

Аннотація

Москалевская Ю.П., Патыка Н.В., Карпенко О.Ю., Рожко В.М., Танчик С.П., Житкевич Н. В.

Особенности формирования микробиоты чернозема типичного Лесостепи Украины и его биологической активности при применении различных систем земледелия

Проведен анализ численности грибной и бактериальной микрофлоры ризосферы свеклы сахарной при применении различных систем земледелия. Определена общая биологическая активность почвы.

Ключевые слова: почвенная микробиота, биологическая активность почвы, сахарная свекла, системы земледелия, способы основной обработки почвы

Annotation

Moskalevska Y., Patyka M., Karpenko O., Rozhko V., Tanchyk S., Zhytkevych N.

Features of microbiota formation of chernozem typical of Ukraine forest steppe and its biological activity in the application of different agrarian systems

The analysis of the number of fungal and bacterial rhizosphere microflora of sugar beet in the application of different farming systems. It was determined the general biological activity of the soil.

Keywords: soil microbiota, microbiological activity of soil, sugar beet, agrarian systems, soil tillage

УДК 633.11:631.523.085:581.143.6:631.524.86.01

С.В. ПИКАЛО, молодший науковий співробітник

С.І. ВОЛОЩУК, кандидат с.-г. наук, зав. відділу біотехнології селекційного процесу

В.С. КОРЧМАРСЬКИЙ, кандидат с.-г. наук, директор

Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України

E-mail: volsi@ukr.net

ВИКОРИСТАННЯ АНДРОГЕННИХ КУЛЬТУР ДЛЯ ОЦІНКИ СТІЙКОСТІ ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО ДО АБІОТИЧНИХ ФАКТОРІВ СЕРЕДОВИЩА

Показано можливість використання прийомів клітинної селекції на гаплоїдному рівні. Створення в середовищі культивування in vitro сольового, осмотичного та іонного стресу викликає уповільнення росту андрогенної культури. Для оцінки реакції генотипів на стресові умови можна використовувати такі показники, як відносна толерантність, здатність до регенерації та параметри росту андрогенних культур на селективних середовищах. Більш чітку диференціацію спостерігали при вищих концентраціях селективних агентів (0,1-0,4 М NaCl; 10- 20 % ПЕГ-6000; 1-2 мМ Al-ЕДТА) протягом 2-4 циклів субкультивування (4-8 тижнів).

Ключові слова: тритикале, гаплоїдні культури, стійкість до абіотичних факторів

Вступ. У світі все більше уваги приділяють пошуку шляхів використання як енергоресурсів поновлюваної енергії (біопалив), накопиченої рослинами завдяки фотосинтезу. Тритикале є однією з перспективних біоенергетичних культур, зокрема для виробництва біоетанолу [1-3]. Воно вдало поєднує властивості своїх батьків: високу зимостійкість, стійкість до хвороб та здатність до вирощування в маргінальних умовах. Проте погіршення екологічної ситуації викликає нагальну необхідність поліпшення стійкості тритикале до ряду абіотичних факторів – засолення та закислення ґрунтів та посухи.

Селекційні програми тритикале у всьому світі спрямовані в основному на поліпшення врожайності за рахунок толерантності до абіотичних і біотичних стресів [4]. Толерантність до абіотичних стресів (посушливі, перезволожені, лужні і кислі ґрунти), а також толерантність до недостатності мінерального живлення або токсичності таких елементів, як алюміній, мідь, цинк, магній і бор, поліпшує виробництво сільськогосподарських культур в маргіналь-

них районах [5]. Селекція на посухостійкість та солестійкість на основі оцінки урожайності є складним завданням, тому що успадковуваність урожайності в умовах стресу зазвичай низька, в зв'язку з невеликою генотиповою дисперсією або через значну варіансу взаємодії генотип-середовище [6]. Селекційне поліпшення стає довготривалим і ненадійним. Таким чином, при стресових умовах урожайність не завжди є найбільш придатною і простою ознакою добору, тому оцінка, добір та включення нових фізіологічних і біохімічних ознак у потенційно високопродуктивний генотип може підвищити його адаптивність [7].

Культура *in vitro* рослинних клітин і тканин, таких як зрілі і незрілі зародки, викликає значний інтерес та вважається важливим доповненням до класичних методів селекції рослин, оскільки вона надає можливість більш тонкого вивчення фізіологічних і генетичних процесів і поліпшення сортів за рахунок збільшення генетичної мінливості.

Методика добору *in vitro* використовується для поліпшення толерантності до абіотичних екологічних стресів, таких як морозостійкість, солестійкість та посухостійкість [8, 9]. Проте клітинна селекція на гаплоїдному рівні апріорі може бути більш ефективною за рахунок того, що знімається вплив гетерозиготності. Тому розробка методів оцінки стійкості тритикале до абіотичних факторів з використанням андрогенних культур є актуальним завданням.

Метою досліджень була розробка біотехнологічних підходів до первинного скринінгу на стійкість до абіотичних факторів та створення нового вихідного матеріалу для селекції тритикале озимого.

Матеріали та методика досліджень. У роботі використовували колосся сортів тритикале АДМ 11, Амур, Валентин 90, 8 пшенично-тритикальних гібридних комбінацій F₁ і два сорти пшениці: Атлас 66 та Саратовська 11. Андрогенні культури отримували через культуру ізольованого пилку модифікованим нами методом [10]. Холодову обробку колосся проводили, витримуючи зрізані колосся, пилки у яких перебував в стадії ранньої чи середньої одноядерної мікроспори, у холодильній камері при температурі 3-5°C, без освітлення, протягом 6 – 14 діб. Матеріал стерилізували 0,25 % гіпохлоритом натрію протягом 7 – 10 хвилин з наступним промиванням стерильною соляною кислотою протягом 10 хвилин, потім тричі промивали стерильною дистильованою водою. Культивування ізольованих мікроспор проводили у флаконах ємкістю 15 мл, що містили 1,5 мл живильного середовища, як описано нами раніше [10]. В одному флаконі культивували приблизно 10⁵ ізольованих мікроспор.

При приготуванні і модифікації живильних середовищ за основу брали середовища по пропису 190-2 [11]. Усі компоненти стерилізували фільтрацією. Ембріюїди підраховували через 4 тижні культивування, регенеранти отримували за 6-10 тижнів (залежно від варіанта) на безгормональному середовищі.

Селективні середовища були доповнені селективними агентами: NaCl, поліетиленгліколю (ПЕГ-6000) та Al-ЕДТА в різних концентраціях, які описано нижче.

Для оцінки життєздатності використовували такі параметри: кількість ембріюїдоподібних структур (ЕПС), відносна кількість життєздатних ЕПС, маса ЕПС та відсоток регенерації. Використовували також показник відносної толерантності (Rt), який розраховували для кожного генотипу за наступною формулою [12]: $Rt\% = \frac{[\text{значення в умовах стресу}]}{[\text{значення в нестресових умовах}]} \times 100$.

Результати досліджень. Введення в поживне середовище різних селективних агентів дає змогу вивчати їх дію на культуру на клітинному рівні за умови адекватної реакції, причому один і той же зразок можна використовувати в різних дослідах. Навіть при високих дозах стрес-фактора частина клітин (у центрі глобул) залишаються живими і при перенесенні в звичайне середовище може відновлювати свій ріст. При цьому з'являється можливість використовувати андрогенні культури як тест-систему для оцінки генотипів на стійкість до несприятливих умов.

Перш за все, необхідно було вибрати параметри, за якими можна характеризувати ту чи іншу клітинну популяцію при дії будь-яких факторів. Стресові фактори, як правило, пригнічують ріст рослинних організмів, тому часто використовують різні показники росту. На-

приклад, для оцінки реакції калюсних тканин на присутність NaCl використовували такий показник росту, як відносний ріст сирової маси [13]. Використовують також показник темп росту калюса [12]. Проте, на наш погляд, найбільш інформативним показником є відносна толерантність (Rt) [12].

Солестійкість в андрогенній культурі вивчали на матеріалі двох сортів з різною стійкістю в умовах вегетаційного дослідження: відносно стійкий сорт пшениці – Атлас 66 та сорт тритикале АДМ 11, який є дещо стійкішим. Через 4 тижні культивування до середовища додавали NaCl (0,05–0,4 М). Вплив NaCl на життєздатність ЕПС представлено на рис. 1.

Додавання NaCl у середовище викликає помітне пригнічення росту андрогенної культури в обох сортів, проте, у кількісному відношенні між ними є відмінності, які свідчать про відповідність реакції сортів на клітинному рівні і рівні цілісного організму.

Через 6 тижнів культивування при низьких концентраціях NaCl стійкість андрогенної культури до NaCl у сорту Атлас 66 дещо підвищується. Можливо, відбувається адаптація чи клональний відбір всередині кожного варіанту. У сорту АДМ 11 відносна толерантність вірогідно не змінювалась протягом 8 тижнів.

При високій концентрації (0,4 М) спостерігали зниження показників росту андрогенної культури, а при подальшому культивуванні в присутності 0,4 М NaCl відбувалось майже повне пригнічення процесу росту і розвитку.

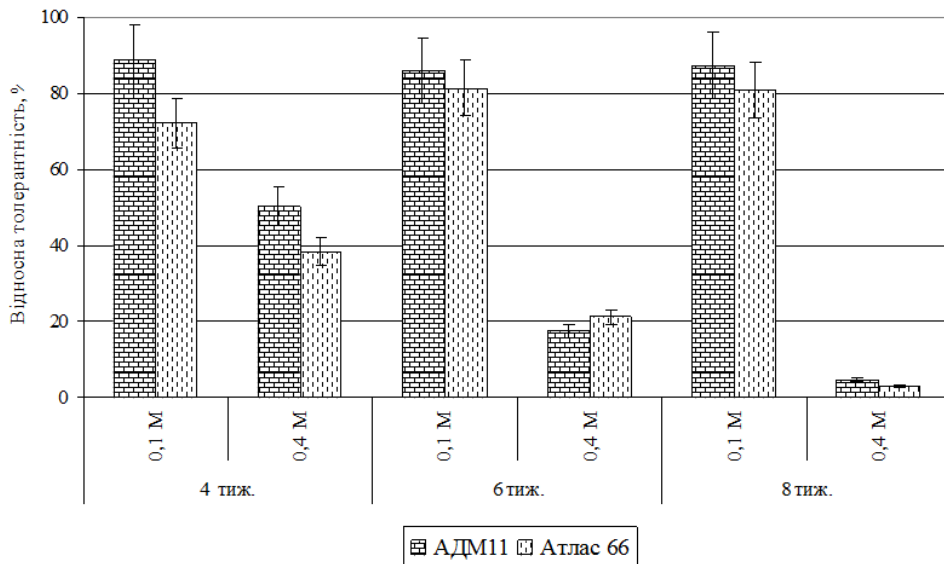


Рис. 1. Вплив концентрації NaCl на відносну толерантність в андрогенній культурі пшениці та тритикале.

Пасаж на безгормональне середовище супроводжувався індукцією ембріодогенезу. Але в присутності 0,4 М NaCl у жодного з сортів не спостерігали навіть ризогенез. Очевидно, до певних меж (в даному випадку до 0,2 М) процеси диференціації відрізняються меншою чутливістю до несприятливого впливу NaCl.

Однак, для тривалого культивування описані вище умови мало придатні, тому що при низьких концентраціях NaCl істотний вплив виявляють механізми адаптації, а при високих — спостерігається значне інгібування росту і, зрештою, загибель клітинної популяції.

Це спонукало перевірити можливість оцінки на солестійкість на рівні здатних до регенерації ембріодоподібних структур. Така оцінка була проведена з ЕПС, отриманими у культурі ізольованого пилку на середовищі без добавок. Ці культури переносили на середовище для регенерації з добавкою NaCl. Результати, представлені у табл. 1, показують, що хлористий натрій дуже сильно інгібує регенераційну здатність у вибраному діапазоні концентрацій.

Вплив NaCl у середовищі на регенераційну здатність ЕПС, отриманих з культури ізолюваного пилку

Середовище	Тритикале АДМ 11				Пшениця Атлас 66			
	К-сть ЕПС	Регенерація, частка від перенесених ЕПС, %			К-сть ЕПС	Регенерація, частка від перенесених ЕПС %		
		Зелені	Альбіно	Всього		Зелені	Альбіно	Всього
Контроль	56	12,5	14,3	26,8	61	8,2	13,1	21,3
0,1 М NaCl	74	2,7	14,9	17,6	75	0	4,0	4,0
0,2 М NaCl	76	0	7,9	7,9	81	0	0	0
0,4 М NaCl	78	0	0	0	84	0	0	0

Перевірка можливості добору *in vitro* на гаплоїдному рівні була проведена на 8 гібридних комбінаціях тритикально-пшеничних гібридів (рис. 2-3). Оцінювали відносну толерантність та регенераційну здатність.

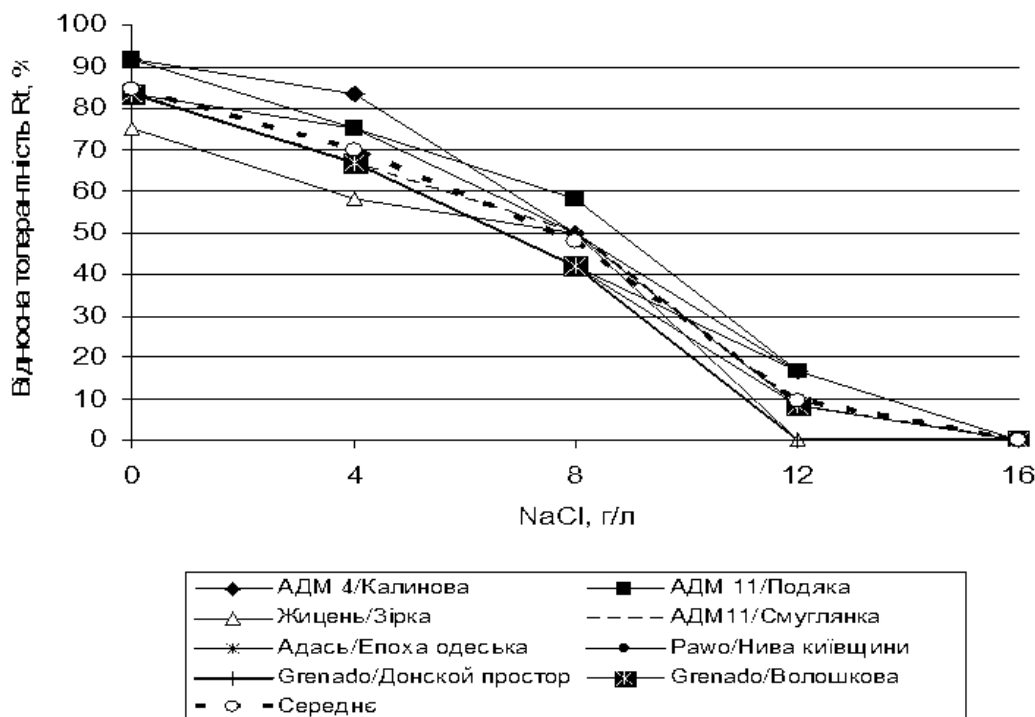


Рис. 2. Вплив NaCl на відносну толерантність в андрогенній культурі тритикально-пшеничних гібридів.

Як показали отримані результати та їх дисперсійний аналіз, напевно говорити про можливість такого добору на рівні гаплоїдного калюса, індукованого з мікроспор, без оцінки отриманого потомства поки що передчасно, особливо зважаючи на те, що кожна мікроспора гібрида F₁ в межах одного пилка є унікальним генотипом.

Посухостійкість рослин — комплексна ознака, і на рівні цілої рослини враховують такі параметри, як глибина залягання коріння, товщина кутикули, зміна контролю змикання устечок і т.п. При осмотичному стресі відбувається також накопичення води в клітинах і активація її транспорту, тобто проявляється стійкість протоплазми, а в умовах глибокого водного стресу у рослин виникають незворотні порушення метаболізму [14].

Для встановлення сортоспецифічності відповіді на клітинному рівні вивчали андрогенні культури 3 сортів: посухостійкий сорт пшениці Саратовська 11 і два сорти тритикале Амур та Валентин 90. Селективні середовища містили ПЕГ 6000 в різних концентраціях. Результати представлені на рис. 4.

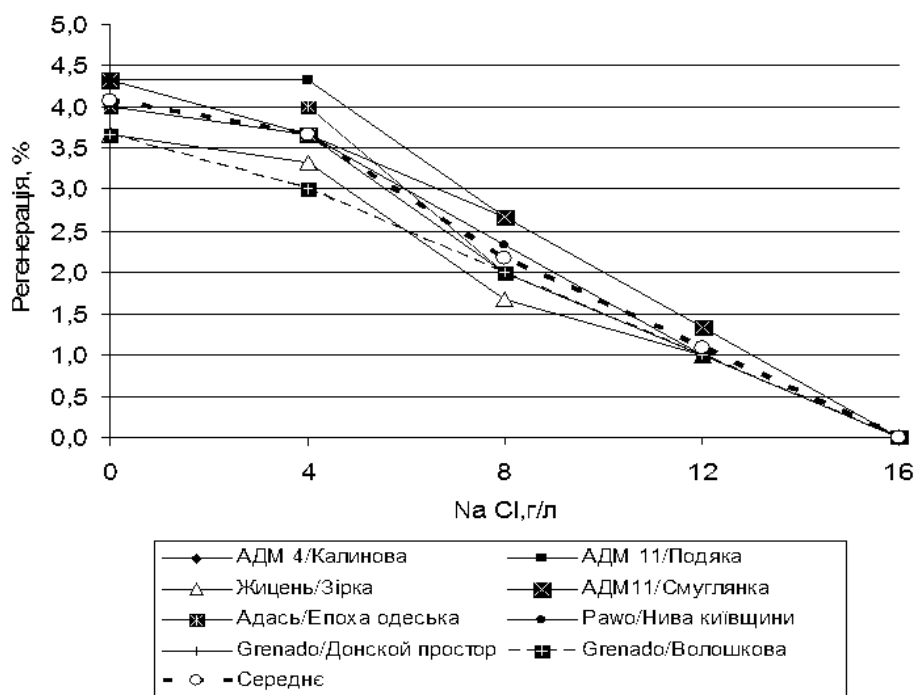


Рис. 3. Вплив NaCl на регенераційну здатність в андрогенній культурі тритикально-пшеничних гібридів.

Зі збільшенням часу культивування показник відносної толерантності у культурі знижувався у всіх сортів. Дисперсійний аналіз показав вірогідний вплив всіх факторів на кількість життєздатних ЕПС, причому найбільший вплив виявляла концентрація та двофакторна взаємодія (генотип x концентрація).

В середовищі без 2,4-Д у всіх варіантах спостерігали індукцію ембріодогенезу, тобто ПЕГ у діапазоні використовуваних концентрацій не пригнічував процесів диференціації, як це було в присутності 0,4 М NaCl. Отже, найбільш адекватним показником для оцінки посухостійкості в андрогенній культурі є відносна толерантність при дії високих концентрацій ПЕГ протягом 6-8 тижнів.

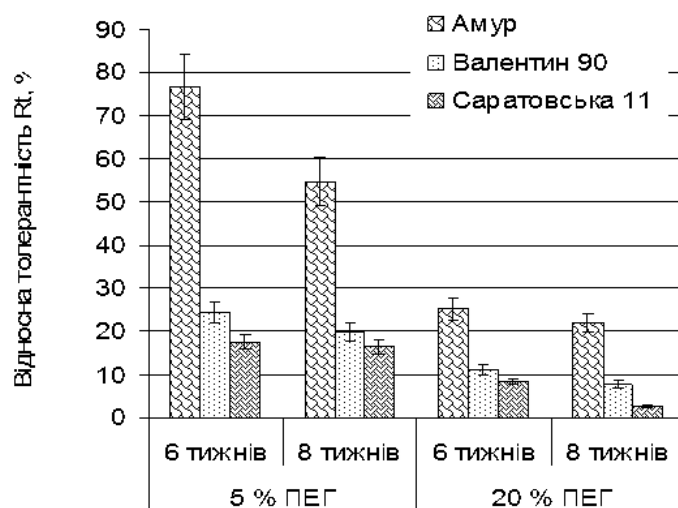


Рис. 4. Вплив ПЕГ-6000 на ріст андрогенної культури пшениці та тритикале: по вертикалі — відносна толерантність, % до контролю; по горизонталі — концентрація ПЕГ (%) і тривалість культивування з ПЕГ.

Закислення ґрунту проявляється через токсичну дію іонів алюмінію, які переходять в розчинну форму при низьких рН [14]. Тому ці умови моделювали додаванням Al-ЕДТА при знижених рН середовища.

Дослідження проводили на 3 сортах: сорт пшениці Атлас 66 (як стійкий до закислення) і сорти тритикале озимого Амур та Валентин 90. Ефект-дозові криві представлені на рис. 5.

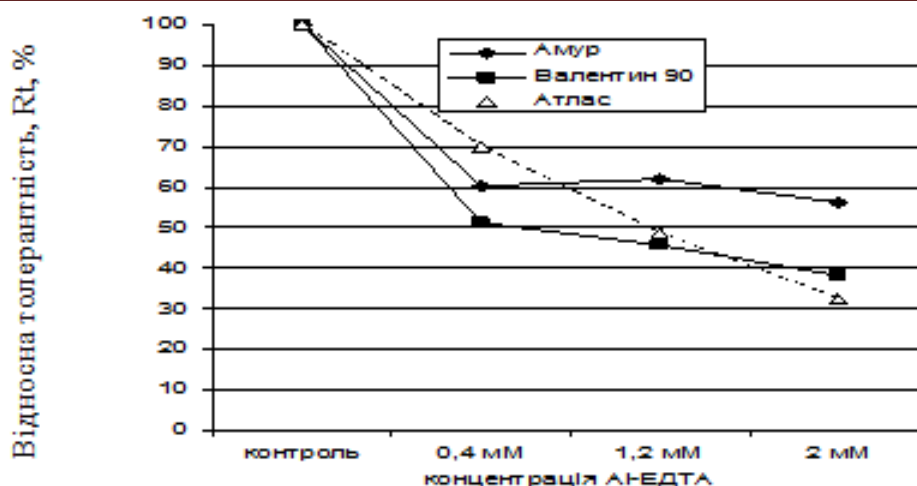


Рис. 5. Вплив іонів алюмінію на ріст андрогенної культури пшениці та тритикале.

У порівнянні з іншими стресами, стійкість до іонів алюмінію і підвищеної кислотності добре проявляється на клітинному рівні і виявляється найбільш залежною від генотипу. Зі збільшенням експозиції відмінності між менш стійкими генотипами зменшувались. Відомо, що стійкість до іонів алюмінію на рівні рослин має генетичну основу, зокрема, стійкість до іонів алюмінію у пшениці (і саме для сорту Атлас 66) контролюється факторами, локалізованими в 5D-хромосомі. Ідентифіковано чотири гени стійкості до алюмінію в геномі жита: 6RS (Alt1), 3R (Alt2), 4RL (Alt3) та 7RS (Alt4) [15]. Дисперсійний аналіз впливу факторів експерименту на кількість життєздатних ЕПС показав максимальний вплив саме генотипу, що підтверджує генетичну обумовленість толерантності до токсичної дії іонів алюмінію.

Механізми стійкості до іонів металів полягають головним чином у здатності зв'язувати іони, не допускаючи їх проникнення в клітину. В ролі хелатуючого агента може виступати яблучна або лимонна кислота [14]. Останнє було виявлено в культурі клітин моркви після відбору на стійкість до алюмінію у вигляді $AlCl_3$. Однак, автори відмічають, що дані клітинні лінії були чутливими до Al-ЕДТА. Таким чином, повинні існувати інші сполуки, які зв'язують іони алюмінію. Це можуть бути речовини білкової природи, збагачені амінокислотами лужного характеру. Можливо, секреція таких сполук, які нейтралізують підвищену кислотність або утворюють стійкі хелатні комплекси з іонами токсичних металів, відбувалась і в досліджуваних нами андрогенних культурах тритикале та пшениці. Це буде предметом подальших досліджень.

Висновки.

1. Створення в середовищі культивування сольового, осмотичного та іонного стресу викликає уповільнення росту андрогенної культури. Для оцінки реакції генотипів на стресові умови можна використовувати такий показник, як відносна толерантність.

2. Більш чітку диференціацію спостерігали при високих концентраціях селективних агентів (0,1-0,4 М NaCl; 10-20 % ПЕГ-6000; 1-2 мМ Al-ЕДТА) протягом 2-4 циклів субкультивування (4-8 тижнів).

Перспективою є розробка нових елементів біотехнології з використанням андрогенезу для селекції озимого тритикале і добору на гаплоїдному рівні селекційного матеріалу, стійкого до абіотичних стресових чинників.

Список використаних літературних джерел

1. Triticale usage in the biotechnological processes – Bioethanol and lactic acid production / M. Marković, S. Markov, D. Pejin, L. [et al.] // Zb. radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. – 2011. – 20. – P. 105–113.

2. Рибалка О. Одержання біоетанолу із зернових виглядає привабливішим, ніж дизельного пального із соняшнику й ріпаку / О. Рибалка, В. Соколов // Зерно і хліб. – 2006. – № 4. – С. 22–24.

3. Хареба В. В. Наукові аспекти виробництва біоетанолу в Україні / В. В. Хареба // Вісник цукровиків України. – 2012. – Вип. 72, № 5. – С. 17–19.

4. Triticale crop improvement: the CIMMYT programme / M. Mergoum, W. Pfeiffer, R. Peña

[et al.] // *Triticale improvement and production*. – 2004. – P. 11–27.

5. Jellis G. J. Crop plant resistance to biotic and abiotic factors: combating the pressures on production systems in a changing world / G. J. Jellis // *Crop Plant Resistance to Biotic and Abiotic Factors* (Feldmann F., Alford D. V., Furk C.; eds.). – 2009. – P. 15–20.

6. Drought tolerance studies on wheat/rye disomic chromosome addition lines / [B. Koszegi, E. Farshadfar, A. Vagujfalvi, J. Sutka] // *Acta Agron. Hung.* – 1996. – V. 44. – P. 121–126.

7. Blum A. Drought resistance, water-use efficiency and yield potential — are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? / A. Blum // *Aust. J. Agric. Res.* – 2005. – P. 1159–1168.

8. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure / I. Zair, A. Chlyah, K. Sabounji [et al.] // *Plant Cell Tiss.* – 2003. – V. 73. – P. 237–244.

9. Evaluation of drought resistance related traits in durum wheat somaclonal lines selected *in vitro* / [M. Bajji, P. Bertin, S. Lutts, J. M. Kinet] // *Aust. J. Exp. Agric.* – 2004. V 44, P. 27–35.

10. Удосконалення методів масового отримання рекомбінантних дигаплоїдних ліній тритикале / [С. І. Волощук, О. О. Заліський, П. О. Філонченко, Г. Д. Волощук] // *НБТ МПП ім. В.М. Ремесла*. – Миронівка, 2012. – Вип. 11-12. – С. 320–334.

11. He. D.G. Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages / D.G. He, J.W. Ouyang // *Plant Sci. Lett.* – 1984. – V. 33: – P. 71-79.

12. Compton M. E. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data / M. E. Compton // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1994. – V. 37. – P. 217–242.

13. Gawande N. D. *In vitro* screening of wheat genotypes for drought tolerance / N. D. Gawande, D. G. Mahurkar, T. H. Rathod [et al.] // *Ann. Plant Physiol.* – 2005. – V. 19. – P. 162–168.

14. Применение физиологии в селекции пшеницы: Под ред. М. П. Рейнолдса, Дж. И. Ортиз-Монастерио, А. Макнаба / Пер. с англ. – Киев: Логос, 2007. – 500 с.

15. Aniol A. Chromosomal location of aluminium tolerance genes in rye / A. Aniol // *Plant Breeding*. – 2004. – V. 123. – P. 132–136.

Аннотация

Пыкало С. В., Волощук С. И., Кочмарский В. С.

Использование андрогенных культур для оценки устойчивости тритикале озимого к абиотическим факторам среды

Показана возможность использования приемов клеточной селекции на гаплоидном уровне. Создание в среде культивирования *in vitro* солевого, осмотического, а также ионного стресса вызывает замедление роста андрогенной культуры. Для оценки реакции генотипов на стрессовые условия можно использовать такие показатели, как относительная толерантность, способность к регенерации и параметры роста андрогенных культур на селективных средах. Более четкую дифференциацию наблюдали при более высоких концентрациях селективных агентов (0,1-0,4 М NaCl; 10-20 % ПЭГ-6000; 1-2 мМ Al-ЭДТА) в течение 2-4 циклов субкультивирования (4-8 недель).

Ключевые слова: тритикале, гаплоидные культуры, устойчивость к абиотическим факторам

Annotation

Pykalo S. V., Voloshchuk S. I., Kochmarskiy V. S.

Using of androgenic cultures for estimation of winter triticale resistance to abiotic factors of environment

Possibility of using cell selection approaches at haploid level is shown. Simulation in culture media of salt, osmotic and ionic stress *in vitro* causes decreasing of growth rate and of androgenic culture. To estimate reaction of genotypes on stress it is possible to use some indices, such as relative tolerance, regeneration ability and growth parameters of androgenic cultures with selective media. More distinct differentiation was observed at higher concentrations of selective agents (0.1-0.4 M NaCl; 10-20 % PEG-6000; 1-2 mM Al-EDTA) during 2-4 cycles of subculturing (4-8 weeks).

Keywords: triticale, haploid cultures, resistance to abiotic factors