

СПОСІБ СТЕРИЛІЗАЦІЇ НЕЗРІЛИХ ЗЕРНІВОК ПШЕНИЦІ ТА ТРИТИКАЛЕ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ *IN VITRO* З ПОДАЛЬШИМ ДОБОРОМ НА СТРЕСОСТІЙКІСТЬ

Пикало С.В., Юрченко Т.В., Харченко М.В., Волощук Г.Д., Пірич А.В.

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України

08853, с. Центральне, Київська обл.

pykserg@ukr.net

Пшениця – одна з найцінніших зернових культур у світі. Останніми роками спостерігається зростання інтересу до тритикале, зумовлене його значним фізіолого-генетичним потенціалом продуктивності. Сучасним інноваційним напрямом, що дає змогу розширити спектр вихідного матеріалу й активізувати селекційний процес, спрямований на створення високопродуктивних стресостійких сортів, є біотехнологія. Біотехнологічні методи культури *in vitro* різних експлантів нині широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції пшениці та тритикале. В експлантах і, як наслідок, в індукованих з них калюсів та рослин-регенерантів може проявлятися інфекція, яка є як на поверхні (зовнішня), так і всередині (внутрішня) рослинного матеріалу. Для знезараження вихідного матеріалу існує низка методів із застосуванням різних реагентів та експозицій. Переважна їх більшість на сьогодні неоптимальні, внаслідок чого актуальним залишається завдання створення нових та удосконалення існуючих способів. У представленій роботі наведено порівняльну характеристику різних методів знезараження, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Розроблено ефективний спосіб стерилізації незрілих зернівок пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro*, який охороняється патентом на корисну модель. Запропонований метод відрізняється від існуючих аналогів концентрацією та співвідношенням стерилізуючих агентів, а також тривалістю обробки. Рослинний матеріал по чергово ретельно знезаражують стерилізаторами за наступною послідовністю: 70 % етанол – 3 хв; 30 % промисловий препарат «Білізна» – 5 хв; 0,01 Н розчин соляної кислоти – 3 хв; трикратне промивання стерильною дистильованою водою. Спосіб дозволяє отримати життєздатний стерильний рослинний матеріал для введення *in vitro*, а ефективність стерилізації становить 95–99 %. Застосування цього методу в селекції пшениці та тритикале сприятиме створенню нових конкурентоспроможних сортів з цінними практичними властивостями. Результати досліджень вносять певний вклад у вдосконалення біотехнологічних прийомів розширення генетико-селекційного потенціалу зернових культур. *Ключові слова:* пшениця, тритикале, спосіб, стерилізація, незрілі зернівки, культура *in vitro*.

Method for sterilization of immature wheat and triticale kernels for *in vitro* culture followed by selection for stress tolerance.
Pykalo S., Yurchenko T., Kharchenko M., Voloshchuk H., Piryach A.

Wheat is one of the most valuable cereal crops in the world. In recent years, there has been growing interest in triticale due to its considerable physiological and genetic potential for productivity. A modern and innovative approach that enables the expansion of the initial material base and enhances the breeding process aimed at developing high-yielding and stress-tolerant varieties is biotechnology. *In vitro* biotechnological methods using various explants are now widely applied to address practical challenges in wheat and triticale breeding. Explants and consequently the callus and regenerated plants induced from them may contain infections, both on the surface (external) and within the plant tissue (internal). There are numerous methods for disinfecting source material using different reagents and exposure times. However, most existing methods remain suboptimal, highlighting the relevance of developing new and improving existing techniques. This study presents a comparative analysis of various sterilization methods, each with its own advantages and drawbacks. An effective method for sterilizing immature wheat and triticale grains for *in vitro* culture has been developed and is protected by a utility model patent. The proposed method differs from existing analogs in the concentration and ratio of sterilizing agents used, as well as the duration of treatment. The plant material is sequentially and thoroughly sterilized using the following steps: 70% ethanol for 3 minutes; 30% industrial bleach ("Bilyzna") for 5 minutes; 0.01 N hydrochloric acid solution for 3 minutes; followed by triple rinsing with sterile distilled water. This method allows for the producing viable sterile plant material suitable for *in vitro* introduction, with a sterilization efficiency of 95–99%. The application of this method in wheat and triticale breeding will contribute to the development of new, competitive varieties with valuable practical traits. The research results contribute to the improvement of biotechnological approaches aimed at expanding the genetic and breeding potential of cereal crops. *Key words:* wheat, triticale, method, sterilization, immature kernels, *in vitro* culture.

Постановка проблеми. Пшениця є основною зерновою культурою у світі, від якої залежить основа продовольчої безпеки та формування експортного потенціалу держави [1]. Тритикале поєднує низку господарсько-біологічних особливостей – високий потенціал урожайності зерна та зеленої маси, під-

вищені адаптивні властивості, комплексний імунітет до грибних захворювань, високий вміст білка й лізину в зерні [2]. На сьогоднішній день зміна клімату впливає на низку екологічних стресових чинників, які визначають адаптивність і продуктивність зернових колосових культур [3; 4].

Біотехнологічні методи культури *in vitro* різних експлантів (органів або частин органів, ізольованих від донорної рослини) нині широко використовуються для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин [5; 6]. Проте в експлантах і, як наслідок, в індукованих з них калюсах та рослин-регенерантів може проявлятися різноманітна інфекція, яка є як на поверхні (зовнішня), так і всередині (внутрішня) рослинного матеріалу [7].

Актуальність дослідження. Впродовж останніх десятиліть біотехнологія зайняла вагоме місце поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінювання стресостійкості рослин [5; 6]. Використання сучасних біотехнологічних інструментів дозволяє значно зменшити строки селекційного добору та сортової ідентифікації, що активно впроваджується селекціонерами в усьому світі.

Значне місце в селекції зернових колосових культур відводиться використанню клітинних технологій, які створюють генетичне розмаїття на рівні соматичних клітин, з наступним скринінгом генотипів з господарсько цінними ознаками. Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, де немає механізмів регуляції, що діють на рівні цілого організму [8]. На сьогодні метод культури *in vitro* є ефективним інструментом для розв'язання практичних завдань селекції широкого спектра сільськогосподарських культур [9]. Важливою властивістю соматичних рослинних тканин є здатність до регенерації повноцінних рослин завдяки тотипотентності клітин [10]. Культивування ізольованих тканин *in vitro* ґрунтується на використанні калюсних культур та є безпечною для довкілля, економічно доступною і ресурсоефективною технологією для оцінювання стійкості генотипів до стресових чинників довкілля [11].

Зв'язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Представлені матеріали є частиною таких науково-дослідних робіт: «Особливості формування ознак і властивостей зернових культур, які визначають стійкість до абіотичних стресових чинників, в умовах Лісостепу України з використанням біотехнологічних та фізіолого-генетичних методів» (номер державної реєстрації № 0121U100435).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Сучасним і принципово новим підходом у селекції пшениці та тритикале є впровадження біотехнологічних методів, що значною мірою оптимізують і пришвидшують традиційний процес створення нових сортів. За останні десятиліття біотехнологія здобула широке поширення як один із найперспективніших інструментів у сільськогосподарських дослідженнях [5; 6]. Поєднання біотехнологічних методів селекції із класичними забезпечує розвиток нових стратегій генетичного удосконалення рослин і підвищення їх продуктивності, що зумовлює

активне використання таких підходів селекціонерами в усьому світі [9]. Застосування біотехнологій дозволяє скоротити тривалість селекційного циклу, необхідного для створення сортів з покращеними господарсько цінними ознаками, а також сприяє розширенню спектра генетичної варіабельності, необхідної для отримання нових форм із заданими властивостями [6; 12].

Попри те, що культура *in vitro* злакових рослин уже тривалий час є об'єктом наукових досліджень, представники триби *Gramineae* досі залишаються одними з найскладніших у плані застосування біотехнологічних методів. Однією з основних проблем, що стримують ефективне використання клітинних технологій у селекції злакових, є низька регенераційна здатність тканин, отриманих у результаті культивування. Ключовим чинником, що визначає успішність біотехнологічних процедур для цієї групи культур, є правильний вибір типу експланта [13]. Для індукції калюсу з соматичних клітин використовують такі вихідні матеріали, як незрілі й зрілі зародки, молоді суцвіття, сегменти колеоптиля, мезокотилі, молодих листків і апікальні меристеми пагонів [14; 15]. Незрілі зародки традиційно вважаються одним із найбільш ефективних типів експлантів у злакових культур [16]. Це зумовлено їх високою проліферативною активністю та морфогенетичною компетентністю всіх тканин при культивуванні *in vitro* [10], що дає змогу мінімізувати вплив зниження проліферативної здатності, характерного для спеціалізованих тканин, на результати досліджень. Відомо також, що ефективність регенерації з різних типів експлантів залежить від того, на якій стадії розвитку (оптимальній або неоптимальній) вони були відібрані для отримання первинних калюсів [14; 16].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Так як поживні середовища, що використовуються для введення рослинного матеріалу в культуру *in vitro*, одночасно сприяють розвитку різноманітних мікроорганізмів, подальша життєздатність експлантів безпосередньо залежить від ефективності початкової стерилізації вихідного матеріалу [16]. Дослідження показали, що інфекційні агенти, локалізовані як на поверхні, так і у внутрішніх тканинах експлантів, можуть проявлятися як на ранніх етапах культивування, так і на пізніших стадіях розвитку рослин-регенерантів [7]. Це супроводжується помітним зниженням частоти поділу соматичних або ембріональних клітин, а також іншими негативними змінами ростових показників. В окремих випадках певні мікроорганізми здатні зберігати латентний стан упродовж кількох пасажів культури, активуючись і починаючи розмноження лише згодом. Тому після відбору донорного матеріалу в польових умовах слід обов'язково проводити його ретельну дезінфекційну обробку. Для більшості культур відомою є узагальнена схема стерилізації насіння, яка перед-

бачас послідовне застосування ряду дезінфікуючих агентів (етанолу, хлоровмісних, срібловмісних або ртутних препаратів), триразове промивання стерильною дистильованою водою та подальше висаджування виділених експлантів на живильне середовище для культивування *in vitro* [17]. Хоча дана методика є базовою для різних культур, вона потребує індивідуального підбору типу стерилізуючих речовин і тривалості їх дії.

Мета роботи – розробити ефективний спосіб поверхневої стерилізації незрілих зернівок пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro* з подальшим добром на стійкість до несприятливих чинників довкілля.

Новизна. Розроблено спосіб стерилізації незрілих зернівок пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro*, що включає послідовне знезараження рослинного матеріалу дезінфікуючими агентами. Новим є те, що насіння по чергово обробляють за схемою: 70 % етанол – 3 хв; 30 % промисловий препарат «Білізна» – 5 хв; 0,01 Н розчин соляної кислоти – 3 хв; стерильна дистильована вода (трикратна обробка). Запропонований спосіб охороняється патентом на корисну модель (№152327 від 11.01.2023, бюл. № 2) [18]. Розроблений метод дозволяє отримати життєздатний стерильний рослинний матеріал для подальшого введення в культуру *in vitro*, а ефективність стерилізації становить 95–99 %.

Методологічне або загальнонаукове значення. Запропонований спосіб стерилізації вихідного рослинного матеріалу пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro* доповнить методологію та сприятиме створенню нових сортів із цінними практичними властивостями. Спосіб може бути використаний у селекційних центрах, науково-дослідних установах та на дослідних станціях.

Виклад основного матеріалу. Для стерилізації рослинних експлантів зазвичай застосовують розчини, що містять активний хлор (наприклад, хлорамін, гіпохлорит натрію чи кальцію, сулема), бром (бромна вода), а також пероксид водню, етанол, нітрат срібла, діацид або антибіотики. У разі роботи з незрілими зернівками рослин, вирощених у відкритому ґрунті, також використовуються адаптовані методи стерилізації, придатні для введення в культуру *in vitro* представників різних сортів злакових культур [16; 19]. А.В. Бавол та співавтори розробили і апробували метод [16], згідно з яким спочатку здійснюють поверхневу стерилізацію колосся шляхом обробки 70 % розчином етилового спирту, після чого проводили стерилізацію незрілих зернівок. Для цього послідовно застосовували: 1 % розчин перманганату калію – 2 хвилини; 70 % етанол – 2 хвилини; 30 % розчин промислового препарату «Білізна» – 10 хвилин; триразова обробка стерильною дистильованою водою.

Найбільш близьким по технічній суті є спосіб стерилізації [20], відповідно до якого незрілі зернівки пшениці, зібрані на 12–16-ту добу після запи-

лення, стерилізують у наступній послідовності: 1) 70 % етанол – 30 с; 2) гіпохлорит натрію – 12 хв; 3) триразове промивання стерильною дистильованою водою. Проте недоліком цього способу є те, що за його використання ефективність стерилізації не перевищує 85 %, в той час як для масового введення в культуру *in vitro* необхідні способи, які б забезпечували стерилізацію рослинного матеріалу в межах 95–100 %. Окрім того, при нашій спробі застосувати цю схему стерилізації відмічено негативний вплив тривалої дії (12 хв) гіпохлориту натрію на зернівки, що проявлялось у порівняно низькому відсотку виходу життєздатних експлантів. Тому перед нами постала необхідність створити спосіб, який дозволить зручно, швидко і максимально ефективно стерилізувати незрілі зернівки пшениці та тритикале з метою подальшого виділення з них зародків та введення їх в культуру *in vitro*.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі стерилізації незрілих зернівок пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro* рослинний матеріал по чергово обробляють стерилізуючими агентами за наступною послідовністю: 1) 70 % етанол – 3 хв; 2) розчин гіпохлориту натрію, збагачений активним хлором (промисловий препарат «Білізна»), у концентрації 30 % – 5 хв; 3) 0,01 Н розчин соляної кислоти (HCl) – 3 хв; 4) трикратне промивання стерильною дистильованою водою. Введення додаткового проміжного етапу промивання незрілих зернівок розчином HCl дозволяє зменшити токсичний вплив на них хлорвмісного препарату. Цей спосіб дозволяє отримати життєздатний стерильний рослинний матеріал пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro*, а ефективність стерилізації за такого підходу становить 95–99 %. Це значно полегшує роботу та зменшує втрати рослинного матеріалу, як на початкових, так і на наступних етапах культивування.

Запропонований спосіб включає нижче перераховані процеси. На 14–16-ту добу після запилення рослин у польових умовах зрізають їх колоси. Далі відокремлюють зернівки центральної частини колосу та поміщають їх у чашки Петрі по 50 шт. для стерилізації. Стерилізацію реагентами проводять в умовах ламінар-боксу, у стерильних хімічних склянках у декілька етапів: 1) 70 % етанол – 3 хв; 2) 30 % промисловий препарат «Білізна» – 5 хв; 3) 0,01 Н розчин HCl – 3 хв; 4) трикратне промивання стерильною дистильованою водою. В подальшому із зернівок виділяють зародки і висаджують їх у чашки Петрі із живильним середовищем Мурасіге-Скуга [21] для індукції калюсу щитком вгору. При дотриманні вищезазначеної методики вдасться досягти максимальної стерильності незрілих зернівок пшениці та тритикале для подальшого введення в культуру *in vitro*.

Головні висновки. Таким чином, у результаті проведених досліджень розроблено спосіб стерилізації

лізації незрілих зернівок пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro*, який охороняється патентом на корисну модель. Наведено порівняльну характеристику різних методів знезаражування рослинного матеріалу, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Запропонований метод відрізняється від існуючих аналогів концентрацією та співвідношенням стерилізуючих агентів, а також тривалістю обробки. Спосіб дозволяє отримати життєздатний стерильний рослинний матеріал для подальшого

введення його в культуру *in vitro*, а ефективність стерилізації становить 95–99 %.

Перспективи використання результатів дослідження. Використання даного методу в селекції пшениці та тритикале сприятиме створенню нових сортів, які мають цінні практичні властивості. Результати досліджень вносять певний вклад у вдосконалення біотехнологічних прийомів розширення генетико-селекційного потенціалу зернових колосових культур.

Література

1. Гамаюнова В.В., Корхова М.М., Панфілова А.В. та ін. Пшениця озима: ресурсний потенціал та технологія вирощування. Миколаїв: МНАУ, 2021. 300 с.
2. Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *Journal of Agricultural Science*. 2005. Vol. 143. Iss. 5. P. 329–346.
3. Johansson E., Muneer F., Prade T. Plant breeding to mitigate climate change – present status and opportunities with an assessment of winter wheat cultivation in Northern Europe as an example. *Sustainability*. 2023. Vol. 15. Iss. 16. 12349.
4. Zahra N., Hafeez M. B., Wahid A. et al. Impact of climate change on wheat grain composition and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2023. Vol. 103. Iss. 6. P. 2745–2751.
5. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2016. Т. 48. № 3. С. 196–214.
6. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.
7. Поліщук В.В., Турчина С.Я., Осіпов М.Ю. Підбір стерилізатора для введення *in vitro* донорного матеріалу досліджуваних сортів *Callistephus chinensis* (L.) Ness. з метою подальшого використання в озелененні. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2019. Т. 29. № 5. С. 22–26.
8. Lestari E.G. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*. 2006. Vol. 7. Iss. 3. P. 297–301.
9. 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.
10. Dodig D., Zorić M., Mitić N. et al. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2008. Vol. 95. N 1. P. 107–114.
11. Sigurbjörnsson E. Application of *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*. 1995. Vol. 85. Iss. 1-3. P. 303–315.
12. Dubrovna O.V., Baval A.V. Variability of the wheat genome during *in vitro* culture. *Cytology & Genetics*. 2011. Vol. 45. N 5. P. 333–340.
13. 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.
14. 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.
15. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*. 2014. Т. 46. № 3. С. 245–251.
16. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці. *Фізіологія і біохімія культурних рослин*. 2008. Т. 40. № 2. С. 150–156.
17. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 270 с.
18. Спосіб стерилізації незрілого насіння пшениці та тритикале для введення в культуру *in vitro*: пат. 152327 Україна: МПІК А01Н 1/00. № 202202662, заявл. 25.07.2022; опубл. 11.01.2023 р., Бюл. № 2. 5 с.
19. Fahmy A.H., El-Shafy Y.H., El-Shihy O.M., Madkour M. A highly efficient regeneration system via somatic embryogenesis from immature embryos of Egyptian wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using different growth regulators. *Arab Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 7. No. 2. P. 229–238.
20. Кваско А.Ю., Ісаснков С.В., Дмитрук К.В., Ємець А.І. Створення рослин пшениці з дріжджовими генами біосинтезу треталози *TPS1* і *TPS2*. *Доповіді Національної академії наук України*. 2020. № 6. С. 92–100.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. Iss. 3. P. 473–497.