УДК 581.1:58.056:58.084:633.11
DOI https://doi.org/10.32846/2306-9716/2021.eco.4-37.13

РОЗРОБЛЕННЯ СПОСОБІВ ДОБОРУ *IN VITRO* ГЕНОТИПІВ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР НА СТІЙКІСТЬ ДО НЕСПРИЯТЛИВИХ ЧИННИКІВ ДОВКІЛЛЯ

Пикало С.В., Демидов О.А., Юрченко Т.В., Прокопік Н.І., Харченко М.В., Рибка К.М.
Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України
08853, с. Центральне, Миронівський р-н, Київська область
pykserg@ukr.net

Зерновиробництво є одним із найвагоміших напрямів аграрного сектору України. Активний розвиток рослинництва в Україні висвітлив низку проблем, які з плином часу тільки ускладнюються. Дестабілізація погодних умов, забруднення атмосфери, загальне погіршення екологічної обстановки призвели до того, що рослини все більше піддаються пресингу широкого спектру абіотичних стресорів. Актуальним є створення нових і вдосконалення наявних методів скринінгу генотипів злакових за стійкістю до несприятливих чинників довкілля. Поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінки стресостійкості рослин біотехнологічні підходи набули значного поширення. У представленій роботі розроблено ефективні способи добору *in vitro* селекційного матеріалу зернових колосових культур, стійкого до посухи та засолення. Новим є те, що добір посухо- та солестійких генотипів за рівнем їх виживання і приростом сирої маси проведено на калюсних культурах, культивованих на штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій селективного чинника (маніт, хлорид натрію). Запропоновані способи добору охороняються патентами на корисні моделі. Наведено порівняльну характеристику різних методів, їх переваги та недоліки в масовому скринінгу зразків за стійкістю до абіотичних факторів середовища. Обґрунтовано доцільність застосування створених біотехнологічних способів добору генотипів зернових культур за адаптивною стійкістю. Перевагою запропонованих методів порівняно з традиційними є можливість об'єктивно аналізувати селекційний матеріал, працювати з великими вибірками генотипів, контролювати умови зовнішнього середовища, проводити оцінку протягом року. Запропоновані розробки доповнять методологію і сприятимуть створенню нових сортів із цінними практичними властивостями. Результати дослідження є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів стійкості зернових колосових культур до абіотичних стресових чинників довкілля та можуть застосовуватися як елементи селекційних або біотехнологічних програм. *Ключові слова:* зернові культури, добір *in vitro,* спосіб, посуха, засолення, стійкість.

Development of methods for *in vitro* selection of grain crops genotypes for tolerance to unfavorable environmental factors. Pykalo S., Demydov O., Yurchenko T., Prokopik N., Kharchenko M., Rybka K.
Grain production is one of the important areas of the agricultural sector in Ukraine. The active development of crop production in Ukraine has highlighted a many problems that are only getting more complicated over time. The destabilization of weather conditions, air pollution, and the general deterioration of the ecological situation have led to the fact that plants are increasingly exposed to the pressure of a wide range of abiotic stressors. It is urgent to create new and improve existing methods for screening cereal genotypes for resistance to adverse environmental factors. Along with morphological-anatomical and physiological-biochemical methods for assessing plant stress resistance, biotechnological approaches have become widespread. In the presented work, effective methods have been developed for *in vitro* selection of breeding material of cereal crops for tolerance to drought and salinity. The novelty is that the evaluation of genotypes for drought and salt tolerance is carried out on callus cultures cultivated on an artificial nutrient medium with the addition of various concentrations of a selective factor (mannitol, sodium chloride), according to the level of their survival and the increase in wet weight. The created methods are protected by patents for utility models. Comparative characteristics of various methods, their advantages and disadvantages in mass screening of samples for tolerance to abiotic environmental factors are presented. The expediency of using the created biotechnological methods for selection the genotypes of grain crops for adaptive tolerance has been substantiated. The advantages of the proposed methods over the traditional ones are the ability to objectively analyze breeding material, work with large samples of genotypes, control environmental conditions and conduct an assessment throughout the year. The proposed developments will complement the methodology and will contribute to the creation of new varieties with valuable practical properties. The research results are a definite contribution to the study of both theoretical and practical aspects of the tolerance of cereal crops to abiotic stress factors and can be used as elements of breeding or biotechnological programs. *Key words:* cereals, *in vitro* selection, method, drought, salinity, tolerance.

Постановка проблеми. Нині Україна стала одним із ключових гравців на світовій арені в секторі виробництва сільськогосподарської продукції, що зумовлює розвиток внутрішнього і глобального ринків у паралельних напрямах. Зернові – стратегічні сільськогосподарські культури, що становлять основу продовольчої безпеки країни. Зерновий підкомплекс є найважливішим складником агропромислового комплексу, котрий визначає рівень розвитку всього аграрного сектору економіки України [1].

Пшениця – основна зернова культура, найважливіший продукт харчування людини. Головне її призначення – забезпечення людей хлібом і хлібобулочними виробами [2]. Цінність пшеничного хліба визначається сприятливим хімічним складом зерна. Серед зернових культур пшеничне зерно найбагатше на білки, вміст яких у зерні м'якої пшениці залежить від сорту й умов вирощування і становить у середньому 13–15%. Засвоєння білка високе, близько 95%. У зерні пшениці міститься велика кількість вуглево-

дів, зокрема до 70% крохмалю, вітаміни B1, B2, PP, E, провітаміни A, D та до 2% мінеральних речовин [3].

Ячмінь – одна з найстародавніших культур. Зерно ячменю – цінний концентрований корм для багатьох видів худоби, оскільки в 100 кг зерна ячменю міститься 120 кормових одиниць, а в 100 кг ячмінної соломи – 35 кормових одиниць [4]. Із зерна ячменю виготовляють крупи (перлову, ячну). За вмістом жиру (1,2–1,5%) ячмінна крупа поступається вівсяній та гречаній, але містить багато білка (9–11%) і крохалю (82–86%). Крім того, ячмінь є основною сировиною для пивоварної промисловості [5].

Тритикале – нова озима або яра злакова культура, штучно створена селекціонерами внаслідок схрещування жита із пшеницею, тому більшість морфологічних ознак і біологічних властивостей тритикале є проміжними між пшеницею і житом [6]. Тритикале менш вибаглива до умов вирощування культура порівняно з пшеницею, що є особливо цінним для господарств із невисоким ресурсним забезпеченням. Нині, як і раніше, тритикале залишається культурою переважно фуражного використання і характеризується активним накопиченням листково-стеблової маси, тому може використовуватися на корм як у вигляді зеленої маси, силосу чи сінажу, так і у формі зерна [7].

Збільшення урожайності є найважливішим критерієм вирощування будь-яких сільськогосподарських культур. Міжнародні компанії та корпорації поставили за мету збільшити генетичний потенціал урожайності пшениці та інших культур у найближчі 20 років на 50–100 % [8]. Нині створено сорти пшениці озимої та ячменю інтенсивного типу, потенційна врожайність зерна яких сягає 11,0–14,0 т/га [9]. Однак упровадження їх у виробництво забезпечує незначний ріст реальної середньої врожайності, а коливання її за роками зростає. Генетичний потенціал сучасних сортів зернових культур у середньому використовується лише на 45%. Лише в окремих господарствах сорти пшениці озимої реалізують свою потенційну врожайність до 85% [9; 10].

Актуальність дослідження. Зміни клімату – надзвичайно актуальна проблема як для аграрної науки, так і для сільськогосподарського виробництва України загалом [11]. За оцінкою міжнародних експертів, 65–70% втрат, пов'язаних із несприятливими погодними і кліматичними умовами, припадає власне на сільське господарство [12]. Тому українські науковці приділяють значну увагу дослідженню зміни агрокліматичних ресурсів і впливу цих змін на сільськогосподарське виробництво.

Серед природних чинників, які згубно впливають на процеси росту й розвитку рослин зернових і призводять до зниження урожаю, є водний дефіцит, спричинений посухою [13; 14]. Відомо, що нестача води у ґрунті завдає значно більшої шкоди рослинництву, ніж усі інші стресові фактори, разом узяті [15]. Шкідлива дія посухи полягає насамперед у зневодненні та порушенні метаболічних процесів у рослинах, що призводить до розпаду білків, зміни колоїдно-хімічного стану цитоплазми клітини і, як наслідок, до зниження кількості накопиченої рослинами органічної речовини [14; 16]. Крім того, посуха може спровокувати засолення ґрунтів [15]. Стрес, спричинений водним дефіцитом, може бути первинним у разі посухи і вторинним унаслідок сольового стресу [13; 14]. Негативна дія засолення має комплексний характер і зумовлена як порушенням осмотичного балансу клітини, так і прямим токсичним впливом на фізіологічні та біохімічні процеси в ній [15]. Часто рослини піддаються дії одночасно кількох стресорів, унаслідок чого їхній негативний вплив значно посилюється [17].

Глобальне потепління і пов’язана з ним часта повторюваність посух зумовлюють необхідність об’єднання зусиль біотехнологів, генетиків і селекціонерів задля створення адаптивних генотипів зернових. Несприятливі фактори вирощування зернових культур в Україні висувають надзвичайно важливе завдання – створення нових сортів із потужним генетичним потенціалом високої продуктивності й адаптивності задля отримання стабільних валових зборів зерна [18]. Стійкість до абіотичних стресових чинників довкілля для селекційного вдосконалення зернових культур є вкрай важливим та набуває особливої актуальності, оскільки дозволить розширити їхні посіви в районах із несприятливими кліматичними умовами.

Створення і впровадження нових сортів рослин, адаптованих до умов довкілля, ніколи не втратить своєї актуальності за постійних нових викликів із появою нових рас патогенних організмів, тиску флуктуацій погодних умов, мінливих потреб ринку тощо [19]. Проведення досліджень стосовно добору та оцінки генотипів на стійкість до того чи іншого стресу є однією з умов підвищення ефективності селекційного процесу зернових культур [20]. Зважаючи на це, методологічне забезпечення всебічного дослідження стресостійкості сільськогосподарських рослин є пріоритетним завданням багатьох селекційних установ України. Задля прискорення селекційного процесу пшениці й отримання достовірних результатів необхідно застосовувати різні методики дослідження зразків за конкретними ознаками стійкості.

Зв’язок авторського доробку із важливими науковими та практичними завданнями. Представлені матеріали є частиною таких науково-дослідних робіт: «Вивчити генетичні та фізіологічні складники формування адаптивного потенціалу зернових і виділити на цій основі донори морозостійкості та посухостійкості для використання в селекції озимої м’якої пшениці» (номер державної реєстрації № 0116U004005); «Генетичні засади якісних та кількісних господарсько-цінних ознак, розробка сучасних біотехнологій створення та оцінки вихідного матеріалу і підвищення ефективності методів поліпшення генотипів рослин» («Біотехнологія і генетика

в рослинництві»), № 0116U004006; «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» (№ 0121U100435).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У селекційній практиці зернових колосових культур нині широко використовують спосіб оцінки стійкості генотипів до абіотичних стресорів, заснований на проведенні польових дослідів [21], зокрема враховують і оцінюють особливості росту й розвитку досліджуваних рослин, а також їхню продуктивність в умовах водного дефіциту [22; 23]. Однак складність цього методу полягає у просторовій гетерогенності фізичних і хімічних властивостей ґрунту, а також сезонних коливаннях кількості атмосферних опадів. Тому на практиці з цією метою використовуються вегетаційні приміщення з контрольованими умовами вирощування, де в якості основного критерію стійкості рослин використовують накопичення більшої біомаси порівняно з контролем [24]. Проте для виявлення реальної стійкості сортів зернових культур необхідно проводити тривалі експерименти – від двох тижнів до кількох місяців, що є непрактичним для скринінгу великої кількості генотипів.

Одним із методів оцінки стійкості сільськогосподарських культур до посухи та засолення є визначення відсотку пророслого насіння на розчинах речовин, що спричинюють зниження водного потенціалу у клітинах [25]. Однак недоліком цього методу є те, що кореляція між схожістю насіння і ростовими параметрами рослин за подальшого тривалого їх вирощування в умовах стресу є досить слабкою. Причиною цього є суттєва відмінність процесів, які регулюють розтягнення клітин під час проростання і подальшого зростання. Поглинання води насінням і подальше його набухання є суто фізико-хімічними процесами на відміну від біохімічних, які контролюють поділ клітин і їхнє розтягнення у період росту. До того ж швидкість проростання і схожість насіння за селективних умов залежать не лише від стійкості, але і значною мірою від стану зародка й насіннєвих оболонок. Тому добір генотипів за схожістю насіння в умовах водного дефіциту чи засолення не завжди дає об'єктивний результат і, як наслідок, може бути неефективним.

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, котрим присвячується означена стаття. Для тестування перспективних зразків злакових культур існує багато методів, заснованих на різних принципах дії, і кожен з них має свої переваги й недоліки [20]. Вибір способу значною мірою залежить від ступеню його достовірності, трудомісткості, тривалості оцінки і пропускної здатності. Часто той чи інший спосіб чітко розділяє за стійкістю контрастні види рослин, проте не в змозі диференціювати за групами стійкості різні сорти однієї культури, що знижує його придатність для селекційної практики [26]. Значна частина методів діагностики сортозразків передбачає нанесення певної шкоди рослині, що ускладнює або робить неможливим проведення оцінки за іншою, не менш важливою ознакою, а також вирощування рослин до отримання нащадків. Переважна їхня більшість не є нині оптимальними, внаслідок чого актуальним залишається завдання створення нових і вдосконалення вже наявних методів оцінки та добору селекційного матеріалу зернових колосових культур на стійкість до несприятливих чинників довкілля.

Принципово новим нинішнім підходом є застосування методів біотехнології, що значно полегшує і прискорює традиційний селекційний процес створення нових ліній і сортів пшениці. Варто зазначити, що за останні десятиліття поряд із морфолого-анатомічними та фізіолого-біохімічними методами оцінки стресостійкості рослин біотехнологічні підходи набули широкого поширення [17; 27]. Сучасні біотехнології дозволяють суттєво скоротити терміни добору й оцінки сортів та успішно застосовуються селекціонерами в усіх країнах світу.

Особливої актуальності набуває застосування культури тканин і органів *in vitro* – біологічної системи, в якій відсутні механізми регуляції, що діють на рівні цілого організму [28]. Метод культури тканин і органів *in vitro* нині широко використовують задля вирішення прикладних завдань селекції різних сільськогосподарських рослин [29; 30]. Цей підхід застосовують для скринінгу та ідентифікації стійких форм, а також для дослідження реакції клітин на токсичність селективних агентів.

У злаків зазвичай добір *in vitro* проводять на калюсах, оскільки інші технології, зокрема протопластів, ембріокультури, культури пиляків, ще не досить розроблені [27]. Перевагами калюсних культур порівняно із клітинними є менший період необхідного культивування і, як наслідок, менша генетична нестабільність. Калюсна тканина є одним із основних типів рослинного біологічного матеріалу, котрий застосовують у дослідженнях *in vitro*. Калюс – це неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих клітин, які надалі набувають спеціалізації і стають диференційованими [31]. Калюс є аморфною тканиною білуватого або жовтуватого, дуже рідко - зеленого кольору, що складається з паренхімних клітин із великими ядрами та відносно товстими клітинними стінками різних розмірів, розміщених хаотично [32; 33].

У багатьох працях науковці показують можливість використання методу *in vitro* для тестування селекційного матеріалу на стійкість до несприятливих факторів середовища [34–37]. Зокрема, на прикладі м'якої пшениці виявлено кореляційний зв'язок між реакціями клітинних систем *in vitro* та посухостійкістю рослини [35]. У роботі В.М. Россєєва зі співавторами [34] під час порівняльного дослідження сортів

пшениці м'якої ярої виявлено, що індекси стійкості сортозразків, визначені шляхом тестування *in vitro*, відображають їхню посухостійкість у польових умовах. У відділі біотехнології, генетики та фізіології МІП методом прямого добору проведено скринінг *in vitro* гібридів F_2 пшениці м'якої і твердої ярої на стійкість до водного дефіциту за рівнем виживання калюсів на селективних середовищах із манітом у концентраціях 0,2; 0,4; 0,6 та 0,8 М [38]. Показано, що зі збільшенням концентрації маніту в усіх генотипів відбувалося пригнічення росту калюсної культури, що свідчить про токсичний вплив стресового чинника. Під час досліджень виділено генотипи, калюси яких характеризувалися здатністю до росту на селективному середовищі з осмотично активною речовиною і зберігали ознаку стійкості протягом усього циклу культивування. Підвищену посухостійкість виділених ліній згодом було виявлено в польових випробуваннях. Отже, використання біотехнологічних методів у селекційному процесі дозволяє суттєво інтенсифікувати процес утворення нових сортів сільськогосподарських культур і підняти його на новий технологічний рівень.

Метою роботи є розроблення ефективних способів добору *in vitro* селекційного матеріалу зернових за стійкістю до посухи й засолення.

Новизна. Розроблено нові способи добору *in vitro* селекційного матеріалу зернових за стійкістю до посухи й засолення, що охороняються патентами на корисні моделі. Новим є те, що добір проводять на калюсних культурах, які культивуються на штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій селективного чинника (маніту чи хлориду натрію) за рівнем їх виживання та приростом сирої маси в селективних умовах.

Методологічне або загальнонаукове значення. Розроблені ефективні способи добору *in vitro* селекційного матеріалу злакових за стійкістю до посухи й засолення доповнять методологію і сприятимуть утворенню нових сортів із цінними практичними властивостями. Представлені дослідження спрямовані на розв'язання проблеми стійкості злакових культур до несприятливих кліматичних факторів, а також орієнтовані на розвиток розуміння реакцій рослин на стрес і впровадження нових методів задля вирішення прикладних завдань селекції пшениці, ячменю і тритикале.

Виклад основного матеріалу. Успішність селекції злакових на стійкість до того чи іншого стресу значною мірою залежить від правильної оцінки за цією ознакою створюваних сортів. Зважаючи на це, у відділі біотехнології, генетики і фізіології Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла НААН (МІП) ми розробили способи добору *in vitro* селекційного матеріалу зернових культур (пшениці, ячменю і тритикале) за стійкістю до таких абіотичних стресових чинників, як посуха та засолення.

1. Розроблення способу відбору *in vitro* посухостійких генотипів тритикале озимого. На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється в толерантності клітин до наявності в поживному середовищі осмотично активних речовин. Для імітації *in vitro* стресового ефекту водного дефіциту застосовують такі осмотики, як поліетиленгліколь (ПЕГ) або маніт [29; 36]. Варто зазначити, що в більшості робіт задля отримання посухостійких рослин в якості селективного фактору використано ПЕГ. Через високу молекулярну масу ПЕГ не може проникнути крізь мембрану клітини, щоб змінити її осмотичний потенціал [39]. Механізм моделювання ним умов дефіциту вологи в культивованих клітинах подібний до того, який спостерігають у клітинах інтактних рослин за умов посухи [37].

Значно рідше під час добору і скринінгу *in vitro* стійких до водного стресу зразків застосовують маніт. Слід відмітити, що порівняно з непроникаючим ПЕГ маніт проникає в рослинну клітину і знижує нормальний водний потенціал, чим спричинює зневоднення й гальмування багатьох фізіологічних та метаболічних процесів [40]. Єгипетські дослідники [41] встановили чітку позитивну кореляцію між виживаністю калюсів пшениці на селективних середовищах із різними концентраціями маніту та життєздатністю цих генотипів у польових умовах. О.В. Дубровна зі співавторами [29] під час проведення клітинної селекції м'якої пшениці за посухостійкістю порівнювали ефективність використання селективних систем із ПЕГ та манітом. Автори показали, що селективна система з манітом є ефективнішою, оскільки забезпечує більш повну елімінацію чутливих клітин і високу життєздатність рослин-регенерантів. Підвищену стійкість до посухи було підтверджено в нащадків більшості отриманих після клітинної селекції форм, що вказує на мутаційну природу стійкості. Аналогічні результати для м'якої пшениці продемонстрували й інші автори [36].

У відділі біотехнології, генетики і фізіології МІП ми розробили та запатентували спосіб добору *in vitro* посухостійких генотипів тритикале озимого, обумовлений токсичною дією стресового чинника, спрямованого проти виживання нестійких форм [42]. Цей спосіб відрізняється від інших тим, що добір окремих генотипів проводять на рівні культивованих калюсів у штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій маніту.

Запропонований спосіб містить зазначені нижче процеси. Індукцію і культивування калюсів проводили за методикою О. М. Гончарука зі співавторами [43] в такій послідовності. З кожного селекційного зразка відбирали 160 насінин, які надалі стерилізували і пророщували на світлі за температури 24°С на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [44] протягом трьох діб. Із отриманих проростків виділяли апікальну меристему пагона, яку потім висаджували на середовище МС для калю-

соутворення з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. Отримані калюси пересаджували у чашки Петрі на модифіковане селективне середовище та культивували протягом 3 тижнів (одного пасажу), визначаючи їх виживаність і приріст сирої маси. Як селективний агент застосовували низькомолекулярний маніт, який додавали до модифікованого середовища МС у концентраціях 0,2, 0,4, 0,6 та 0,8 М. Контролем слугувало середовище без маніту.

Посухостійкість кожного окремого генотипу визначали за рівнем виживання калюсів за селективних умов і приростом їх сирої маси. Водночас різну реакцію генотипів на водний стрес виявляли за різною часткою живих калюсів і неоднаковим приростом їх сирої маси під час дії стресора.

2. Розроблення способу добору *in vitro* солестійких генотипів тритикале озимого. Як свідчать літературні дані, найчастіше під час добору солестійких варіантів використовують хлористий натрій різних концентрацій [45–48]. Як відомо, в культивованих клітин найбільш чутливим до селективного чинника є не ріст, а диференціація, тому засолення в культурі *in vitro* суттєво пригнічує здатність клітин до морфогенезу [45]. У роботі I. Zair зі співавторами [46] у 8 протестованих сортів пшениці в умовах контролю формувалося від 40 до 80 ембріоїдів на експлант, а в умовах засолення їхня кількість зменшилася до 10–40 (залежно від сорту). Аналогічний вплив солі на частоту регенерації було показано і для рису [45]. У відділі біотехнології, генетики і фізіології МІП ми розробили та запатентували спосіб добору *in vitro* солестійких генотипів тритикале озимого, обумовлений токсичною дією стресового чинника, спрямованого проти виживання нестійких форм [49]. Метод відрізняється від інших тим, що добір окремих генотипів проводять на рівні культивованих калюсів у штучному поживному середовищі з додаванням різних концентрацій хлориду натрію.

Запропонований спосіб містить зазначені нижче процеси. Індукцію і культивування калюсів проводили за методикою О. М. Гончарука зі співавторами [43], як описано вище. Отримані калюси пересаджували в чашки Петрі на модифіковане селективне середовище та культивували протягом 3 тижнів (одного пасажу), визначаючи їх виживаність і приріст сирої маси. Як селективний агент застосовували хлорид натрію (NaCl), який додавали до модифікованого середовища МС у концентраціях 0,6, 0,9, 1,2 та 1,5%. Контролем слугувало середовище без NaCl.

Солестійкість кожного окремого генотипу визначали за рівнем виживання калюсів і приростом їх сирої маси за селективних умов. Різна реакція генотипів на сольовий стрес виявлялася за різною часткою живих калюсів та неоднаковим приростом їх сирої маси.

3. Розроблення способу добору *in vitro* сортів зернових колосових культур (пшениці, ячменю, тритикале) з комплексною стійкістю до абіотичних факторів середовища (посухи, засолення). Дослідження природи адаптивних реакцій рослин на дію різних стресів свідчать про наявність як специфічних, так і загальних механізмів стійкості, завдяки яким резистентність до одного несприятливого чинника може підвищити толерантність до іншого [50]. Показано [51], що підвищення осмостійкості на клітинному рівні може забезпечити толерантність рослин одночасно до кількох абіотичних стресів, які спричинюють зневоднення клітин. Із наведених результатів випливає, що адаптація клітин до осмотичного стресу може бути застосована під час добору солестійких варіантів і навпаки; подібні дослідження становлять інтерес для вивчення їх як у взаємодії, так і незалежно одне від одного.

Внаслідок того, що соле- і посухостійкість генотипів доводиться визначати роздільними методами, подовжується час селекційного процесу і збільшуються трудові витрати. Тому нами було поставлене завдання вдосконалити спосіб добору *in vitro* сортів зернових культур шляхом послідовного моделювання умов засолення і посухи, що дозволить за короткий час із необхідною вірогідністю комплексно визначити соле- і посухостійкість генотипів і, як наслідок, прискорити селекційний процес, зменшивши трудовитрати. У відділі біотехнології, генетики і фізіології МІП ми розробили та запатентували спосіб добору *in vitro* сортів зернових культур із комплексною стійкістю до посухи й засолення, обумовлений токсичною дією стресових чинників, спрямованих проти виживання нестійких форм [52]. Метод відрізняється тим, що добір окремих сортів проводять на рівні культивованих калюсів у штучному поживному середовищі з послідовним додаванням певних концентрацій хлориду натрію та маніту.

Запропонований спосіб містить зазначені нижче процеси. Індукцію і культивування калюсів проводили за методикою О. М. Гончарука зі співавторами [43], як описано вище. Отримані калюси пересаджували в чашки Петрі на модифіковане селективне середовище та культивували протягом двох пасажів, визначаючи водночас їх виживаність і приріст сирої маси.

Аналіз стійкості калюсів до сольового та водного стресів проводили, використовуючи розроблену систему пересадок на поживні середовища МС із стресовим чинником. Селективні середовища містили сублетальні концентрації хлориду натрію (1,2%) і маніту (0,6М). Калюсні культури пасажували за схемою: селективне середовище з 1,2% хлориду натрію (1 пасаж) → селективне середовище з 0,6 М маніту (1 пасаж). Контролем слугувало середовище без стресового чинника. Після кожного пасажу (тривалістю 3 тижні) визначали частку живих калюсів як відсоткове відношення кількості життєздатних калюсів до їх початкової кількості. Зокрема до мертвих відносили калюси, що побуріли на 2/3 своєї поверхні й більше, решту вважали живими.

Соле- та посухостійкість кожного окремого сорту визначали за рівнем виживання калюсів і приростом їх сирої маси за селективних умов. Різна реакція генотипів на сольовий і водний стрес виявлялася за різною часткою живих калюсів і неоднаковим приростом їх сирої маси за дії стресових чинників. Використання запропонованого способу дозволяє за порівняно короткі терміни ідентифікувати значну кількість стійких до посухи та засолення генотипів, отже, забезпечує скорочення селекційного процесу і зменшує матеріальні витрати на його виконання.

Отже, аналіз наукових публікацій і власні дослідження дозволили виявити світову тенденцію до застосування технологій добору *in vitro* в селекційному процесі зернових культур. Проте варто підкреслити, що для практичного використання клітинних біотехнологій із метою добору стійких форм злакових необхідно, щоб ступінь стійкості на рівні культури клітин і цілої рослини тісно корелював, чого не завжди можна досягти. Зокрема, в роботі E. Farshadfar і співавторів [53] скринінг генотипів пшениці м'якої на посухостійкість не виявив достовірного кореляційного зв'язку між результатами оцінки *in vivo* та *in vitro*. Автори зазначили, що результати скринінгу *in vitro* не можна узагальнити на рівні *in vivo* та навпаки, тому показники стійкості, отримані наведеними вище методами, не завжди корелюють між собою і повинні розглядатись окремо або доповнювати один одного. Необхідно також зауважити, що скринінг селекційного матеріалу злакових на клітинному рівні не завжди ефективний, оскільки дія селективного чинника може залежати від фази розвитку клітинної популяції. Але, незважаючи на певні труднощі, використання тканинних і клітинних культур дає можливість прискорити селекційний процес і в багатьох країнах світу вважається важливим доповненням до класичних методів селекції сільськогосподарських рослин.

Головні висновки. Отже, результатом проведеного дослідження є комплекс розроблених та запатентованих способів добору *in vitro* генотипів зернових колосових культур за стійкістю до посухи та засолення. Аналіз літературних джерел засвідчив, що для тестування перспективних зразків зернових є багато методів, заснованих на різних принципах дії, і кожен із них має свої переваги та недоліки. Переважна їхня більшість не є нині оптимальними, внаслідок чого актуальним залишається завдання створення нових і вдосконалення вже наявних методів оцінки й добору селекційного матеріалу зернових культур. Обґрунтовано доцільність застосування розроблених біотехнологічних способів добору генотипів злакових за адаптивною стійкістю. Перевагою запропонованих методів порівняно з традиційними є можливість об'єктивно аналізувати селекційний матеріал, працювати з великими вибірками генотипів, швидше здійснювати скринінг зразків, контролювати умови зовнішнього середовища і проводити оцінку протягом року. Для більш широкого впровадження біотехнологічних методів у селекційний процес зернових культур важливе значення має питання генетичної стабільності клітин рослин в умовах *in vitro*.

Перспективи використання результатів дослідження. Отримані результати є певним внеском у вивчення як теоретичних, так і практичних аспектів стійкості зернових культур до абіотичних стресових чинників довкілля, котрі можуть застосовуватися як елементи селекційних або біотехнологічних програм. Використання розроблених методів у селекції пшениці, ячменю і тритикале сприятиме створенню нових сортів, які мають цінні практичні властивості. Подальший прогрес у розробці біотехнологічних методів добору зернових культур, стійких до того чи іншого стресу, залежатиме не лише від розвитку клітинних технологій, але й від більш глибокого пізнання молекулярних механізмів регуляції та експресії генів, що детермінують цю ознаку.

Література

1. Ткачук В.І. Інновації як фактор підвищення ефективності виробництва зерна. *Ефективна економіка*. 2014. № 2. С. 1-3.
2. 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.
3. 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.
4. Черчель В. Ю., Алдошин А. В., Лященко О. І. Ячмінь – стан виробництва, нові сорти і можливості. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони НААН України*. 2014. Вип. 6. С. 42-47.
5. Гудзенко В. М., Васильківський С. П. Основні напрями та завдання селекції ячменю озимого у Центральному Лісостепу України. *Новітні агротехнології*. 2016. Т. 1, № 4. С. 3-4.
6. Oettler G. The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *Journal of Agricultural Science*. 2005. Vol. 143, № 5. P. 329-346.
7. 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. С. 95-111.
8. Коць С. Я. Хлібний достаток країни - мета наукового пошуку (до 80-річчя академіка НАН України ВВ Моргуна). Вісник НАН України. 2018. № 3. С. 96-108.
9. 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.
10. Васильківский С.П., Паустовський В.М., Худолій О.Л. Проблема реалізації потенціалу продуктивності сучасних сортів озимої пшениці. *Аграрні вісті*. 2002. № 2. С. 6-8.

11. Дем'янюк О. С. Зміни клімату – глобальна екологічна і продовольча проблема людства. *Збалансоване природокористування*. 2016. Вип. 4. С. 6-13.
12. Самець Н. П., Грицевич Ю. С., Ворончак М. В. Оцінка зміни клімату на тривалість періодів вегетації та спокою пшениці озимої. *Стратегія інтеграції аграрної освіти, науки, виробництва: глобальні виклики продовольчої безпеки та змін клімату*: Матер. міжнар. наук.-практ. конф. Миколаїв, 2021. С. 85-88.
13. 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.
14. 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.
15. Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2005. Vol. 24, № 1. P. 23-58.
16. Mwadzingeni L., Shimelis H., Dube E. et al. Breeding wheat for drought tolerance: Progress and technologies. *Journal of Integrative Agriculture.* 2016. Vol. 15. Iss. 5. P. 935-943.
17. 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.
18. Кириленко В.В. Методи створення вихідного матеріалу пшениці озимої, стійкого до несприятливих чинників довкілля Лісостепу України: автореф. дис…доктора с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція і насінництво». Дніпро, 2016. 40 с.
19. Zhuk O. Formation of winter wheat plant productivity in crops. *Знание*. 2017. № 11-1 (51). С. 5-13.
20. Пикало С., Демидов О., Юрченко Т., Хоменко С., Гуменюк О., Харченко М., Прокопік Н. Методи оцінки посухостійкості селекційного матеріалу пшениці. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2020. Вип. 82. С. 63-79.
21. Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур / за ред. В. В. Волкодава. 2000. Київ: Алефа, С. 10-50.
22. Haley S. D. Quick J. S., Morgan J. A. Excised-leaf water status evaluation and associations in field-grown winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science*. 1993. Vol. 73, № 1. P. 55-63.
23. Plaut Z. Plant exposure to water stress during specific growth stages. *Encyclopedia of Water Science*. 2003. P. 673-675.
24. Семушина Л.А., Синельникова В.Н. Методические указания по использованию вегетационных методов при изучении солеустойчивости однолетних сельскохозяйственных растений. Ленинград: Всесоюзный НИИ растениеводства, 1977. 20 с.
25. Олейникова Т.В., Осипов Ю.Ф. Определение засухоустойчивости сортов пшеницы и ячменя, линий и гибридов кукурузы по прорастанию семян на растворах сахарозы с высоким осмотическим давлением. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды. Ленинград: Колос, 1976. С. 23-32.
26. Федулов Ю.П. Методы определения устойчивости растений. Краснодар : КубГАУ, 2015. 39 с.
27. Дубровна О. В., Моргун Б. В. Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.
28. 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.
29. 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.
30. Dubrovna O. V., Bavol A. V. Variability of the wheat genome during in vitro culture. *Cytology and Genetics*. 2011. Vol. 45, N 5. P. 333-340.
31. Цыренов В. Ж. Основы биотехнологии: культивирование изолированных клеток и тканей растений: учебно-методическое пособие. Улан-Удэ: Издательство ВСГТУ, 2003. 58 с.
32. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
33. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. Комаровские чтения. 2007. Вип. LV. С. 184-211.
34. 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.
35. 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.
36. Butt A., Ahmed N., Mubin M., Khaliq I., Lighfoot D. A. Effect of PEG and mannitol induced water stress on regeneration in wheat (Triticum aestivum L.). *Pakistan Journal of Agriculture Science*. 2015. Vol. 52, № 4. P. 1025-1033.
37. Gawande N. D., Mahurkar D. G., Rathod T. H., Jahagirdar S. W., Shinde S. M. In vitro screening of wheat genotypes for drought tolerance. *Annual Review of Plant Physiology.* 2005. Vol. 19, № 2. P. 162-168.
38. Pykalo S. V., Demydov O. A., Prokopik N. I. Voloshchuk S. I., Yurchenko T. V., Khomenko S. O. In vitro screening of the spring wheat F_2 hybrids for water deficit resistance. *ScienceRise: Biological Science*. 2018. № 3(12). С. 12-18.
39. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. In vitro selection for osmotic tolerance in alfalfa (Medicago sativa L.). *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 1996. Vol. 22, № 3–4. P. 30-39.
40. Генерозова И. П., Маевская С. Н., Шугаев А. Г. Ингибирование метаболической активности митохондрий этиолированных проростков гороха, подвергнутых водному стрессу. *Физиология растений*. 2009. Т. 56, № 1. С. 45-52.
41. Ahmed A. Response of immature embryos in vitro regeneration of some wheat (Triticum aestivum L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol. *Journal of Agricultural Science*. 1999. Vol. 30, № 3. P. 25-34.
42. Спосіб відбору *in vitro* посухостійких генотипів тритикале озимого: пат. 132656 Україна: МПК A01H 4/00. No 201807903; заявл. 16.07.2018; опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. 4 с.
43. 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.

44. 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.
45. Dang M. T., Nguyen T. L. In vitro selection for salt tolerance in rice. *Omonrice*. 2003. Vol. 11. P. 68-73.
46. Zair I., Chlyah A., Sabounji K., Tittahsen M., Chlyah H. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2003. Vol. 73, № 3. P. 237-244.
47. Munns R., James R. A. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil*. 2003. Vol. 253, Iss. 1. P. 201-218.
48. Sudyova V., Slikova S., Galova Z. Testing wheat and triticale callus to salt tolerance. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 2002. Vol. 3. P. 67-71.
49. Спосіб добору *in vitro* солестійких генотипів тритикале озимого: пат. 125692 Україна: МПК A01H 1/04. No 201711024; заявл. 13.11.2017; опубл. 25.05.2018, Бюл. № 10. 4 с.
50. Пикало С. В., Дубровна О. В. Перехресна стійкість клітинних ліній та рослин-регенерантів тритикале озимого до абіотичних стресових чинників. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2017. Т. 13, № 4. С. 387-395.
51. Белянская С. Л., Шамина З. Б. Получение и характеристика клонов риса, резистентных к стрессовым факторам. *Физиология растений*. 1993. Т. 40, № 4. С. 681-685.
52. Спосіб *in vitro* добору сортів зернових колосових культур із комплексною стійкістю до абіотичних факторів середовища: пат. 147289 Україна: МПК A01H 1/04. No 202006966; заявл. 30.10.2020; опубл. 28.04.2021, Бюл. № 17. 4 с.
53. Farshadfar E., Jamshidi B., Cheghamirza K., da Silva J. A. T. Evaluation of drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using *in vivo* and *in vitro* techniques. *Annals of Biological Research.* 2012. Vol. 3. Iss. 1. P. 465-476.