

AGRICULTURAL SCIENCES

SELECTION OF DROUGHT-RESISTANT PLANT MATERIAL IN *IN VITRO* CULTURE

Vrublevskiy A.

postgraduate, Bila Tserkva National Agrarian University

ОТРИМАННЯ ПОСУХОСТІЙКОГО ВИХІДНОГО СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ В КУЛЬТУРИ *IN VITRO*

Врублевський А.

аспірант, Білоцерківський національний аграрний університет

DOI: [10.24412/3453-9875-2021-76-2-3-8](https://doi.org/10.24412/3453-9875-2021-76-2-3-8)

Abstract

The creation of source material adapted to the influence of negative factors of cultivation is relevant for most crops, but for crops with predominantly vegetative or complicated seed propagation - it is unalterable. It was studied that the use of selective systems intensive formation of cell colonies was characteristic of such varieties of hazelnuts as: Trapezund, Barcelona, Cosford and Lozovsky spherical. But in walnut intensive formation of cell colonies was characteristic of such varieties as: Yariv, Chernivtsi 1, Chisinau and Bukovyna 2. It was studied that the maximum number of drought-resistant callus lines formed varieties Trapezund, Cosford, Barcelona and Pie with the addition of selective agent Barcelona, Trabzon and Cosford for the addition of PEG 6000 as a selective agent. Thus, the Barcelona and Cosford hazelnuts are equally well suited for selection for drought resistance using both selective media - mannitol and PEG 6000. Survival of callus lines on walnut medium without selective factor was 85.4%, but when cultivating callus tissues of different varieties on a selective medium with mannitol their survival was in the range of 4.4-5.4%, while the use of a selective system with PEG 6000 survived calluses 7.7-10.3%. The best survival rates in a selective environment with mannitol were in the varieties: Cosford, Steppe 83, Barcelona, Trapezund and Pie, and with the use of PEG 6000: Trapezund, Cosford, Barcelona and Steppe 83. It was studied that the best percentages of drought-resistant regene plants on a breeding medium using mannitol in varieties Chisinau, Korzheutsky and Ferjan. But with the use of medium with the addition of PEG 6000 more drought-resistant regenerating plants were formed in walnut varieties Bukovynsky 2, Yarivsky and Fernet.

Анотація.

Створення вихідного матеріалу адаптованого до впливу негативних факторів вирощування актуальне для більшості сільськогосподарських культур, а от для культур з переважно вегетативним або ж з ускладненим насіннєвим розмноженням – воно безальтернативне. Досліджено, що застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд, Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. А от в грецького горіха інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2. Досліджено, що максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000. Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000. Встановлено, що виживання калюсних ліній грецького горіха на середовищі без селективного фактору склало 85,4 %, а от при культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %. Кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83. Досліджено, що кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневський, Коржеуцький та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

Keywords: microclonal reproduction, hazelnuts, walnuts.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, фундук, грецький горіх

Вступ.

Мікроклональне розмноження горіхоплідних культур досі не вийшло за межі наукових лабораторій. Стримують розробку та впровадження складність таких технологічних прийомів як введення в

асептичні умови (самоотруєння фенольними ексудатами, гіпергідратація в результаті травматичного шоку та ін.), стабілізація рослинних об'єктів у процесі мультиплікації (підбір оптимальних трофічних

та гормональних детермінант, способів поділу донорних рослин на експланти), індукція ризогенезу та постасептична адаптація (в т.ч. мікоризація рослин *in vitro/ex vitro*) [1, 2].

Також важливим питанням залишається створення вихідного матеріалу здатного ефективно виживати в умовах посухи, особливо на ранніх етапах розвитку рослин. Адже посухи уже трапляються на всій території України, а за незначного розвитку кореневої системи саджанці фундука та горіху мають досить низький відсоток виживання за висаджування їх в відкритий ґрунт [3, 4].

Питання створення вихідного матеріалу адаптованого до впливу негативних факторів вирощування актуальне для більшості сільськогосподарських культур, а от для культур з переважно вегетативним або ж з ускладненим насіннєвим розмноженням – воно безальтернативне. Адже за умови високої стабільності сортів, або отримання прогнозованого рівня їх запилення з іншими сортами отримання якісно нового матеріалу можливе лише за рахунок виконання робіт в умовах *in vitro* [5, 6].

Останнім часом застосування клітинної селекції для створення ліній стійких до факторів несприятливих умов вирощування актуальне в зв'язку зі значним зростанням негативного впливу потепління та збільшенням кількості, тривалості та інтенсивності впливу негативних факторів, особливо посух [7,8].

Матеріали та методи.

Дослідження за темою дисертаційної роботи виконували в умовах міжкафедральної лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету МОН України впродовж 2016–2020 рр., а також ТОВ «Укр-Агро Мрія» Київської області, Васильківського району в 2020–2021 рр.

Вихідним матеріалом для введення у культуру *in vitro* служили м'ясисті сім'ядолі плоду грецького горіха та фундука. Для отримання асептичних культур стерилізацію власне самого плоду проводили 96 % етанолом з наступним випалюванням спирту на полум'ї спиртування.

Для культивування рослин в умовах *in vitro* використовували на початкових етапах скринінгу кращих варіантів середовищ штучні живильні середовища наступних загальновідомих прописів: MS (Murashige and Skoog); QL (Quoirin & Lepoivre medium); DKW (Driver and Kuniyuki Walnut Medium); WPM (Woody Plant Medium); NRM (Nas and Read Medium).

В якості світлоносіїв використовували світлодіодні світильники Bellson 20 W, розміщені паралельними рядами над рослинами, потужність одного світильника – 20 Вт, світловий потік – 1780 Лм (аналог ЛБ-36). Освітлення поступово протягом двох тижнів підвищували із 1500 до 3000 lux.

Результати досліджень.

З метою отримання посухостійких форм на першому етапі клітинної селекції ми підібрали сублетальні концентрації селективних агентів: ПЕГ 6000 та маніт.

Формування передумов для проведення відбору, відбір та подальшу регенерацію посухостійких рослин клітинних ліній проводили в присутності селективного агента (рис. 1).

Спочатку формували рихлий калюс, далі з отриманих калюсів утворювали культуру клітин, що перебуває в логарифмічній фазі росту. На наступному етапі проводили обробку клітин селективними чинниками. Після чого проводили культивування суспензії на живильному середовищі з селективним фактором (маніт в концентрації 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 та 10% і ПЕГ 6000 в концентрації 5, 10, 15, 20, 25 та 30 %).

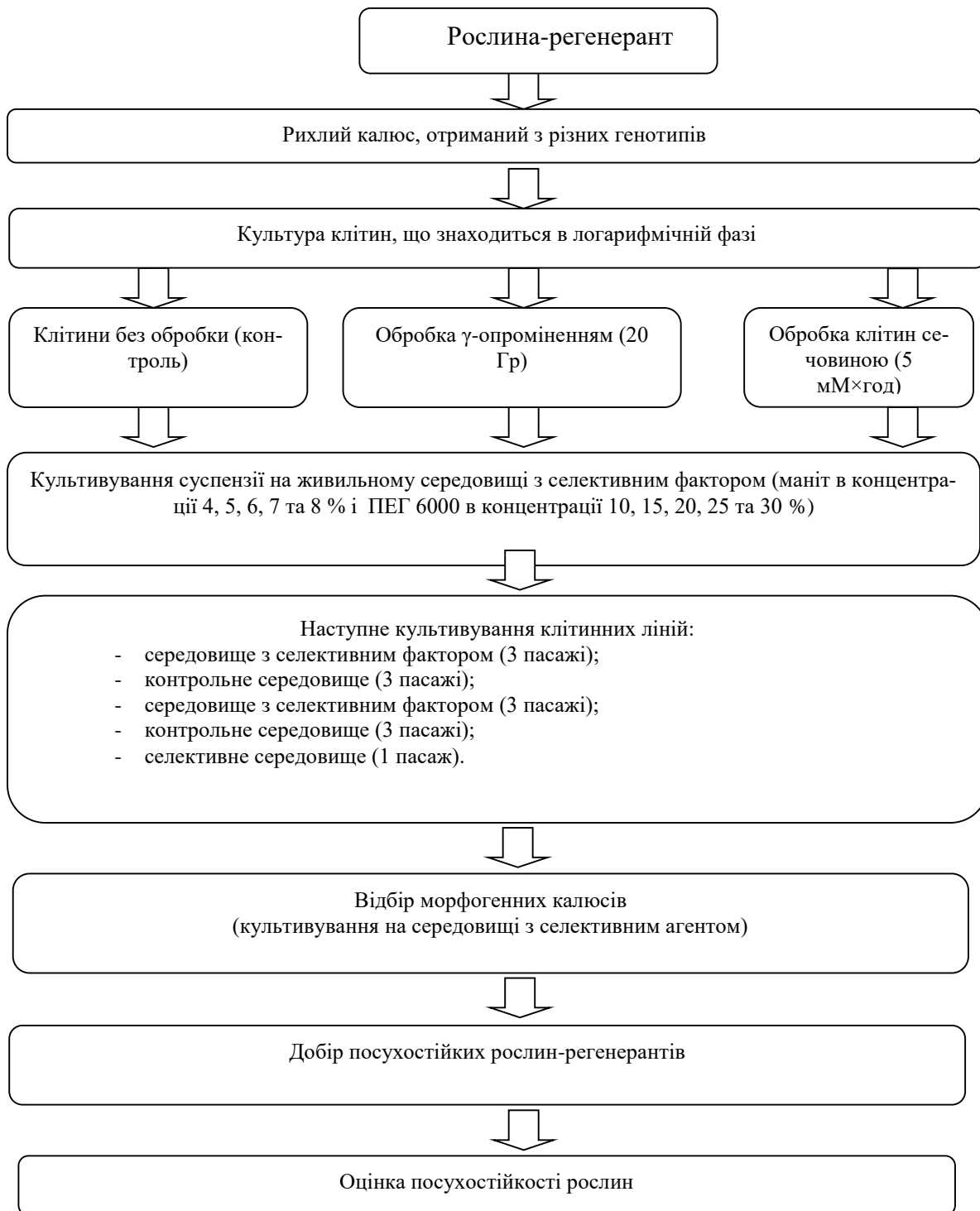


Рис. 1. Схема клітинної селекції з метою отримання посухостійких ліній фундука та грецького горіха

На наступному етапі культивування виконували проводили роботу з вирощування клітинних ліній за схемою: селективне середовище з селективним фактором, контрольне середовище, селективне середовище з селективним фактором, контрольне середовище та знову селективне середовище з селективним фактором.

При цьому важливо провести оцінювання стабільності набутої ознаки посухостійкості, адже в умовах *in vitro* часто спостерігається прояв ознак

які не передаються генетично. Тому відібрані калюси вирощували на середовищі в якому селективний фактор мав сублетальну концентрацію.

Генотипи що вижили за дії сублетальної концентрації в подальшому вирощували на середовищі Мурасіге-Скуга за допомогою якого індукували морфогенез.

А от уже добір та оцінювання посухостійких рослин регенерантів та їх стійкості виконувався на останньому етапі селекційної роботи.

5.2. Підбір селективних агентів та рівня їх концентрацій для створення посухостійких форм в умовах *in vitro*

Осмотично активні речовини широко використовуються для проведення клітинної селекції та створення толерантних до посухи рослин [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. Причому ефективність такої селекції досить сильно залежить від правильного добору та власне встановлення чутливості калусних клітин до осмотика [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

А тому на першому етапі ми провели оцінювання селективних агентів застосовуваних для моделювання посухи в умовах *in vitro*: маніт і ПЕГ (поліетиленгліколь) 6000 г/моль. Адаже від правильного добору агента та власне його сублетальних

концентрацій і істотно залежить ефективність подальшого селективного відбору.

Сублетальну концентрацію стрес-факторів визначали встановлюючи залежність кількості клітинних колоній, що вижили від концентрації селективного агента. При цьому було встановлено, що сублетальна концентрація маніту в склала 6 %, а от для селективної системи ПЕГ 6000 – 20 %.

Отже, за вирощування калусу різних сортів фундука було встановлено, що число клітинних колоній різних генотипів при різному селективному тиску відрізнялась, але при цьому сублетальну концентрацію осмотичних речовин можна визначити як константну для досліджуваного обсягу матеріалу (табл. 1).

Таблиця 1.

Число клітинних колоній різних генотипів фундука в залежності від селективної системи

Сорт	Кількість клітинних колоній ($\times 10^5$), шт.											
	концентрація маніту, %						концентрація ПЕГ 6000, %					
	0	4	5	6	7	8	0	10	15	20	25	30
Болградська новинка	126	105	75	64	43	33	224	172	143	110	84	58
Дар Павленка	121	101	72	58	40	30	209	161	134	100	73	52
Лозівський шаровидний	131	109	80	63	50	37	231	178	140	118	88	70
Пірожок	128	107	74	56	42	27	217	167	137	110	76	56
Степовий 83	121	101	72	54	38	25	208	160	132	99	70	50
Боровський	122	102	75	57	37	28	208	160	131	98	65	52
Серебристий	130	108	81	65	44	34	221	170	140	110	87	64
Косфорд	131	109	86	68	50	40	237	182	150	123	95	70
Барселонський	132	110	87	67	50	40	238	183	155	132	103	84
Трапезунд	137	114	89	72	53	47	247	190	162	130	107	88

За застосування селективної системи з манітом (6 %), що відповідала сублетальній, число колоній варіювало від 54×10^5 (Степовий 83) до 72×10^5 (Трапезунд). А от при застосуванні сублетальної дози ПЕГ 6000 (20 %) кількість клітинних колоній змінювалась від 98×10^5 (Боровський) до 132×10^5 (Барселонський).

За застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд, Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. Причому найменша кількість колоній при додаванні до живильного середовища сублетальної концентрації

маніту була в сортів Степовий 83, Пірожок, Боровський та Дар Павленка, кількість колоній становила відповідно 54×10^5 , 56×10^5 , 57×10^5 , та 58×10^5 .

А от при використанні селективної системи на основі додавання до селективного середовища ПЕГ 6000 найменша кількість колоній формувалась в таких генотипів як: Боровський, Степовий 83 та Дар Павленка, кількість колоній становила відповідно 98×10^5 , 99×10^5 , та 100×10^5 .

При цьому ми визначили й особливості проросту калусів в досліджуваних сортів фундука, під впливом концентрації селективного агента (табл. 2).

Таблиця 2.

Вплив сублетальної концентрації селективного агента на проріст калусної маси у різних генотипів фундука

Сорт	Ростовий індекс (PI) калусів, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Болградська новинка	17,8 \pm 1,2	4,3 \pm 0,3	6,9 \pm 0,8
Дар Павленка	16,3 \pm 1,2	3,3 \pm 0,5	5,3 \pm 1,0
Лозівський шаровидний	18,4 \pm 1,4	4,7 \pm 0,6	7,8 \pm 0,9
Пірожок	17,0 \pm 1,5	4,0 \pm 0,4	7,0 \pm 1,0
Степовий 83	14,5 \pm 1,6	3,0 \pm 0,5	5,2 \pm 0,9
Боровський	17,1 \pm 1,4	3,9 \pm 0,6	6,3 \pm 1,0
Серебристий	19,0 \pm 1,3	5,0 \pm 0,5	8,2 \pm 0,8
Косфорд	20,3 \pm 1,1	5,6 \pm 0,7	8,1 \pm 1,0
Барселонський	19,8 \pm 1,2	4,8 \pm 0,8	8,6 \pm 0,9
Трапезунд	21,6 \pm 1,3	5,7 \pm 0,5	8,9 \pm 1,0

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Серебристий, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Серебристий та Косфорд.

За вирощування калюсу різних сортів грецького горіху було встановлено, що число клітинних колоній різних генотипів при різному селективному тиску відрізнялась, але при цьому сублетальну концентрацію осмотичних речовин, аналогічно фундуку, можна визначити як константну для досліджуваного обсягу матеріалу (табл. 3).

Таблиця 3.

Число клітинних колоній різних генотипів грецького горіха в залежності від селективної системи

Сорт	Кількість клітинних колоній ($\times 10^5$), шт.											
	концентрація маніту, %						концентрація ПЕГ 6000, %					
	0	4	5	6	7	8	0	10	15	20	25	30
Коржеуцький	123	102	74	57	40	29	199	153	133	106	74	57
Кордене	115	96	62	56	41	26	175	135	118	86	68	49
Ферджан	112	93	77	64	39	23	187	144	122	93	55	46
Кишиневський	121	101	73	68	50	34	219	169	131	111	85	64
Чернівецький 1	130	108	80	69	56	39	226	174	150	111	86	79
Клішківський	129	108	85	67	51	40	223	172	158	106	98	85
Ярівський	154	128	88	78	63	49	226	173	153	116	90	80
Буковинський 2	132	110	86	68	46	44	216	166	139	121	103	71
Фернет	143	120	83	66	54	52	233	179	152	135	91	78

Досліджено, що при використанні системи з манітом (6 %), що відповідала сублетальній, число колоній варіювало від 56×10^5 (Кордене) до 78×10^5 (Ярівський). А от при застосуванні сублетальної дози ПЕГ 6000 (20 %) кількість клітинних колоній змінювалась від 86×10^5 (Кордене) до 135×10^5 (Фернет).

За застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам грецького горіха як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2. Причому найменша кількість колоній при додаванні до живильного середовища сублетальної концентрації

маніту була в сортів Кордене, Коржеуцький та Ферджан, кількість колоній становила відповідно 56×10^5 , 57×10^5 , 64×10^5 .

А от при використанні селекційної системи на основі додавання до селективного середовища ПЕГ 6000 найменша кількість колоній формувалась в таких генотипів як: Кордене, Ферджан, Коржеуцький та Клішківський, кількість колоній становила відповідно 86×10^5 , 93×10^5 , 106×10^5 та 106×10^5 .

Також ми визначили й особливості приросту калюсів в досліджуваних сортів грецького горіха, під впливом концентрації селективного агенту (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив сублетальної концентрації селективного агенту на приріст калюсної маси у різних генотипів грецького горіха

Сорт	Ростовий індекс (PI) калюсів, %		
	контроль	маніт (6 %)	ПЕГ 6000 (20 %)
Коржеуцький	17,1 \pm 0,9	3,5 \pm 0,4	7,0 \pm 1,0
Кордене	15,3 \pm 0,6	2,9 \pm 0,5	5,5 \pm 1,1
Ферджан	16,8 \pm 1,0	3,3 \pm 0,3	6,3 \pm 1,0
Кишиневський	17,1 \pm 1,5	4,4 \pm 0,6	7,2 \pm 1,5
Чернівецький 1	18,0 \pm 0,7	5,0 \pm 0,9	8,9 \pm 1,0
Клішківський	18,8 \pm 1,4	4,9 \pm 0,6	8,0 \pm 1,6
Ярівський	20,3 \pm 1,6	5,6 \pm 0,8	8,2 \pm 1,1
Буковинський 2	19,8 \pm 1,2	5,0 \pm 1,0	8,6 \pm 1,2
Фернет	20,0 \pm 1,2	5,4 \pm 0,9	9,0 \pm 1,4

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

Висновки.

Визначено, що для проведення клітинної селекції та створення посухостійкого матеріалу фундука та грецького горіха слід використовувати сублетальну концентрацію маніту 6 %, або ж ПЕГ 6000 – 20 %.

Встановлено, що за застосування селективних систем інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам фундука як: Трапезунд,

Барселонський, Косфорд та Лозівський шаровидний. А от в грецького горіха інтенсивне формування колоній клітин було притаманним таким сортам як: Ярівський, Чернівецький 1, Кишиневський та Буковинський 2.

За результатами проведених досліджень встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів: Трапезунд, Косфорд та Серебристий, а за застосування ПЕГ 6000 у: Трапезунд, Барселонський, Серебристий та Косфорд. Також встановлено, що найбільше значення ростового індексу при застосуванні сублетальних концентрацій маніту було у сортів грецького горіха: Ярівський, Фернет, Чернівецький 1 та Буковинський 2, а за застосування ПЕГ 6000 у: Фернет, Чернівецький 1, Буковинський 2 та Ярівський.

Визначено, що виживання калюсних ліній фундука на середовищі без селективного фактору становило 85,4 %, а от при культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %. При цьому кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий 83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Досліджено, що максимальне число посухостійких калюсних ліній формували сорти Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Пірожок за додавання селективного агенту маніту, та сорти Барселонський, Трапезунд та Косфорд за додавання в якості селективного агенту ПЕГ 6000. Отже, сорт фундука Барселонський та Косфорд однаково добре підходять для селекції на посухостійкість з використанням обох селективних середовищ – маніту та ПЕГ 6000.

Встановлено, що виживання калюсних ліній грецького горіха на середовищі без селективного фактору склало 85,4 %, а от при культивуванні калюсних тканин різних сортів на селективному середовищі з манітом виживання їх було в межах 4,4-5,4 %, тоді коли за застосування селективної системи з ПЕГ 6000 виживало калюсів 7,7-10,3 %. Кращі показники виживання за селективного середовища з манітом були в сортів: Косфорд, Степовий

83, Барселонський, Трапезунд та Пірожок, а за застосування ПЕГ 6000: Трапезунд, Косфорд, Барселонський та Степовий 83.

Досліджено, що кращі показники відсотку числа посухостійких рослин регенерантів було отримано на селекційному середовищі з використанням маніту в сортів Кишиневський, Коржеуцький та Ферджан. А от за використання середовища з додаванням ПЕГ 6000 більше посухостійких рослин регенерантів формувалось в сортів грецького горіха Буковинський 2, Ярівський та Фернет.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Андрієвський В.В., Врублевський А.Т. Особливості введення грецького горіха *in vitro*. Тези VI міжнародної науково-практичної конференції "Біотехнологія: Звершення та надії". Національний університет біоресурсів і природокористування України, 2017. 1. С. 31–32.
2. Тітаренко Т.Є., Медведєва Т. В., Сатіна Г. М., Сатіна Л. Ф. Розмноження буковинських сортів горіха грецького (*Juglas regia L.*). Садівництво. 2009. Вип. 62. С. 58–64.
3. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста. Физиология растений. 1997. Т. 44. № 3. С. 471–480.
4. Мороз П. А., Комиссаренко Н. Ф. Аллелопатическая активность некоторых фенольных соединений. Роль токсинов растительного и микробного происхождения в аллелопатии. Киев: Наук. думка. 1983. С. 118–122.
5. Скрипченко Н. В. Динаміка вмісту фенольних речовин в пагонах актинїдії та регенераційна здатність при розмноженні. Вісник харківського національного аграрного університету. Серія «Біологія». 2009. Вип. 1 (16). С. 63–67.
6. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацька В. В. Технология микрклонального размножения растений. Киев: Наук. думка, 1992. 232 с.
7. Кушнир Г. П., Сарнацька В. В. Микрклональное размножение растений. К.: Наукова думка, 2005. 271 с.
8. Улинець В.З. Вплив вірусної інфекції на спектральні характеристики фотосинтетичного апарату рослин родини Solanaceae: автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.06 «Ботаника». К., 2002. 22с.