

Вплив NaCl на активність антиокислювальних ферментів у селектованих і неселектованих калюсів тритикале озимого сорту Обрій Миронівський

Концентрація NaCl (мМ)	СОД (од./мг білка)		АПО (од./мг білка)		КАТ (од./мг білка)	
	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані	неселектовані	селектовані
0 (Контроль)	41,0±0,76	42,6±0,34	0,89±0,23	0,87±0,67	24,32±0,57	23,94±0,44
50	44,8±0,45	50,5±0,56	1,42±0,12	2,44±0,56	21,01±0,71	27,58±0,48
100	38,4±0,36	75,8±0,65	0,74±0,34	2,85±0,67	15,32±0,64	41,74±0,54
150	31,4±0,65	50,6±0,48	0,56±0,56	1,97±0,56	11,64±0,46	28,18±0,26

селективному середовищі сітку як підкладку разом з калюсами переносили на середовище МС з 500 мг/мл гваяколу. Чашки ставили в термостат на 3 год. при 24°C. Пероксидазна активність проявлялась у вигляді почервоніння калюсів. Використання прижиттєвого фарбування калюсів показало, що толерантні калюсні лінії фарбувались у 80–90% випадків, тоді як нестійкі – тільки у 10–20%.

З відібраних на селективному середовищі калюсних ліній отримано рослини-регенеранти. При цьому слід зазначити, що з сорту Обрій Миронівський регенеранти отримано після двох циклів селекції на середовищі зі 150 мМ NaCl, тоді як для сорту АДМ 4 – тільки після одного.

Таким чином, на основі отриманих даних можна припустити, що толерантність калюсних ліній до підвищених концентрацій (150 мМ) NaCl забезпечується за рахунок підтримки цілісності мембран і підвищених рівнів антиоксидантної активності.

УДК 633.11:631.523.085:581.143.6:631.524.86.01

СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ТРИТИКАЛЕ ГЕКСАПЛОЇДНОГО З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЇ

М.В. Харченко, С.І. Волощук

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН, Україна

e-mail: mwheats@ukr.net

Первинні тритикале, або пшенично-житні амфідиплоїди, що отримані від схрещування пшениці твердої з житом, відіграють важливу роль у селекції сортів з високим адаптивним потенціалом. Проте отримані гібридні зернівки мають низьку життєздатність, а селекційне використання обмежене низькою фертильністю, обумовленою цитологічною нестабільністю мейозу в материнських клітинах пилку. Тому актуальною є розробка і застосування методів, які підвищують ефективність отримання та цитогенетичну стабільність первинних тритикале, що прискорює селекційний процес.

Синтез гібридних популяцій для отримання первинних тритикале зазвичай проводять шляхом схрещування твердих пшениць та жита з подальшим застосуванням культури зародків і колхіцинування; схрещування озимих м'яких пшениць та жита з подальшим запиленням пшенично-житніх гібридів F₁ гексаплоїдними тритикале або F₁ міжсортів гібридів гексаплоїдних тритикале; схрещування 42-хромосомних тритикале з м'якою пшеницею з подальшим бекросом гексаплоїдними тритикале або пилком F₁ міжсортів гібридів тритикале; схрещування 42-хромосомних тритикале з м'якою пшеницею з подальшим бекросом гексаплоїдною пшеницею. Основною проблемою отримання інтрогресивних форм є несумісність віддалених видів. Розв'язанню цих проблем сприяють нетрадиційні технології *in vitro*, що відкривають широкі перспективи гібридизації між таксономічно віддаленими видами.

Результативність внутрішньовидової гібридизації дає можливість розглядати такий тип схрещувань як один з найбільш ефективних шляхів створення вихідного матеріалу у практичній селекції тритикале. Однак такий підхід однозначно призводить до зменшення генетичного різноманіття і, як наслідок, до збіднення генофонду, тому потрібно проводити інтрогресію чужорідного генетичного матеріалу від інших видів. Віддалені схрещування в селекційних програмах спрямовані на введення в генеалогію створюваних сортів нових зразків з останніх досягнень в селекції озимого тритикале, жита та пшениці.

У дослідженнях використано 6 генотипів *Triticum durum* (D 166, Харківська 32, Карат, Чорноколоска 46, Прибуткова, Гордеїформе 3); 5 генотипів *Secale cereale* L. (Хасто, Юр'ївець, Rasant, Хамарка, Харківське 96), а також ряд генотипів тритикале озимого, пшениці озимої та тритикально-пшеничних гібридів.

У роботі використано такі типи схрещувань: *T. durum* / *S. cereale* + культура зародків і колхичинування, *S. cereale* / *T. durum* + культура зародків і колхичинування, *T. aestivum* / *S. cereale* // *Triticale*, *Triticale* / *T. aestivum* // *Triticale*, *T. aestivum* / *Triticale* // *Triticale*, *Triticale* / *Triticale* (озиме, яре), *Triticale* / *Triticale* // *Triticale*, *Triticale* / *Triticale* // *Triticale* / *Triticale*

Залежно від типу схрещування та індивідуальних особливостей батьківських пар зав'язування гібридного насіння варіювала від 0 до 95%. Кращим зав'язування було у простих і складних міжсортних схрещуваннях тритикале на гексаплоїдному рівні (від 19 до 93%). У віддалених схрещуваннях тритикале з м'якою пшеницею частка зав'язування в середньому становила 9,2% гібридних зернівок з хорошою польовою схожістю. У зворотних схрещуваннях (материнська форма – м'яка пшениця) відсоток запліднення у 2 рази вищий, проте гібридні зернівки були дуже щуплими з польовою схожістю 1–2%, а по деяких комбінаціях зовсім не схожими.

Тому при використанні пшениці м'якої за материнську форму ефективною є культура зародків на штучному поживному середовищі (*embryo rescue*).

Врятування, дорошування і пророщування гібридних зародків на штучних поживних середовищах проводили згідно з методикою ембріокультури (*embryo rescue*). Вилучені на 14–18-й день після запилення гібридні зародки розміщували на безгормональному середовищі MS з концентрацією сахарози 15 г/л і культивували до появи проростків. Пророщування гібридних зародків проводили при 24±2°C, дорошування – при кімнатній температурі за природної тривалості світлового дня.

Метод культури незрілих зародків застосовано нами не тільки для отримання первинних тритикале, а також при гібридизації тритикале з м'якою пшеницею. На наш погляд, цей метод забезпечує наступні переваги: можливість максимального збереження цінних генотипів, а також яровизації рослин з озимим типом розвитку в умовах *in vitro* (для цієї мети придатний навіть побутовий холодильник); ембріокультура в поєднанні з яровизацією *in vitro* дає можливість «депонування» окремих генотипів та їх подальшого використання в селекційно-генетичних дослідженнях.

Дещо поліпшити зав'язування можна, застосовуючи гібридизацію на відсіченому колосі, який перед запиленням розміщується на штучному живильному середовищі. Цей метод був удосконалений нами і, незважаючи на ряд недоліків, дає певні переваги, зокрема, можливість синхронізувати у розвитку батьківські форми, зменшити залежність від зовнішніх умов та забезпечити кращий розвиток гібридних зародків при віддалених схрещуваннях за рахунок додавання до середовища регуляторів росту і розвитку.

Результативність різних варіантів схрещувань у полі та *in situ* представлена у таблиці 1.

Широкий діапазон мінливості зав'язування насіння за типами схрещування свідчить про складну взаємодію каріотипу і плазмогена, незбалансованість геномів, хромосом та прояв генів схрещуваності, за якими розрізняються залучені батьківські форми всіх трьох родів. Зокрема, схрещуваність пшениці і жита контролюють гени *Kr1* і *Kr2*, локалізовані на хромосомах пшениці 5B і 5A. Якщо ознака домігантна, ці гени запобігають формуванню гібридного насіння, при цьому *Kr1* має більший ефект, ніж *Kr2*. Додатковий ген на

Таблиця 1

Зав'язування насіння за різних типів схрещувань (2013–2015 рр.)

№ варіанта	Комбінації		<i>In situ</i>				Полеві умови			
	♀	♂	запилено квіток	отримано зернівок	зав'язування, %	Sp	запилено квіток	отримано зернівок	зав'язування, %	Sp
1	Пт*	Ж	1262	58	4,6	1,9	840	12	1,4	2,4
2	Ж	Пт	667	15	2,2	2,7	624	0	0,0	2,8
3	Т	Пм	899	128	14,2	2,2	1074	5	0,5	2,2
4	Пм	Т	615	31	5,0	2,8	672	6	0,9	2,7
5	Т	Ж	659	51	7,7	2,6	1446	2	0,1	1,9
6	Ж	Т	385	44	11,4	3,4	600	3	0,5	2,9
7	Тп	Т	508	12	2,4	3,1	960	1	0,1	2,3
8	Т	Тп	659	51	7,7	2,6	504	0	0,0	3,1
9	Т	Пег	437	38	8,7	3,2	912	7	0,8	2,3
10	Пег	Т	443	28	6,3	3,3	948	30	3,2	2,3
11	Т	Т	8487	3910	46,1	0,6	972	315	32,4	1,9
Всього			13759	4308	31,3	0,5	8712	381	4,4	369

*Пт – тиєниця тверда, Ж – жито, Пм – тиєниця м'яка, Т – тритикале, ПЕГ – тиєнично-егілопні гібриди

хромосомі 5D, що був позначений як Kr3, має слабкий ефект схрещуваності. Тому зав'язування у віддалених схрещуваннях часто є непередбачуваним.

Використання гібридних зародків від віддалених схрещувань для індукції калюсогенезу і подальшої регенерації рослин дало можливість клонального розмноження отриманих гібридів. Ефективність клонального розмноження залежала значною мірою від обох компонентів схрещування. Відповідно до наших досліджень можна зробити припущення, що існує генотипспецифічний розмір зародка або рівень диференційованості його тканин, коли тканини щитка перебувають у стані найбільшої сприйнятливості до умов культивування.

Процес ініціації ембріогенних зон у тканинних культурах залежить від генотипу. Максимальна кількість таких зон спостерігалась через 2 тижні після пересаджування культур на середовище зі зниженим вмістом 2,4-Д (0,5–0,7 мг/л), тобто приблизно через 45 днів після початку культивування. Найнижчий рівень калюсогенезу виявлено у комбінаціях *Aegilops* spp. / *T. aestivum*, *S. cereale* / *T. aestivum*, *T. aestivum* / *S. cereale*.

Проте метод одержання рослин шляхом індукування калюсогенезу з незрілих зародків виявився більш перспективним, ніж пряме дорощування, оскільки частота збереження відповідних гібридних комбінацій, а також питомий вихід рослин через соматичний ембріодогенез були значно вищими, ніж у ембріокультурі. При цьому скільки-небудь істотних лінійних залежностей між цими процесами встановити не вдалося (коефіцієнт кореляції 0,08), що може вказувати на різну їхню фізіологічну основу і генетичний контроль.

Частота і тривалість процесу індукції ембріогенних зон у тканинних культурах залежала від генотипу обох компонентів схрещування. Підтвердилось існування генетичного контролю калюсогенезу, ембріодогенезу і регенерації, так само як і вплив на вираження у віддалених гібридах ознак генотипів обох батьків, що, імовірно за все, контролюється

різними генетичними системами.

Виявлено високу ефективність отримання рослин (від 200 до 400% порівняно з польовими умовами). При цьому введення в ембріокультуру зародків, отриманих у польових умовах, супроводжувалось їх значною втратою (біля 50%) через контамінацію, тоді як зародки, отримані на відсіченому колосі, були значно життєздатнішими.

При введенні гібридних зародків у калюсну культуру основним середовищем було середовище MS. При цьому введення в середовище аналога ауксину 2,4-Д регулювало програму розвитку зародка віддалених гібридів по різних типах морфогенезу в залежності від специфічності батьківських компонентів.

Виявлена можливість досягнення амфідиплоїдного рівня в культурі клітин незрілих зародків гібридів F_1 від віддалених схрещувань при використанні диплоїдизуючих агентів, безпосередньо додаючи їх у середовище культивування.

Таким чином, використання біотехнологічних елементів підвищує ефективність отримання первинних тритикале та клонального розмноження отриманих генотипів.