

СЕЛЕКТИВНИЙ ВПЛИВ МАНІТУ НА КУЛЬТУРУ КАЛЮСНИХ ТКАНИН РИЖІЮ ЯРОГО

А. І. ЛЮБЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Л. О. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук, професор

І. О. ЛЮБЧЕНКО, кандидат сільськогосподарських наук

О. П. СЕРЖУК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

Я. С. РЯБОВОЛ, доктор сільськогосподарських наук, доцент

Уманський національний університет садівництва

E-mail: Lybchenko@meta.ua

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2022.01.009>

Анотація. Рижій ярий – сільськогосподарська культура, що забезпечує отримання цінної сировини в різних ґрунтово-кліматичних умовах з низькими виробничими затратами. Незважаючи на перспективність рижію ярого, його посівні площі в Україні залишаються незначними. Основний чинник, що стримує збільшення плану вирощування цієї культури, це відсутність високопродуктивних, адаптованих до несприятливих умов вирощування сортів. Залучення біотехнологічних методів до загальної схеми селекційного процесу дає змогу підвищити ефективність створення генотипів рослин з бажаними ознаками.

У статті наведено результати досліджень з вивчення впливу маніту на калюсну тканину рижію ярого. Селективний чинник додавали у різних концентраціях (2, 4, 6, 8, 10, 12 %) до модифікованого живильного середовища за прописом Мурасіге-Скуга. На живильний субстрат висаджували морфогенні мікрокалюси, отримані з експлантів рижію ярого сортів Степовий 1, Клондайк, Перемога та Євро 12. У кінці субкультивування визначали життєздатність мікрокалюсів, інтенсивність проліферації та морфогенні характеристики біоматеріалів.

Встановлено, що залежно від генотипу, концентрація маніту на рівні 8–10 % є оптимальною для добору *in vitro* посухостійких форм культури. Високою стійкістю до осмотичного стресу характеризуються біоматеріали отримані з сортів Степовий 1 та Перемога. Виділено клітинні лінії рижію ярого з високою стійкістю до осмотичного стресу, що можуть слугувати донорами генів посухостійкості в подальшій селекційній роботі.

Ключові слова: рижій ярий, осмотичний стрес, живильне середовище, маніт, калюс, *in vitro*

Актуальність. В Україні дефіцит вологи. Особливо гостро основним негативним природним чинником, що знижує продуктивність сільськогосподарських культур, є ситуація склалася в сучасних умовах глобальних змін клімату. Однією з основних умов ведення ефективного

землеробства в посушливих регіонах є використання посухостійких форм сільськогосподарських культур.

Рижій ярий, завдяки біологічним особливостям, здатен забезпечувати стабільну урожайність в малосприятливих природних умовах з низькими технологічними та матеріальними витратами. Специфічний склад рижієвої олії дає можливість її використовувати в різних цілях, зокрема, харчових, лікувальних, технічних, енергетичних тощо [1–4]. Проте, у нашій країні об'єми виробництва культури є незначними. Впровадження нових високопродуктивних адаптивних сортів дало б змогу суттєво покращити ситуацію. Залучення біотехнологічних методів до загальної схеми селекційного процесу дає змогу підвищити ефективність створення генотипів з бажаними ознаками.

Аналіз основних досліджень та публікацій. Посуха є одним із найпоширеніших несприятливих абіотичних чинників середовища, з якими рослини стикаються впродовж усього періоду онтогенезу. Щорічні втрати урожаю через дефіцит опадів в Україні можуть складати від 10 до 70 %. У роки сильних засух часто відмічають випадки повної загибелі посівів [5].

В умовах осмотичного стресу в рослинах проходять істотні фізіологічні та біохімічні зміни: підвищується активність ферментів,

що активують гідроліз білків, вуглеводів та ліпідів з утворенням токсичних низькомолекулярних продуктів розпаду; змінюється енергетичний обмін клітин та знижується інтенсивність фотосинтезу; порушуються колоїдно-хімічні властивості цитоплазми. Все це викликає зниження життєздатності та продуктивності організму. Адаптація рослин до стресового чинника відбувається на молекулярному, клітинному та організменному рівнях за рахунок фізіолого-біохімічних та анатомо-морфологічних пристосувань [6].

Селекція рослин на стійкість до несприятливих чинників навколишнього середовища передбачає залучення відповідного вихідного матеріалу, створення різних штучних провокаційних фонів для вивчення і добору селекційного матеріалу, його широке екологічне випробування та комплексну оцінку починаючи з початкових етапів роботи [7]. Використання у селекційному процесі біотехнологічної ланки дає можливість працювати протягом року незалежно від погодних умов, повністю контролювати фізичні та трофічні параметри вирощування біоматеріалу, моделювати будь-яку селективну систему та регулювати силу стресового чинника, проводити добір на клітинному рівні, тощо. Це значно підвищує ефективність

створення рослинних форм з бажаними ознаками [8].

Для добору *in vitro* посухостійких зразків сільськогосподарських рослин селективним чинником використовують різноманітні осмотично активні речовини, що знижують зовнішній водний потенціал культурального середовища: поліетиленгліколь (ПЕГ) різної молекулярної маси, сахарозу, сорбітол, ксилозу, осмотин, маніт тощо [9].

Низькомолекулярний маніт має здатність швидко проникати в рослинну клітинну та знижувати оптимальний водний потенціал. Це спричиняє зневоднення та сильне гальмування фізіологічних та біохімічних процесів [10]. Низкою авторів [11–15] встановлено ефективність використання селективної системи *in vitro* з манітом, оскільки це забезпечує повну елімінацію чутливих клітин і високу життєздатність рослин-регенерантів.

За добору *in vitro* вирішальне значення має концентрація селективного агента в живильному середовищі, яку підбирають експериментальним шляхом для кожного біовиду. За створення низького стресового тиску не можливо відібрати стійкі генотипи, а за високого – спостерігається зниження життєздатності та інтенсивності регенерації біоструктур [16].

Мета досліджень – аналіз впливу дії маніту на калюсну культуру рижію ярого для визначення оптимальної концентрації селективного чинника за проведення добору *in vitro* посухостійких форм.

Матеріали та методика досліджень. Дослідження проводили у навчально-науковій лабораторії «Біотехнології» Уманського національного університету садівництва. Як селективний чинник використовували маніт, який додавали у різних концентраціях (2, 4, 6, 8, 10, 12 %) до модифікованого живильного середовища за прописом Мурасіге-Скуга. На живильний субстрат висаджували морфогенні мікрокалюси отриманні з експлантів рижію ярого сортів Степовий 1, Клондайк, Перемога та Євро 12. Тривалість одного субкультивування становила 30–35 діб. Біоматеріал культивували за інтенсивності освітлення 4 кЛк, 16-годинного фотоперіоду, температурного режиму 24–25 °С та відносної вологості повітря 75 %.

У кінці пасажу визначали життєздатність мікрокалюсів, інтенсивність росту та морфогенні характеристики індукованих біоматеріалів.

Для визначення інтенсивності наростання калюсів, біоматеріал зважували на початку та в кінці кожного пасажу. Інтенсивність наростання вираховували за формулою Кепліна:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0},$$

де ΔW – відносний приріст біомаси; W_0 – початкова маса калюсу; W_t – кінцева маса калюсу.

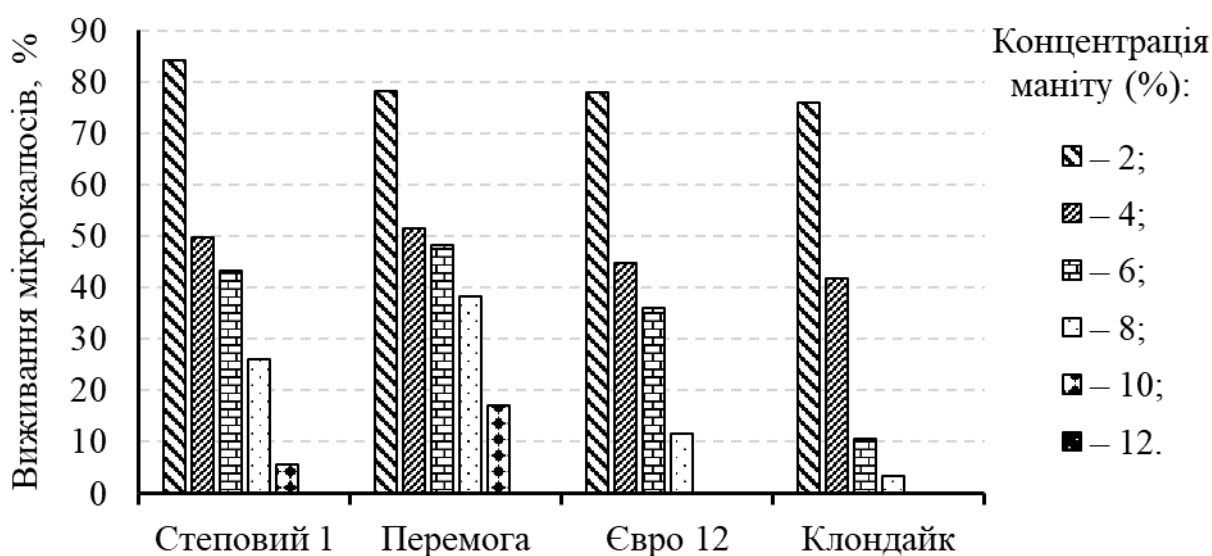
У кожному варіанті досліджень висаджували 50 мікрокалюсів. Повторність досліду триразова.

Результати досліджень та їх обговорення. Присутність у культуральному субстраті маніту в концентрації 2 % залежно від генотипу викликала некроз калюсу на рівні 24,0–15,8 % (рис. 1). Найвищий показник виживання калюсу відмічено у матеріалів, отриманих з сорту Степовий 1 (84,2 %). Підвищення вмісту селективного чинника до 4 % спричиняло зниження виживання мікрокалюсів сорту Степовий 1 до 49,7 %, Перемога –

51,6 %, Євро 12 – 44,8 %, Клондайк – 41,8 %.

За 6 % концентрації маніту спостерігали суттєві відмінності стійкості генотипів до осмотичного стресу. Найменш стійким був біоматеріал, отриманий з експлантів сорту Клондайк за збереженості тканини на рівні 10,5 %. Для інших генотипів виживання біоматеріалів варіювало від 36,0 до 48,2 %.

Для ранжування клітинних структур рижю ярого за рівнем стійкості до осмотичного стресу концентрація маніту в живильному середовищі понад 8 % є оптимальною. Найвищий показник виживання біоматеріалу відмічено у калюсу сорту Перемога (38,3 %). Для сортів Степовий 1, Євро 12 і Клондайк частка матеріалів, що зберігали життєздатність, відповідно становила 26,0, 11,6 і 3,4 %.



НІР₀₁: А – 1,0; В – 1,2; АВ – 2,3; А – концентрація у живильному середовищі маніту, В – сорт-донор експлантів

Рис. 1. Виживання калюсної тканини рижю ярого залежно від

концентрації маніту та генотипу вихідного матеріалу

За 10 % концентрації маніту життєздатність зберігали лише калюсні тканини індуковані з експлантів сортів Степовий 1 і Перемога, частка стійких калюсних ліній, відповідно становила 5,6 та 17,0 %. Подальше підвищення концентрації селективного чинника виявилось летальним для калюсу всіх генотипів.

На рівень стійкості біоматеріалу до селективного чинника вказує різниця між приростом біомаси в стресових та оптимальних умовах культивування. Досліджувані генотипи рижію ярого відрізнялись за показниками проліферації калюсної тканини як у контрольному варіанті,

так і за присутності в живильному середовищі маніту (табл. 1).

Найінтенсивніше наростання калюсної маси у контрольному варіанті відмічено у трансплантів сортів Степовий 1 (9,2 пункту) і Перемога (8,6 пункту). Інтенсивність проліферації калюсів сортів Євро 12 і Клондайк була набагато нижчою і відповідно становила 3,5 і 4,0 пункту. За 2 % концентрації селективного чинника у живильному субстраті показники інтенсивності калюсогенезу, залежно від генотипу, знижувались на 8,0–17,1 %. Мікрокалюси зберігали морфогенні показники на високому рівні.

1. Інтенсивність проліферації калюсної тканини рижію ярого залежно від концентрації маніту та генотипу вихідного матеріалу

Концентрація маніту, % (A)	Сорти-донори експлантів (B)							
	Степовий 1		Перемога		Євро 12		Клондайк	
	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%	ΔW	%
0 (контроль)	9,2±2,1	100	8,6±1,7	100	3,5±1,6	100	4,0±1,5	100
2	8,3±1,2	90,5	7,2±1,5	88,7	2,9±1,1	82,9	3,7±1,2	92,0
4	6,8±0,4	73,9	7,1±1,2	82,6	2,7±1,1	30,6	1,9±1,0	47,5
6	3,1±0,5	33,7	3,2±0,3	37,2	1,1±0,4	31,4	0,8±0,2	20,0
8	1,7±0,1	18,5	1,3±0,3	16,1	0,4±0,1	11,4	0,5±0,2	8,0
10	0,7±0,2	7,6	0,9±0,2	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0
HIP ₀₁ : A – 0,3; B – 0,3; AB; – 0,6								

За вмісту маніту в живильному середовищі на рівні 4 % відносний

приріст біомаси досліджуваних генотипів варіював від 7,1 до

Любченко А. І., Рябовол Л. О., Любченко І. О., Сержук О. П., Рябовол Я. С.

1,9 пункту. Найістотніше зниження темпів наростання калюсної тканини за відношенням до контрольного варіанту відмічено у сортів Євро 12 та Клондайк.

Підвищення концентрації маніту до 6 % викликало зниження інтенсивності проліферації на 74,4–80,0 %. Відносний приріст калюсної тканини у сорту Степовий 1 склав 3,1 пункту, сорту Перемога – 3,2, сорту Євро 12 – 1,1, сорту Клондайк – 0,8.

За присутності маніту в живильному середовищі на рівні 8 % відносний приріст калюсної тканини сортів Степовий 1 і Перемога відповідно становив 1,7 і 1,3 (18,5 і 16,1 % до контролю). Така концентрація маніту є граничною для сортів Євро 12 і Клондайк – приріст калюсної біомаси не перевищував

0,5 пункту, біоматеріали мали низькі морфогенні показники.

Десятивідсоткова концентрація маніту здійснювала сильний токсичний стрес на калюсну тканину рижію ярого. Інтенсивність проліферації біомаси, у порівнянні з неселективними умовами культивування, знижувалась на 89,5–92,4 %. Відносний приріст мікрокалюсів сорту Степовий 1 становив 0,7 пункту, сорту Перемога – 0,9 пункту.

За результатами одержаних експериментальних даних було проведено порівняльний аналіз впливу досліджуваних чинників (генотип і концентрація маніту в живильному середовищі) на збереженість та інтенсивність проліферації калюсної тканини рижію ярого в умовах осмотичного стресу (рис. 2).

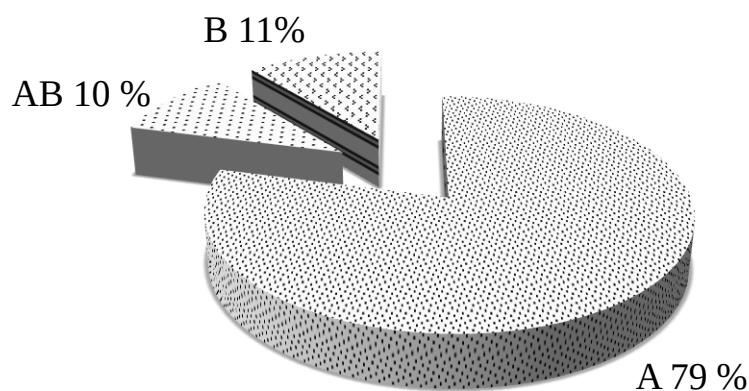


Рис. 2. Частка впливу досліджуваних чинників на виживання калюсної тканини рижію ярого в умовах осмотичного стресу:

А – концентрація маніту в живильному середовищі; В – генотип рослини донора експланта; АВ – взаємодія чинників.

Найбільший вплив на виживання калюсної тканини рижію ярого в

умовах осмотичного стресу мала концентрація маніту в живильному

Любченко А. І., Рябовол Л. О., Любченко І. О., Сержук О. П., Рябовол Я. С.

середовищі (79 %). Частка впливу генотипу рослини донора-експланта і сукупна взаємодія обох чинників відповідно становила 11 та 10 %.

Висновки та перспективи подальших досліджень. У процесі досліджень виявлено стресову дію маніту на калюсну тканину рижію ярого. Встановлено, що залежно від генотипу, концентрація маніту на рівні 8–10 % є оптимальною для

добору *in vitro* посухостійких форм культури. Високою стійкістю до осмотичного стресу характеризуються біоматеріали отримані з сортів Степовий 1 та Перемога. Виділено клітинні лінії рижію ярого з високою стійкістю до осмотичного стресу, що можуть використовуватись донорами генів посухостійкості в подальшій селекційній роботі.

Список використаних джерел

1. Комарова І. Б., Рожкован В. В. Рижій – альтернативна олійна культура та перспективи його використання. *Пропозиція*. 2003. № 1. С. 46–47.

2. Москва І. С. Стан та перспективи вирощування рижію ярого на півдні Степу України. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2016. Вип. № 1. С. 99–109.

3. Лях В. О., Комарова І. Б. *Вміст та жирнокислотний склад олії рижію ярого. Бюлетень Інституту зернового господарства*. 2010. № 38. С. 137–142.

4. Каленська С. М., Юник А. В. Роль олійних культур у вирішенні енергетичної безпеки України. *Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2011. № 2. С. 90–96.

5. Адаменко Т. І. Агрокліматичне зонування території України з врахуванням зміни клімату. Біла Церква: «РІА»БЛПЦ, 2014. 16 с.

6. Жук О. І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011. Т. 43. № 1. С. 26–37.

7. Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю. Адаптивна селекція сільськогосподарських рослин. Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2019. 100 с.

8. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. *Комаровские чтения*. 2007. Вип. LV. С. 184–211.

9. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів: монографія. за ред. Моргун В. В. Київ: Логос, 2012. 428 с.

10. Генерозова І. 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.

11. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ: Логос, 2014. 375 с.

12. Butt A., Ahmed N., Mubin M. Effect of pegand mannitolinduced water stress on regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 2015. Vol. 52. № 4. P. 1025–1033.

13. Аль-Холани Х. А., Долгих Ю. И. Определение концентрации манита для использования в процессе клеточной селекции на устойчивость к засухе у кукурузы. *Вестник Российского университета дружбы народов*. 2007. № 1–2. С. 38–42.

14. Пикало С. В., Бавол А. В., Дубровна О. В. Цитогенетичні особливості калюсних культур тритикале озимого за дії осмотичного стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 230–235.

15. Коцар М. О., Бех Н. С. Моніторинг видів міскантусу на

посухостійкість з використанням біотехнологічних методів. *Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2013. Вип. 17. С. 233–236.

16. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.

Reference

1. Komarova, I. B., Rozhkov, V. V. (2003). Ryzhij – al'ternatyvna olijna kul'tura ta perspektyvy joho vykorystannia [Camelina is an alternative oil-bearing culture and prospects of her development]. *Offer*. 1, 3–12.

2. Moskva, I. S. (2016). Stan ta perspektyvy vyroschuvannia ryzhiu iaro ho na pivdni Stepu Ukrainy [The state and prospects of growing camelina in the south of the Ukrainian steppe]. *Bulletin of the agrarian science of the black sea region*. 1, 99–109.

3. Liakh, V. O., Komarova, I. B. (2010). Vmist ta zhyrnokyslotnyj sklad olii ryzhiu iaro ho [The content and fatty acid composition of camelina oil]. *Bulletin of the Institute of grain farming*. 38, 137–142.

4. Kalens'ka, S. M., Yunyk, A. V. (2011). Rol' olijnykh kul'tur u vyrishenni enerhetychnoi bezpeky Ukrainy [Oilseeds role in addressing the energy security of Ukraine]. *Collection of scientific works of the Institute of bioenergetic plants and sugar beet*. 2, 90–96.

5. Adamenko, T. I. (2014). Ahroklimatechno zonuvannia terytorii Ukrainy z vrakhovanniam zminy klimatu [Agroclimatic zoning of the territory of Ukraine taking into account climate change]. *Bila Tserkva: «RIA»BLITS*, 16.

6. Zhuk, O. I. (2011). Formuvannia adaptivnoi vidpovidi roslin na defitsyt vody [Formation of adaptive response of plants to water deficiency]. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*, 43/1, 26–37.

7. Dziubetskyi, B. V., Cherchel, V. Yu. (2019). Adaptivna selektsiia silskohospodarskykh roslin [Adaptive selection of agricultural plants]. *Dnipro: DU IZK NAAN*, 100.

8. Babikova, A. V., Gorpenchenko, T. Ju., Zhuravlev, Ju. N. (2007). Rastenie kak ob'ekt biotekhnologii [Plants as object biotechnology]. *Komarov readings*. LV, 184–211.

9. Dubrovna, O. V., Chuhunkova, T. V., Bovol, A. V., Lialko, I. I. (2012). *Biotekhnologichni ta tsytohenetychni osnovy stvorennia roslin, stiikykh do stresiv: monohrafiia*. za red. Morhun, V. V. [Biotechnological and cytogenetic bases of creation of plants resistant to stress: monograph. for ed. Morhun, V. V.]. Kyiv: Lohos, 428.

10. Generozova, I. P., Maevskaya, S. N., Shugaev, A. G. (2009). Ingibirovanie metabolicheskoy aktivnosti mitohondrij etiolirovannykh prorostkov goroha, podvergnutykh vodnomu stressu [Inhibition of metabolic activity of mitochondria of etiolated pea seedlings exposed to water stress]. *Plant physiology*. 56/1, 45–52.

11. Dubrovna, O. V., Morhun, B. V., Bovol, A. V. (2014). *Biotekhnologii pshchenytsi: klitynnna selektsiia ta henetychna inzheneriia* [Wheat biotechnology: cell selection and genetic engineering]. Kyiv: Lohos, 375.

12. Butt, A., Ahmed, N., Mubin, M. (2015). Effect of pegand mannitolinduced water stress on regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 52/4, 1025–1033.

13. Al'-Holani, H. A., Dolgih, Yu. I. (2007). Opredelenie koncentracii manita dlya ispol'zovaniya v processe kletочноj selektsii na ustojchivost' k zasuhe u kukuruzy [Determination of manitol concentration for use in cell breeding for drought resistance in maize]. *Bulletin of the peoples' friendship university of Russia*. 1–2, 38–42.

14. Pykalo, S. V., Bovol, A. V., Dubrovna, O. V. (2015). Tsytohenetychni osoblyvosti kaliusnykh kultur trytkale ozymoho za dii osmotychnoho stresu [Cytogenetic features of winter triticale crops due to osmotic stress]. *Factors of experimental evolution of organisms*. 17, 230–235.

15. Kotsar, M. O., Bekh, N. S. (2013). *Monitorynh vydiv miskantusu na posukhostiikist z vykorystanniam biotekhnologichnykh metodiv* [Monitoring of miscanthus species for drought resistance using biotechnological methods]. *Collection of scientific works of the Institute of bioenergetic plants and sugar beet*. 17, 233–236.

SELECTIVE INFLUENCE OF MANNITOL ON CULTURE OF CALLUS TISSUES OF CAMELINA SATIVA

A. I. Liubchenko, L. O. Riabovol, I. O. Liubchenko, O. P. Serzhuk,
Ya. S. Riabovol

Abstract. *Camelina sativa* is an agricultural crop that provides valuable raw materials in different soil and climatic conditions with low production costs. Despite the prospects of camelina sativa, its sown areas in Ukraine remain insignificant. The main factor holding back the increase in the cultivation plan of this crop is the lack of highly productive, adapted to adverse growing conditions varieties. Involvement of biotechnological methods in the general scheme of selection process allows to increase efficiency of creation of genotypes of plants with desirable signs.

The article presents the results of research on the effect of mannitol on the callus tissue of camelina sativa. The selective factor was added at various concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 12 %) to the modified nutrient medium according to the Murashige-Skuga recipe. Morphogenic microcalls obtained from explants of camelina sativa Stepovy 1, Klondike, Peremoha and Euro 12 were planted on the nutrient substrate. At the end of subculturing, microcall viability, proliferation intensity and morphogenic characteristics of biomaterials were determined.

It was found that, depending on the genotype, the concentration of mannitol at the level of 8–10 % is optimal for the selection of in vitro drought-resistant culture forms. High resistance to osmotic stress is characterized by biomaterials obtained from the varieties Stepovy 1 and Peremoha. Isolated camelina sativa cell lines with high resistance to osmotic stress have been identified, which can serve as donors of drought resistance genes in further breeding research.

Key words: *camelina sativa, osmotic stress, nutrient medium, mannitol, callus, in vitro*