

ПИКАЛО С.В.^{1✉}, ДУБРОВНА О.В.², ДЕМИДОВ О.А.¹

¹ Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла НААН України, Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне, вул. Центральна, 68

² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

✉ pykserg@ukr.net, (097) 659-12-65

КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) – новий ботанічний рід злакових, штучно виведений селекціонерами шляхом схрещування пшениці та жита, який поєднує цінні господарські та біологічні характеристики, притаманні вихідним видам [1]. Водночас, наявні сорти і селекційні форми тритикале недостатньо пластичні через обмежене генетичне різноманіття вихідного матеріалу [2, 3]. Важливе значення для селекційного вдосконалення тритикале має його стійкість до абіотичних стресових чинників довкілля, зокрема до засолення ґрунтів [4–6]. Як відомо, сольовий стрес виникає в рослинному організмі внаслідок порушення осмотичного та іонного гомеостазу, окрім того, також додається вторинний окислювальний стрес [7–9].

Класичні селекційно-генетичні методи створення стресостійкого матеріалу, засновані на традиційних схрещуваннях, мають досить тривалий термін добору, обмежені полігенним контролем шуканої ознаки і часто є малоефективними [10]. Стійкість рослин до несприятливих факторів, зокрема засолення ґрунтів, генетично детермінована і проявляється на різних рівнях організації, в тому числі на рівні клітини [11, 12]. Це дозволяє використовувати біотехнологічні підходи, засновані на клітинних технологіях *in vitro*, що, з одного боку, надає можливість розширити генетичну різноманітність рослин, безпосередньо впливаючи на генетичний апарат, а з іншого – створити системи прямого відбору стійких генотипів [13–16]. Одним із біотехнологічних методів створення стійких генотипів є біотехнології і, зокрема, клітинна селекція [13, 14]. Клітинну селекцію можна розглядати як розвиток мутаційної селекції, що реалізується на рівні поодиноких клітин із використанням техніки *in vitro*, що надає їй, з одного боку, більш широкі можливості, а з іншого – створює значні труднощі через необхідність регенерації з окремих клітин повноцінних рос-

лин [15–17]. Дослідження ж з отримання біотехнологічними методами стійких до засолення генотипів тритикале вкрай обмежені, тому в літературі можна знайти лише одиничні роботи з добору *in vitro* солестійких форм [18–20]. Підвищення стійкості тритикале до сольового стресу з використанням клітинної селекції потребує поглибленого вивчення низки теоретичних та методичних питань, вирішення яких є основою для вдосконалення біотехнологічних прийомів розширення генетичного потенціалу цієї культури і отримання стійких генотипів. У зв'язку з цим метою роботи було проведення селекції *in vitro* для одержання калюсних ліній та рослин-регенерантів тритикале озимого, стійких до модельованого сольового стресу, з використанням хлориду натрію як стрес-чинника.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були генотипи тритикале озимого селекції Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН: лінія 38/1296 та сорт Обрій. Для отримання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1 %-им розчином $KMnO_4$ протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували у 1 %-у розчині $AgNO_3$ і поміщали у 96 %-ий етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було промивання стерильною дистильованою водою. Простерилізоване насіння пророщували в скляному посуді об'ємом 200 мл, у який було розлито по 30 мл живильного середовища Мурасіге-Скуга (МС) [21] без фітогормонів. У якості експланта використовували апікальні меристеми пагонів 3-добових стерильних проростків. Калюс індукували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін – 150 мг/л, $AgNO_3$ – 10 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д. Експланти культивували при 26°C у темряві протягом двох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3–4 клк, відносній вологості повітря 70 %

і 16-годинному фотоперіоді ще протягом 3-х тижнів. Калюси висаджували у чашки Петрі, використовуючи в якості селективного агента хлорид натрію, який додавали до модифікованого середовища МС у концентраціях 0,6–1,2 %.

Для добору солестійких калюсних ліній проводили пряму та ступінчасту клітинну селекцію. Прямий добір проводили за схемою: індукція калюсу та його розмноження (2 пасажі) → селективне середовище з 1,2 % NaCl маніту (3 пасажі) → середовище МС (1 пасаж) → селективне середовище з 1,2 % NaCl (2 пасажі) → регенерація пагонів (1 пасаж). Ступінчасту селекцію вели за схемою: індукція калюсу та його розмноження (2 пасажі) → селективне середовище з 0,6 % NaCl (1 пасаж) → селективне середовище з 0,9 % NaCl (1 пасаж) → селективне середовище з 1,2 % NaCl (1 пасаж) → середовище МС (1 пасаж) → селективне середовище з 1,2 % NaCl (2 пасажі) → регенерація пагонів (1 пасаж). Після кожного пасажу 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 і більше, а решту вважали живими. Отримані стійкі калюси розділяли на дрібніші шматочки і знову висаджували на середовище МС для нарощування біомаси та регенерації з них пагонів.

Регенерацію пагонів індукували на модифікованому середовищі МС-3/7 [22] без NaCl, відсаджуючи пагони, що утворилися, на середовище без фітогормонів. Частоту регенерації пагонів визначали як відсоткове відношення кількості калюсів, що утворили хоча б один пагін, до початкової кількості стійких калюсів. Калюс, що утворював пагони, переносили на модифіковане середовище МС з половинним

вмістом макроелементів та доповнене НОК концентрацією 1 мг/л для укорінення. Укорінені проростки пересаджували в стерильний ґрунт і поміщали у вологу камеру на 7–14 діб. Потім їх яровизували в холодильній камері при температурі +4°C і далі вже вирощували в умовах вегетаційного будиночка до фази повної стиглості зерна. Експериментально отримані дані обробляли методами статистичного аналізу [23].

Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях було виявлено, що концентрація 1,5 % NaCl для більшості калюсних культур тритикале була летальною, тому для проведення селекції *in vitro* ми використовували концентрації 0,6–1,2 % NaCl (табл. 1).

Протягом досліджень життєздатність калюсів перевіряли в селективних і неселективних умовах, а також порівнювали ефективність застосування прямої та ступінчастої клітинної селекції. Виявлено, що за прямого добору на середовищі з 1,2 % NaCl до кінця першого пасажу у лінії 38/1296 та сорту Обрій виживало майже 48 і 41 % калюсів відповідно. Після трьох пасажів у селективних умовах частка живих калюсів у вищевказаних генотипів складала 35 та 24 % відповідно.

Після пасажу на середовищі без селективного фактора і перевірки росту в селективних умовах було отримано 10 % резистентних клонів – у лінії 38/1296, та 8 % – в сорту Обрій. Таким чином, елімінація чутливих до хлориду натрію калюсів відбувалася протягом шести пасажів. Виділені варіанти характеризувалися приростом біомаси на селективному середовищі і стабільно зберігали морфогенетичний потенціал.

Таблиця 1. Динаміка виживання калюсів тритикале на селективному середовищі з хлоридом натрію за прямого та ступінчастого добору

Метод добору	Пасаж	Концентрація NaCl, %	Кількість живих калюсів за генотипами			
			Лінія 38/1296		Сорт Обрій	
			%	шт.	%	шт.
Прямий	1	1,2	47,8±2,5	191	41,2±2,5	164
	3	1,2	34,6±2,4	138	24,1±2,1	96
	6	1,2	10,2±1,5	41	8,1±1,4	32
Ступінчастий	1	0,6	81,3±1,9	325	73,7±2,2	294
	2	0,9	62,0±2,4	248	54,2±2,5	216
	3	1,2	36,9±2,4	147	23,8±2,1	95
	6	1,2	18,1±1,9	72	10,7±1,5	42

Окрім прямого добору, ми також проводили ступінчасту селекцію, яка полягала у поступовому збільшенні вмісту у середовищі NaCl. При цьому клітинні лінії, культивовані на середовищах із низьким вмістом солі, пересаджували на середовища з вищим рівнем засолення, що підвищувало тиск стресового агента. За ступінчастого добору до кінця шостого пасажу у лінії 38/1296 та сорту Обрій було отримано відповідно близько 18 та 11 % живих калюсів. Отже, ступінчастий добір виявився більш ефективним, оскільки в результаті його застосування було виділено порівняно більше стійких калюсних форм.

У ході культивування калюсів на стресових фонах із різними концентраціями хлориду натрію зменшувалася і їх морфогенна здатність. Нестійкі до сольового стресу калюси через 4–5 днів набували буро-коричневого кольору, а через 10–20 днів, залежно від рівня засолення середовища, відмирали. Солестійкі клітинні лінії мали такі морфологічні характеристики: щільний калюс із глобулярною структурою темно-жовтого кольору (рис. 1).

Із виділених варіантів, здатних рости на селективних середовищах з 1,2 % NaCl, у лінії 38/1296 та сорту Обрій було отримано відповідно по 5 і 4 стійких калюсних лінії, які стабільно зберігали морфогенетичний потенціал. Лінії 1Л/сл та 2Л/сл отримано прямим добором, а лінії 3Л/сл, 4Л/сл та 5Л/сл – ступінчастим із калюсних культур лінії 38/1296. У сорту Обрій прямим добором отримано лінії 1С/сл та 2С/сл, а ступінчастим – лінії 3С/сл та 4С/сл. Для одержання більшої вибірки досліджуваного матеріалу і, як наслідок, отримання достовірніших результатів виділені стійкі калюси розділяли на дрібніші шматочки і знову садили на середовище МС для нарощування їхньої біомаси.

Слід відмітити, що довготривале культивування калюсних культур тритикале призвело до зниження їх регенераційної здатності, оскільки наявність у живильному середовищі солі викликало різке пригнічення морфогенних процесів. У наших експериментах частота регенерації пагонів зі стійких клітинних ліній була на рівні 7,2–12,1 % – у лінії 38/1296, та 4,9–11,1 % – у сорту Обрій, що достовірно нижче,

ніж в умовах контролю обох генотипів (табл. 2).

Варто підкреслити, що за проведення ступінчастого добору ву отриманих солестійких калюсних ліній обох генотипів частота регенерації пагонів і, як наслідок, кількість індукованих регенерантів були дещо вищими, ніж за прямого. Крім того, часто спостерігався ризогенез або утворювалися пагони, які поступово припиняли свій ріст. Калюс, що утворював пагони, переносили на модифіковане середовище МС з половинним вмістом макроелементів та доповнене НОК концентрацією 1 мг/л для укорінення (рис. 2).

Укорінені пагони пересаджували в стерильний ґрунт і поміщали у вологу камеру на 7–14 діб. Потім їх яровизували в холодильній камері при температурі +4°C і далі вже вирощували в умовах вегетаційного будиночка до фази повної стиглості зерна.

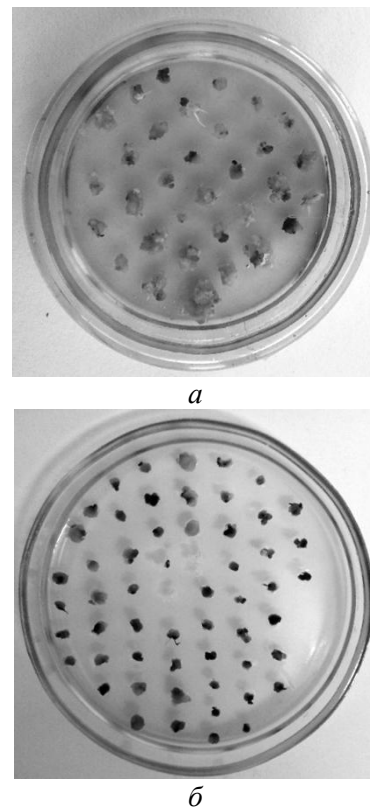


Рис. 1. Стійкі (а) та нестійкі (б) калюси тритикале на селективному середовищі з 1,2 % NaCl в кінці шостого пасажу культивування.

Таблиця 2. Частота регенерації пагонів на модифікованому середовищі МС-3/7 із стійких калюсних ліній тритикале

Генотип	Калюсна лінія	Частота регенерації пагонів за різних методів добору, %		Отримано рослин-регенерантів за різних методів добору, шт.	
		прямий	ступінчастий	прямий	ступінчастий
Лінія 38/1296	Контроль	37,2±3,4		63	
	1Л/сл	8,1±1,9*	-	10	-
	2Л/сл	11,3±2,2*	-	12	-
	3Л/сл	-	6,9±1,8*	-	8
	4Л/сл	-	13,2±2,4*	-	19
	5Л/сл	-	11,8±2,3*	-	15
Сорт Обрій	Контроль	23,9±3,0		36	
	1С/сл	6,1±1,7*	-	8	-
	2С/сл	4,4±1,5*	-	6	-
	3С/сл	-	11,3±2,2*	-	12
	4С/сл	-	5,0±1,5*	-	7

Примітка. *різниця між контролем та дослідом достовірна при $p \leq 0,05$.

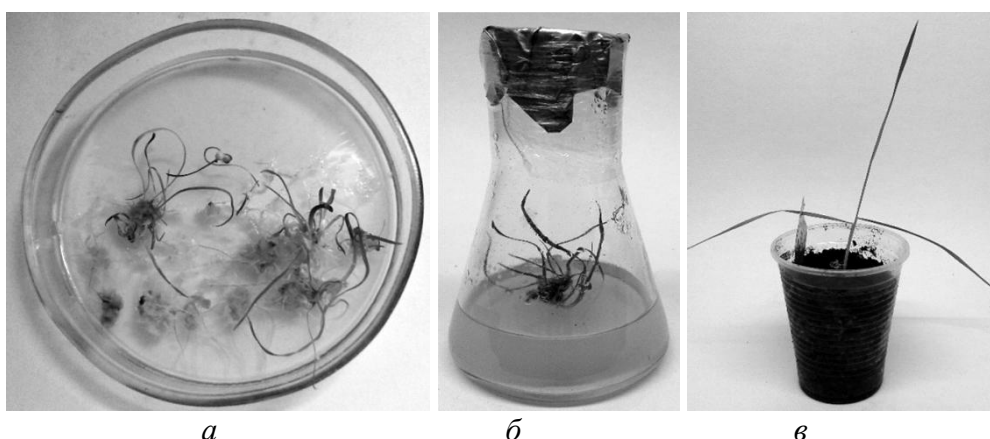


Рис. 2. Індукція пагонів із стійких калюсних ліній (а), укорінення пагонів (б) та переведення рослин-регенерантів в умови ґрунту (в).

Висновки

Таким чином, із використанням селективної системи з хлоридом натрію проведено пряму та ступінчасту селекцію *in vitro* і здійснено добір калюсних ліній тритикале озимого, стійких до сольового стресу. Ступінчастий добір виявився ефективнішим, оскільки в результаті його застосування виділено більше стійких

калюсних форм. У лінії 38/1296 та сорту Обрій було виділено відповідно 5 і 4 стійких калюсних ліній, які мали високий рівень виживання на селективному середовищі з 1,2 % NaCl і зберігали морфогенетичний потенціал. Із стійких культур індуковано рослини-регенеранти та оптимізовано їх дорошування, укорінення та переведення в умови *in vivo*.

Література

1. Москалець В.В., Москалець Т.З. Деякі історичні аспекти виведення та етапи селекційної роботи з тритикале // Вісник Національного університету водного господарства та природокористування. – 2012. – Т. 4, № 60. – С. 136–153.
2. Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future // J. Agric. Sc. – 2005. – V. 143, № 5. – р. 329–346.
3. Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В., Починок В.М. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале // Физиология растений и генетика. – 2015. – Т. 47, № 2. – р. 95–111.

4. 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: Сб. научн. труд. – Минск, 2013. – Т. 14. – С. 77–83.
5. Авдеев Ю.И., Слашева Л.А. Устойчивость озимой тритикале к экстремальным абиотическим факторам среды в аридной зоне возделывания // Астр. Вест. Экол. Обр. – 2014. – Т. 29, № 3. – С. 84–87.
6. Blum A. The abiotic stress response and adaptation of triticale – a review // Cereal Research Communications. – 2014. – V. 42, № 3. – P. 359–375.
7. Krasensky J., Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks // J. Exper. Bot. – 2012. – V. 63, № 4. – P. 1593–1608.
8. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // Critical Reviews in Plant Sciences. – 2005. – V. 24, № 1. – P. 23–58.
9. Zhu J.-K. Salt and drought stress signal transduction in Plants // Annu Rev Plant Biol. – 2002. – V. 53. – P. 247–273.
10. 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.
11. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – 160 с.
12. Соловьян В.Т. Приспособление клеток к неблагоприятным факторам. Характеристика адаптивных ответов // Биополимеры и клетка. – 1990. – Т. 6, № 4. – С. 32–42.
13. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 463–476.
14. Калашникова Е.А. Биологические основы клеточной селекции растений // Доклады ТСХА. – 2003. – № 275. – С. 110–112.
15. Lestari E.G. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance // Biodiversitas. – 2006. – V. 7. – p. 297–301.
16. Игнатова С.А. Клеточные биотехнологии в растениеводстве, генетике и селекции растений: задачи, возможности разработки систем *in vitro*. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.
17. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress // Environ. Exper. Bot. – 2011. – V. 71. – P. 89–98.
18. Cheng-he Z., Jun C., Wen-kui B. Selection and characterization of high pH resistant or salt resistant variants from haploid triticale callus (n=28) // Acta Bot Sin. – 1986. – V. 28. – p. 137–144.
19. Wang X.-J. Genetic mechanism of the occurrence of salt-tolerant variant of octoploid triticale under tissue and cell culture // Acta Botanica Sinica. – 1998. – V. 40, № 4. – p. 330–336.
20. Sudyova V., Slikova S., Galova Z. Testing wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (*Triticosecale* Witt.) callus to salt tolerance // Acta Fytotechn. Zootechn. – 2002. – V. 3. – P. 67–71.
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 13. – P. 473–497.
22. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О. Спосіб підвищення регенераційної здатності калусних культур м'якої пшениці, стійких до метаболітів *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* та водного дефіциту. Патент України на корисну модель № 81752 від 10.07.2013. Бюл. № 13.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

PYKALO S.V.¹, DUBROVNA O.V.², DEMYDOV. O.A.¹

¹ V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Ukraine, 08853, Kyiv region, Tsentralne v., Tsentralna str., 68

² Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: pykserg@ukr.net

IN VITRO SELECTION OF WINTER TRITICALE FOR SALT RESISTANCE

Aim. To obtain of cell lines and plant-regenerants of winter triticale resistant for salt stress the *in vitro* selection was carried out. **Methods.** In order to select resistant to salt stress forms of triticale the efficiency of using direct and step-type *in vitro* selection with application of selective system based on sodium chloride has been investigated. **Results.** The direct and step-type *in vitro* selection was conducted and the selection of callus lines of triticale being resistant to simulated salinity was carried out. As a result, from line 38/1296 and variety Obriy respectively, 5 and 4 resistant callus lines were identified that had a high survival rate on the selective medium with 1.2 % NaCl and maintained morphogenetic potential. From the resistant lines plant regenerants were induced and their rearing, rooting and transfer to *in vivo* conditions were optimized. **Conclusions.** A step-type *in vitro* selection was more effective, because resulted from the selection more resistant callus forms were identified. First cell lines of winter triticale with resistance to salt stress were derived.

Keywords: Triticale, *in vitro* selection, callus, salt stress, resistance.