

СЕЛЕКЦІЯ *in vitro* ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ

С. В. Пикало¹
М. О. Зінченко²
С. І. Волощук¹
О. В. Дубровна²

¹Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла
НААН України, Київська область

²Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

E-mail: pykserg@ukr.net

Отримано 02.10.2014

З використанням селективної системи з низькомолекулярним манітом проведено пряму та ступінчасту селекцію *in vitro* і здійснено добір калюсних ліній тритикале озимого, стійких до модельованого водного дефіциту. У результаті досліджень із лінії 38/1296 та сорту Обрій виділено відповідно 5 і 4 стійких калюсних ліній, які мали високий рівень виживання на селективному середовищі з 0,6 М маніту і зберігали морфогенний потенціал. Із стійких культур індуковано рослини-регенеранти й оптимізовано їх дорожчання, укорінення та переведення в умови *in vivo* з подальшою перевіркою на стійкість до водного дефіциту. Під час перевірки за умов модельованої 3-тижневої посухи було встановлено, що порівняно з нестійкими рослинами регенеранти зі стійких ліній характеризувались достовірно вищим відносним вмістом води та вільного проліну. Ступінчаста селекція *in vitro* була ефективнішою, оскільки в результаті добору виділено більшу кількість стійких калюсних форм. Оцінювання рослин-регенерантів тритикале, одержаних із стійких калюсів, виявило підвищений рівень толерантності до водного дефіциту.

Ключові слова: *Triticosecale*, селекція *in vitro*, рослини-регенеранти, осмотичний стрес.

Тритикале (*Triticosecale*) — перспективна зернова культура, яку вирощують у багатьох країнах світу. Методами класичної селекції створено багато сортів цієї культури, які мають високий потенціал продуктивності [1]. Проте в різні роки виробництво зерна тритикале є нестабільним. Сучасні сорти формують високий урожай в основному лише за сприятливих погодних умов [2]. Серед природних чинників, що найбільш негативно впливають на всі фізіологічні процеси росту та розвитку рослин тритикале і призводять до втрат урожаю, є передусім водний дефіцит, спричинений посухою. Очікується, що у зв'язку із глобальним потеплінням клімату періодичність повторення посухи тільки посилюватиметься [3].

Одним із сучасних інноваційних напрямів, що дають змогу розширити спектр вихідного матеріалу й активізувати селекційний процес, спрямований на створення високопродуктивних посухостійких сортів, є біотехнологія, зокрема селекція *in vitro* [4]. Клітинна селекція подібна до розвитку мутаційної селекції, але реалізується на рівні одиничних клітин з використанням техніки *in vitro*, що надає їй, з одного боку, ширших

можливостей, а з другого — створює значні труднощі через необхідність регенерації з окремих клітин повноцінних рослин [5]. Перевага клітинної селекції перед традиційними методами полягає передусім у відсутності сезонності в роботі, можливості використовувати мільйони клітин під час відбору, спрямованості селекції шляхом застосування селективних середовищ і виконанні робіт за лабораторних умов [6]. Генетичне варіювання в цьому разі відзначається більш широким спектром, а добір досліджуваних ознак відбувається цілеспрямовано на рівні окремих клітин і тканин [7].

На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється у толерантності клітин до присутності в живильному середовищі осмотично активних речовин [8]. З метою імітації *in vitro* стресового ефекту застосовують осмотики, що знижують зовнішній водний потенціал, такі як високомолекулярний (6 000–10 000) поліетиленгліколь (ПЕГ), сорбітол, маніт, глюкоза або ксилоза. З використанням селективних середовищ із наведеними осмотичними речовинами одержано толерантні до посухи лінії вже у багатьох сільськогосподарських культур [8–11].

На цей час селективні системи для відбору стійких до водного дефіциту форм розроблено для багатьох злакових культур: пшениці, рису, кукурудзи, ячменю [12–15]. Як стресовий чинник зазвичай використовували високомолекулярний ПЕГ або низькомолекулярний маніт. Слід зазначити, що порівняно з непроникним ПЕГ маніт проникає в рослинну клітину і знижує нормальний водний потенціал, чим спричинює зневоднення та гальмування низки фізіологічних і метаболічних процесів [16]. Єгипетські дослідники [17] встановили чітку позитивну кореляцію між виживаністю калюсів пшениці на селективних середовищах з різними концентраціями маніту і життєздатністю цих генотипів у польових умовах.

Серед механізмів адаптації рослин до водного дефіциту важливе значення має накопичення сумісних осмолітів, одним з яких є пролін. Відомо, що збільшення вмісту цієї амінокислоти у клітинах рослин сприяє підвищенню стійкості до осмотичного стресу [18]. Тому динаміку змін вмісту проліну в одержаних шляхом клітинного добору рослинах-регенерантах широко використовують як показник їхньої підвищеної стійкості до водного дефіциту [13].

Дослідження стійких до водного дефіциту форм тритикале вкрай обмежені. У зв'язку з цим метою роботи було проведення селекції *in vitro* для одержання клітинних ліній та рослин-регенерантів тритикале озимого, стійких до водного дефіциту.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 2 форми тривидового гексаплоїдного тритикале озимого селекції Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН України: лінія 38/1296 та чистолінійний сорт Обрій, які характеризуються високими господарсько-цінними показниками. Для одержання донорних рослин насіння спочатку стерилізували 1%-м розчином KMnO_4 протягом 3 хв. Потім упродовж 1 хв його витримували в 1%-му розчині AgNO_3 і поміщали у 96%-й етанол на 1 хв. Кінцевим етапом стерилізації було 3-разове промивання стерильною дистильованою водою. Простерилізоване таким чином насіння пророщували на модифікованому живильному середовищі Мурасіге–Скуга (МС) [19] без фітогормонів. Донорні рослини культивували у скляному посуді об'ємом 200 мл, в який було розлито по 30 мл середовища.

Калюсну культуру одержали з апікальних меристем пагонів 3-добових проростків, попередньо вирощених за умов *in vitro*, розміром 1,5–2,0 мм. Перевагою цього типу експлантів є можливість подолання особливостей генотипів, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також одержання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час [20]. На рис. 1 наведено послідовні етапи індукції морфогенезу в культурі тритикале *in vitro* з використанням як експланта апікальної меристеми пагона тридобових проростків.

Культуру калюсної тканини виділяли на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін — 150 мг/л, AgNO_3 — 10 мг/л та 2 мг/л 2,4-Д (дихлорфеноксіоцетову кислоту). Експланти культивували за 26 °C у темряві протягом двох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували за освітлення 3–4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді ще впродовж трьох тижнів. Як селективний агент застосовували низькомолекулярний маніт, який додавали до модифікованого середовища МС у концентраціях 0,2; 0,4 та 0,6 М. Для кожного генотипу було взято по 400 калюсів, які висаджували в чашки Петрі (по 40 шт. у кожній) у 10 повторях. Після кожного пасажу (тривалістю три тижні) визначали частку живих калюсів як відсоткове відношення кількості життєздатних калюсів до їх початкової кількості (400 шт.). При цьому до мертвих відносили калюси,

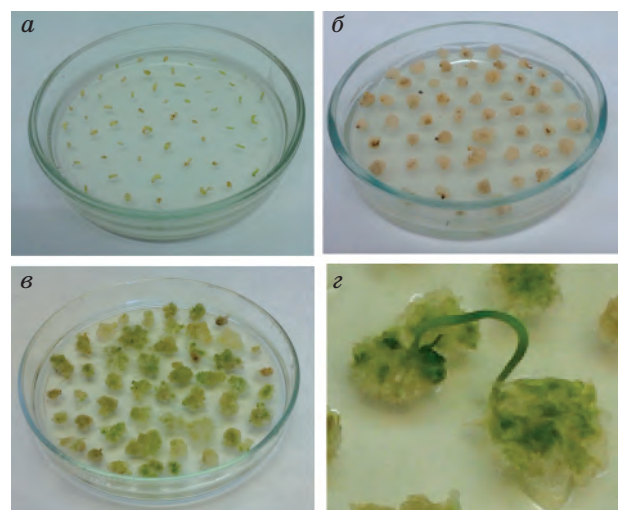


Рис. 1. Морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів тридобових проростків тритикале:

- а — апікальна меристема пагона;
- б — індукований калюс;
- в — морфогенний калюс;
- г — регенерація пагонів

які побурили на 2/3 своєї поверхні й більше, а решту вважали живими. Для одержання більшої вибірки досліджуваного матеріалу і, як наслідок, більш достовірних результатів виділені стійкі калюси розділяли на дрібніші шматочки і знову садили на середовище МС для нарощування їхньої біомаси та подальшої регенерації з них пагонів. Контролем слугувало середовище без маніту.

Для індукції морфогенезу стійкі калюсні культури переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК). Після 3 тижнів культивування морфогенний калюс висаджували на живильне середовище без селективного чинника. 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 для укорінення з половинним вмістом макроелементів, доповнене нафтилоцтовою кислотою (НОК) концентрацією 1 мг/л. Укорінені проростки пересаджували в стерильний ґрунт і вміщували у вологу камеру на 7–14 діб. Потім їх яровизували у холодильній камері за +4 °С і далі для одержання насіння R1 вирощували за умов вегетаційного будиночку до фази повної стиглості зерна.

Для імітації посухи рослини-регенеранти на стадії виходу в трубку переводили на обмежений полив. Контролем були рослини-регенеранти з калюсів після культивування на середовищі без селективного чинника. Протягом трьох тижнів від повного вологонасичення ґрунту вологість ґрунту підтримували на рівні 40% — перший тиждень, 50% — другий, 60% — третій. Відносний вміст води (ВВВ) у листках рослин визначали до і після змодельованої посухи за встановленою методикою [21]. Концентрацію вільного проліну в рослинах-регенерантах визначали за методом Андрущенко [22]. Аналіз вмісту ВВВ та проліну проводили у 5 біологічних і 3 аналітичних повторях. За статистичної обробки даних визначали похибку середнього арифметичного та довірчий інтервал коефіцієнта Стьюдента [23].

Результати та обговорення

Можливість одержання стійких до водного дефіциту клітинних варіантів зумовлена соматоклональною мінливістю, мутагенною дією регуляторів росту живильного середовища, а також дією селективного чинника, спрямованого проти виживання нестійких форм [24]. Добір *in vitro* на стій-

кість до осмотичного стресу проводять, як правило, у калюсних культурах. Перевагами калюсних культур порівняно з клітинними є менший період необхідного культивування і, як наслідок, менша генетична нестабільність. Одним із показників, що характеризують стійкість генотипів до модельованого стресу, є швидкість росту калюсних культур за селективних умов. При цьому раніше було встановлено, що швидкість росту і морфогенез калюсів на різних етапах культивування можуть зазнавати істотних змін [8]. Це пов'язано з тим, що одержання калюсних культур саме по собі є стресовим чинником і передбачає адаптацію клітин до умов існування *in vitro*. У результаті може змінюватись і чутливість калюсів до модельованого *in vitro* стресу. Одним із недоліків калюсних культур є те, що у частини клітин токсичні рівні селективного чинника згладжуються сусідніми клітинами і, таким чином, вони уникають селективного тиску [25]. Є також можливість фенотипового маскування — якщо клітина має стійкість завдяки продукуванню певної речовини, то остання може передаватися через плазмодесми до сусідніх чутливих клітин і надавати їм стійкості. Оскільки переважна більшість клітин калюсу безпосередньо не контактують із селективним агентом, відібрані калюси можуть бути сумішшю змінених клітин і клітин дикого типу [26]. З огляду на це ми у своїх дослідженнях використовували декілька циклів добору за прямої та ступінчастої клітинної селекції (рис. 2).



Рис. 2. Схема одержання рослин тритикале, толерантних до осмотичного стресу

У наших попередніх дослідженнях під час проведення скринінгу генотипів тритикале на стійкість до водного дефіциту було з'ясовано, що концентрація маніту 0,8 М для переважної більшості калюсних культур тритикале є летальною [27]. Тому для проведення селекції *in vitro* використовували концентрацію маніту 0,2–0,6 М.

На рис. 3 зображено послідовні етапи одержання *in vitro* стійких до осмотичного стресу калюсних ліній тритикале.

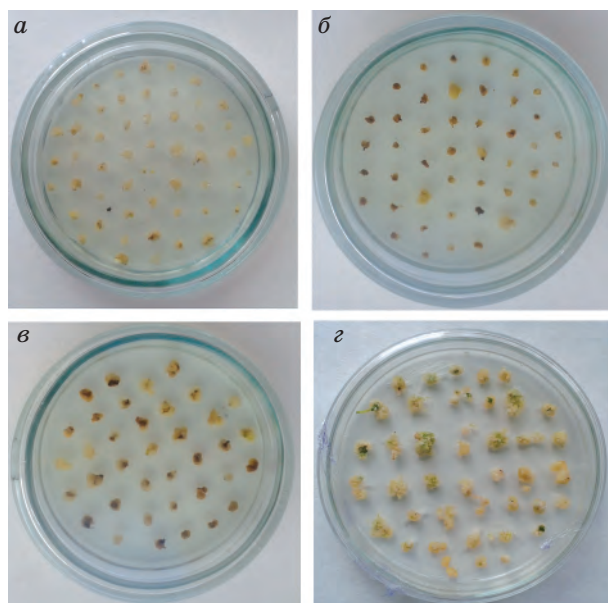


Рис. 3. Етапи прямої клітинної селекції:

- а — вихідний калюс;
 б — другий пасаж на селективному середовищі з манітом (0,2–0,6 М);
 в — пасаж на контрольному середовищі;
 г — 14-та доба шостого пасажу — калюси зберігають здатність до нарощування біомаси за селективних умов

Життєздатність калюсів перевіряли за селективних і неселективних умов, а також порівнювали ефективність застосування прямої та ступінчастої клітинної селекції (табл. 1).

Виявлено, що за прямого добору на середовищі з 0,6 М маніту до кінця першого пасажу в лінії 38/1296 та сорту Обрій виживало майже 50 і 38% калюсів відповідно. Після трьох пасажів за селективних умов частка живих калюсів у вищезазначених генотипів становила 33,1 та 20,2% відповідно.

Після пасажу на середовищі без селективного чинника і перевірки росту за селективних умов у лінії 38/1296 було одержано 10,7% резистентних клонів із 5 варіантів. У сорту Обрій було виділено 7,8% стійких калюсів на 3 варіантах. У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що порівняно із сортом Обрій лінія 38/1296 має більшу стійкість до впливу осмотичної речовини [27]. Як бачимо, дані табл. 1 повністю підтвердили цей факт.

Під час проведення ступінчастої селекції, тобто за поступового підвищення концентрації селективного чинника у середовищі від 0,2 до 0,6 М, виявлено, що життєздатність калюсних культур в обох генотипів була вищою. Так, за ступінчастої селекції протягом 6-го пасажу на середовищі з 0,6 М маніту в лінії 38/1296 зафіксували 16,8% живих калюсів на 7 варіантах, а в сорту Обрій — 9,3% на 5 варіантах. Таким чином, ступінчастий добір виявився ефективнішим, оскільки в результаті його застосування виділено більше стійких калюсних форм. Дослідники, які проводили клітинну селекцію пшениці, пояснюють це

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

Метод добору	Пасаж	Концентрація маніту, М	Кількість живих калюсів по генотипах			
			Лінія 38/1296		Сорт Обрій	
			%	шт.	%	шт.
Прямий	1	0,6	49,8 ± 2,5	199	37,7 ± 2,4	151
	3	0,6	33,1 ± 2,3	132	20,2 ± 2,0	81
	6	0,6	10,7 ± 1,5	43	7,8 ± 1,3	31
Ступінчастий	1	0,2	80,3 ± 1,9	321	75,4 ± 2,1	302
	2	0,4	60,4 ± 2,5	242	52,3 ± 2,5	209
	3	0,6	38,4 ± 2,4	154	26,7 ± 2,2	107
	6	0,6	16,8 ± 1,8	67	9,3 ± 1,4	37

явище тим, що поступове збільшення селективного чинника менш згубно впливає на життєздатність калюсів, ніж пряме [5]. Можна припустити, що це твердження стосується і тритикале.

У результаті селекції за послідовних субкультивувань у лінії 38/1296 та сорту Обрій було виділено відповідно 5 і 4 калюсних ліній, які росли на селективних середовищах з 0,6 М маніту і стабільно зберігали ознаку резистентності. Клітинні лінії зі стійкістю до водного дефіциту мали щільний калюс із глобулярною структурою темно-жовтого кольору.

Регенерацію пагонів індукували на модифікованому середовищі МС-3/7 [8] без селективного чинника, відсаджуючи пагони, що утворилися, на середовище без фітогормонів. Під час досліджень у морфогенних калюсах після зняття селективного чинника часто спостерігали лише ризогенез або утворення пагонів, що поступово припиняли свій ріст. У наших експериментах частота регенерації пагонів зі стійких клітинних ліній була на рівні 6,8–12,7% — у лінії 38/1296 та 5,6–10,8% — у сорту Обрій, що достовірно нижче, ніж у контролі обох генотипів (табл. 2).

Як зазначається в літературі, проблема одержання повноцінних рослин із стійких клітинних ліній у клітинній селекції є однією з найбільш важливих та складних. Відомо, що регенерація з таких форм значно ускладнена, що і є головною причиною низької частоти утворення рослин-регенерантів.

Більшість дослідників пояснюють це явище появою мутаційних змін [12]. Генотипові особливості також помітно впливають на регенераційну здатність калюсних культур, оскільки лінія 38/1296 за цим критерієм істотно перевершує сорт Обрій.

Використання модифікованого середовища МС для укорінення дало змогу через 17–22 доби отримати сформовані рослини-регенеранти з повноцінною кореневою системою (рис. 4).

Ці рослини-регенеранти (рис. 4, б) було адаптовано до умов *in vivo*. Для цього їх спочатку інкубували 3 тижні на половинному середовищі МС без вітамінів з 10 г/л сахарози, а перед висаджуванням у ґрунт витримували одну добу у воді з 5 мг/л НОК. Укорінені рослини пересаджували у пластикові стаканчики зі стерильним ґрунтом (рис. 4, в) і вміщували у вологу камеру на 7–14 діб. Після цього рослини пересаджували у вегетаційні посудини об'ємом 5 л, проводили їх яровизацію та перевірку на стійкість до водного дефіциту, штучно моделюючи умови посухи.

Відносний вміст води є одним із показників, що характеризують водний статус рослин за умов водного стресу. Він відображає баланс між надходженням та випаровуванням води і показує, наскільки сильний водний дефіцит відчуває рослина в даному стані порівняно зі станом повного водонасичення її тканин. Під дією посухи відбувається зниження ВВВ, який тим сильніший, чим

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

Генотип	Калюсна лінія, №	Кількість стійких калюсів, шт.	Частота регенерації, %	Одержано рослин-регенерантів, шт.
Лінія 38/1296	Контроль	400	$36,2 \pm 2,4$	32
	1	400	$6,8 \pm 1,3^*$	5
	2	400	$9,1 \pm 1,4^*$	8
	3	400	$11,3 \pm 1,6^*$	11
	4	400	$7,9 \pm 1,3^*$	6
	5	400	$12,7 \pm 1,7^*$	13
	Контроль	400	$24,6 \pm 2,2$	20
	1	400	$10,8 \pm 1,6^*$	11
	2	400	$5,6 \pm 1,2^*$	5
	3	400	$6,4 \pm 1,2^*$	7
Сорт Обрій	4	400	$9,7 \pm 1,5^*$	9

Примітка: тут і далі * — $P < 0,05$ порівняно з контролем.

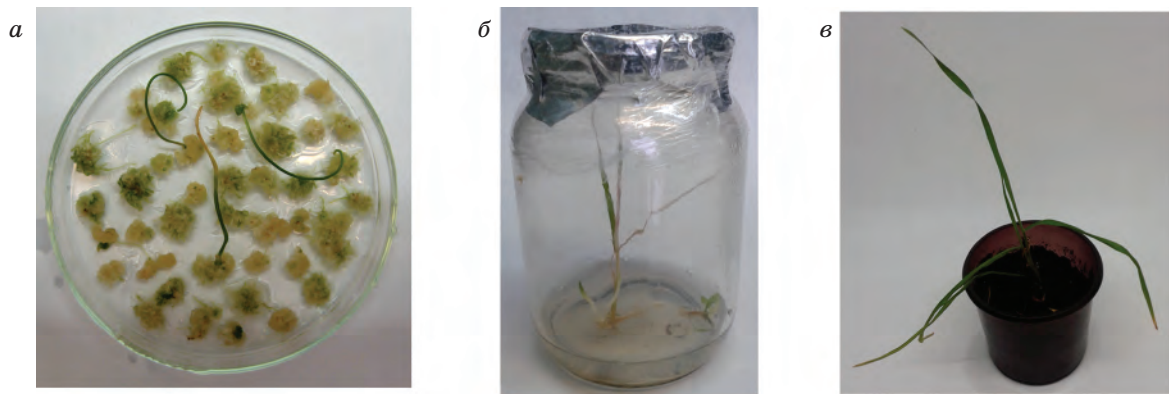


Рис. 4. Індукція пагонів зі стійких калюсних ліній (а), укорінення рослин (б) та переведення рослин в умови ґрунту (в)

інтенсивнішою і тривалішою є посуха. Для багатьох видів рослин, у тому числі для злакових, показано позитивну кореляцію між величиною даного показника та посухостійкістю [28]. За нормального поливу до імітації посухи ВВВ регенерантів лінії 38/1296 майже не відрізнявся від цього показника контрольних рослин (рис. 5, а).

Після 3-тижневої посухи відносний вміст води у контрольних рослин зменшився з 84,6 до 66,1%, що свідчить про їхню низьку толерантність до водного дефіциту. У двох виділених стійких форм рослин-регенерантів зниження ВВВ під дією посухи було мінімальним.

Контрольні рослини сорту Обрій мали помітно меншу водонасиченість листя порівняно з лінією 38/1296 (рис. 5, б). Після посу-

хи ВВВ у цих рослинах знизився із 73,4 до 56,2%. Значна частина стійких регенерантів цього сорту за водонасиченістю листя як до, так і після посухи перевершувала контрольні рослини.

Виділені рослини-регенеранти обох генотипів характеризувались також високим вмістом проліну, концентрація якого в них була більшою у 1,5–2 рази, ніж у контрольних (рис. 6).

Одержані результати опосередковано підтверджують гіпотезу про провідну роль проліну як осмопротектора за водного стресу.

Таким чином, методами селекції *in vitro* за використання селективної системи з низькомолекулярним манітом здійснено добір калюсних ліній тритикале лінії 38/1296 та

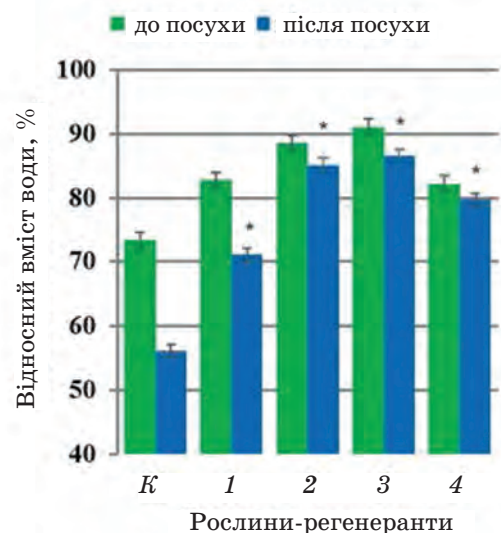
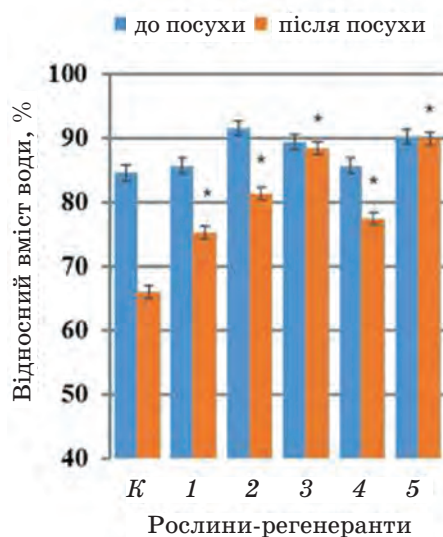


Рис. 5. Відносний вміст води у листках рослин-регенерантів тритикале лінії 38/1296 (а) та сорту Обрій (б) до і після посухи:

тут і далі: К — контроль, 1–5 та 1–4 — стійкі рослини-регенеранти, одержані після клітинної селекції

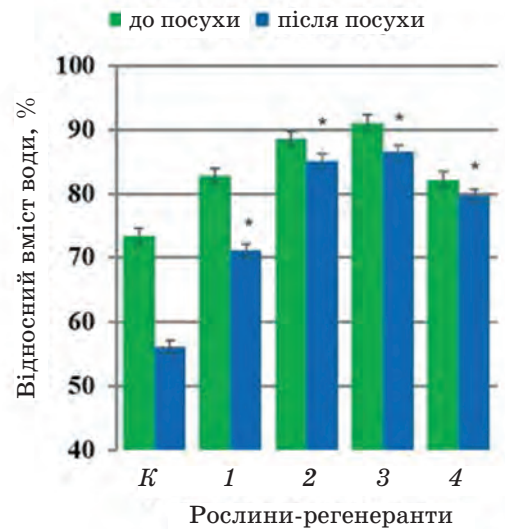
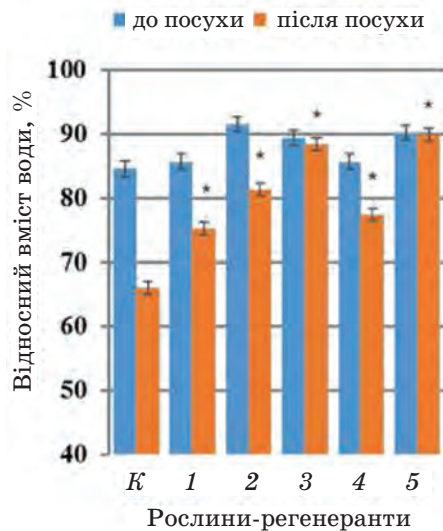


Рис. 6. Вміст вільного проліну в рослин-регенерантів тритикале лінії 38/1296 (а) та сорту Обрій (б)

сорт Обрій, стійких до водного дефіциту. Ступінчастий добір виявився ефективнішим, оскільки в результаті його застосування виділено більше стійких калюсних форм. В обох генотипів виділено стійкі клітинні лінії, які не тільки мали високий рівень виживання на селективному середовищі, але й зберігали морфогенетичний потенціал. Із цих ліній індуковано рослини-регенеран-

ти та проведено їх перевірку на стійкість до водного дефіциту. Під час перевірки було виявлено, що порівняно з рослинами, виділеними з калюсів без селективного чинника, рослини-регенеранти зі стійких ліній характеризувалися достовірно вищим відносним вмістом води за імітованої 3-тижневої посухи та вільного проліну, що свідчить про їхню підвищену стійкість до водного дефіциту.

REFERENCES

1. Pykalo S. V., Voloshchuk S. I. The study of tolerance to salinity of genotypes of winter triticale using isolated microspores culture. *Fiziologhiia roslin i henetyka*. 2014, 46 (3), 267–273. (In Ukrainian).
2. Schipak G. V., Shevchenko N. S., Ivanchenko E. G. Productivity of winter triticale varieties of Kharkov selection. *Zernovyye kultury*. 1997, V. 4, P. 13–14. (In Russian).
3. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency and yield potential — are they compatible, dissonant, or mutually exclusive. *Aust. J. Agric. Res.* 2005, V. 56, P. 1159–1168. doi: 10.1071/AR05069.
4. Dubrovna O. V., Morgun B. V. *In vitro* selection of wheat for resistance to stress factors of environment. *Fiziologhiya i biokhimiya kult. rasteniy*. 2009, 41 (6), 463–475. (In Ukrainian).
5. Zinchenko M. O. *In vitro* selection of wheat for resistance to complex stressors. Ph.D. dissertation, 03.00.15. *Institute of Plant Physiology and Genetics*. Kyiv, Ukraine. 2014. (In Ukrainian).
6. Aly M., Sabry S., Abdelfatah O., Elgharbawy H. *In vitro* screening for the effect of sea water salinity stress on growth and biochemical characteristics of wheat *Triticum aestivum* L. *Intern. J. Appl. Agric. Res.* 2007, 2 (1), 1–11.
7. Manoj K. Y., Tripathi M. K., Yadav D., Kumar S. *In vitro* selection and regeneration methods for wheat improvement. *Wheat Inform. Serv.* 2008, V. 8, P. 1–21.
8. Zinchenko M. A., Dubrovna O. V., Baval A. V. *In vitro* selection of wheat for complex resistance to metabolites of take-all disease agent and water deficit. *Visn. Ukr. t-va henetykiv i seleksioneriv*. 2012, 10 (1), 20–27. (In Ukrainian).
9. Dolgih Yu. I., Larina S. M., Shamina Z. B., Pustovoytova T. N. Drought tolerance of maize plants obtained from resistant to osmotic effects of polyethylene glycol cell lines. *Fiziologhiya rasteniy*. 1994, 42 (6), 853–858. (In Russian).
10. Soboleva G. V. Influence of osmotic stress on processes of growth and morphogenesis in long-term callus cultures of pea (*Pisum*

- sativum* L.). *Zernobobovyye i krupyanyie kultury*. 2013, 5 (1), 8–15. (In Russian).
11. Ermakova E. G., Sharapov N. V., Mazin V. V. Create alfalfa genotypes with increased resistance to abiotic stress. *Aktualnyie problemy biotekhnologii v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii: Proceedings of the 1st International Conference*. Moskva: Vserossiyskiy nauch.-issledov. in-t sel'skokhozyaystv. biotekhnologii RASHN. 1996. (In Russian).
 12. Abdelsamad A., El Sayed O. E., Hayam F. I. Development of drought tolerant double haploid wheat using biochemical genetic markers on *in vitro* culture. *J. Appl. Sci. Res.* 2007, V. 3, P. 1589–1599.
 13. Al-Holani H. A. M. Obtaining of stress tolerant maize plants by cellular selection. Ph.D. dissertation: 03.01.05. *Timiryazev Institute of Plant Physiology*. Moskva, Russia. 2014. (In Russian).
 14. Shirokih I. G., Ogorodnikova S. Yu., Abubakirova R. I. Study of oat regenerants derived from selective systems with aluminum and polyethylene glycol. *Agrokhiimiya*. 2010, V. 10, P. 38–43. (In Russian).
 15. Sakthivelu G. Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. *Gen. Appl. Plant Physiology*. 2008, V. 34, P. 103–112.
 16. Generozova I. P., Maevskaya S. N., Shugayev A. G. Inhibition of the metabolic activity of the mitochondria of etiolated pea seedlings exposed with water stress. *Fiziologiya rasteniy*. 2009, 56 (1), 45–52. (In Russian).
 17. Ahmed A. Response of immature embryos *in vitro* regeneration of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under different osmotic stress of mannitol. *J. Agric. Sci.* 1999, 30 (3), 25–34.
 18. Kolupaev Yu. E., Vayner A. A., Yastreba T. O. Proline: physiological functions and regulation of its content in plants under stress conditions. *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho un-tu. Seriya Biologiya*. 2014, 2 (32), 6–22. (In Ukrainian).
 19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. 15 (3), P. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 20. Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro Cell Dev. Biol.* 2002. 38 (2), 163–168. doi: 10.1079/IVP2001267.
 21. Catsky J. Water saturation deficit (relative water content). In: Slavik N., editor. *Methods of Studying Plant Water Relations*. New York: Springer Verlag. 1974, P. 136–154.
 22. Andryuschenko V. K., Sayanova V. V., Zhuchenko A. A. Modification of the method for determining the proline to identify drought-resistant forms of the genus *Lycopersicon* Tourn. *Izv. Akad. nauk Mold. SSR*. 1981, V. 4, P. 55–60. (In Russian).
 23. Lakin G. F. *Biometrics*. Moskva: Vysshaya shkola. 1990, 352 p. (In Russian).
 24. Baval A. V., Dubrovna O. V., Lyalko I. I. *In vitro* selection of wheat to resistance of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Fiziologiya i biokhimiya kult. roslyn*. 2009, 41 (4), 314–320. (In Ukrainian).
 25. Amirova A. K., Bishimbaeva N. K., Rakhimbayev I. R. Overcoming genotype limitation and long-term regeneration maintenance in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue culture. *Bull. of State Nikit. Bot. Gard.* 2002, N 86, P. 21–23.
 26. Svabova S., A. Lebeda L. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *J. Phytopathol.* 2005, V. 153, P. 52–64. doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00928.x
 27. Pykalo S. V. *In vitro* selection of genotypes of winter triticale for resistance to osmotic stress. *Advances in genetics, plant breeding and cropping to improve grain production: Collected Abstracts of International Scientific Conference of Young Researchers, Myronivka, Ukraine*. 18 June 2014. (In Ukrainian).
 28. Omae H., Kumar A., Egawa Y., Kashiwaba K., Shono M. Midday drop of leaf water content related to drought tolerance in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Prod. Sci.* 2005, V. 8, P. 465–467. doi: 10.1626/pp.s.8.465.

СЕЛЕКЦИЯ *in vitro* ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВОДНОМУ ДЕФИЦИТУ

С. В. Пыкало¹
М. А. Зинченко²
С. И. Волощук¹
О. В. Дубровная²

¹Мироновский институт пшеницы
имени В. Н. Ремесла Национальной академии
аграрных наук Украины, Киевская область

²Институт физиологии растений и генетики
НАН Украины, Киев

E-mail: pykserg@ukr.net

С использованием селективной системы с низкомолекулярным маннитом проведена прямая и ступенчатая селекция *in vitro* и осуществлен отбор каллусных линий тритикале озимого, устойчивых к моделируемому водному дефициту. В результате исследований у линии 38/1296 и сорта Обрий было выделено соответственно 5 и 4 устойчивых каллусных линий, которые имели высокий уровень выживаемости на селективной среде с 0,6 М маннита и сохраняли морфогенетический потенциал. Из устойчивых культур индуцированы растения-регенеранты и оптимизировано их доращивание, укоренение и перевод в условия *in vivo* с последующей проверкой на устойчивость к водному дефициту. Во время проверки в условиях моделированной 3-недельной засухи было обнаружено, что по сравнению с неустойчивыми растениями регенеранты устойчивых линий характеризовались достоверно более высоким относительным содержанием воды и свободного пролина. Ступенчатый отбор оказался эффективнее, поскольку в результате выделено большее количество устойчивых каллусных форм. Оценка полученных растений-регенерантов тритикале обнаружила повышенный уровень толерантности к водному дефициту.

Ключевые слова: *Triticosecale*, селекция *in vitro*, растения-регенеранты, осмотический стресс.

In vitro SELECTION OF WINTER TRITICALE FOR RESISTANCE TO WATER DEFICIT

S. V. Pykalo¹
M. O. Zinchenko²
S. I. Voloshchuk¹
O. V. Dubrovna²

¹Remeslo Myronivka Institute of Wheat
of the National Academy of Agrarian Sciences
of Ukraine, Kyiv region

²Institute of Plant Physiology and Genetics
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: pykserg@ukr.net

The direct and step-type *in vitro* selection with application of selective system based on low molecular mannitol and the selection of callus lines of winter triticale being resistant to simulated water deficit were 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 0.6 M mannitol and maintained morphogenetic potential. From the resistant lines plant regenerants were induced and their rearing, rooting and transfer to *in vivo* conditions were optimized and followed by testing to water deficit tolerance. During the testing under simulated 3-weeks drought it was revealed that plant regenerants derived from resistant lines were characterized with reliably higher relative water content and free proline content as compared with non-resistant plants. A step-type *in vitro* selection was more effective, because resulted from the selection more resistant callus forms were identified. Evaluation of plant regenerants of triticale obtained from resistant calli showed increased level of their tolerance to water deficit.

Key words: *Triticosecale*, *in vitro* selection, plant regenerants, osmotic stress.