doi: 10.1071/AR05069
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. Iss. 9. P. 1780–1792. doi: 10.20546/ijemas.2019.809.206
7. 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. Iss. 5. P. 935–943. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61102-9
8. 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. Excised leaf water status as a measure of drought resistance of Ukrainian spring wheat. *Studia Biologica*. 2019. Vol. 13. Iss. 2. P. 41–54. doi: 10.30970/sbi.1302.604
9. 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. DOI: 10.30970/vlubs.2020.82.05
10. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.
11. Моргун В. В., Дубровна О. В., Моргун Б. В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин та генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214. DOI: 10.15407/frg2016.03.196
12. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ: Логос, 2012. 428 с.
13. Pykalo S.V., Zinchenko M.O., Voloshchuk S.I., Dubrovna O.V. *In vitro* selection of winter triticale for the resistance to water deficit. *Biotechnologia Acta*. 2015. Vol. 8. Iss. 2. P. 69–77. DOI: 10.15407/biotech8.02.069
14. Pykalo S.V., Dubrovna O.V. Variability of the triticale genome in culture *in vitro*. *Cytology and Genetics*. 2018. Vol. 52. Iss. 5. P. 385–393. DOI: 10.3103/S0095452718050092
15. Дубровна О. В., Бавол А. В., Зінченко М. О., Лялько І. І., & Kruglova, N. М. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2011. Т. 9. № 1. С. 10–16.
16. Pykalo S.V. *In vitro* selection of genotypes of winter triticale for resistance to osmotic stress. In *Advances in genetics, plant breeding and cropping to improve grain production: Collected Abstracts of Int. Sci. Conf. of Young Researchers*. (p. 46). June 18, 2014, Myronivka, Ukraine.
17. 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.
18. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці. *Вісник Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2007. Т. 5. №1/2. С. 3–10.
19. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці. *Фізіологія та біохімія культ. рослин*. 2008. Т. 40. № 2. С. 150–156.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. No 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
21. 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. No 3. P. 25–34.