

УДК 581.143.5:[576.53:633.85]  
DOI 10.31395/2310-0478-2019-2-29-32



**Любченко І. О.,**  
аспірантка кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології,  
Уманський національний університет садівництва (м. Умань),  
Україна



**Рябовол Л. О.,**  
доктор с.-г. наук, професор,  
завідувач кафедри генетики, селекції рослин та  
біотехнології,  
Уманський національний університет садівництва  
(м. Умань), Україна



**Любченко А. І.,**  
кандидат с.-г. наук,  
доцент кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології,  
Уманський національний університет садівництва (м. Умань), Україна

## МОРФОГЕНЕЗ СОЛЕСТІЙКИХ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ РИЖІЮ ЯРОГО

**Анотація.** У статті наведено результати аналізу індукції морфогенезу та отримання рослин-регенерантів у клітинних ліній рижію ярого, відібраних за клітинної селекції *in vitro* на стійкість до хлоридного засолення. Тривале культивування біоматеріалу в селективних умовах суттєво знижує вихід рослинних структур. За індукування регенераційних процесів без селективного чинника здатність до морфогенезу зберігали 65,7 % клітинних ліній. Присутність хлориду натрію в культуральному субстраті знижувало частку морфогенноактивних біоматеріалів до 56,6 %, при цьому зафіксовано пригнічення морфогенної активності мікрокалюсів на 31,6 %. У середньому за генотипами у контрольному варіанті з одного мікрокалюса формувалось 1,9 мікропагони, а в присутності хлориду натрію – 1,3.

Створені клітинні лінії рижію ярого відрізнялись за рівнем солестійкості, збереженням здатності до регенерації і морфогенною активністю мікрокалюсів, що вплинуло на результати отримання рослин-регенерантів. Загалом у результаті проведених досліджень з клітинних ліній рижію ярого, що характеризувались найвищим рівнем солестійкості, отримано 381 регенерант. Присутність у регенераційних середовищах хлориду натрію знижувало частку отримання цілих рослин у середньому за генотипом на 45,4 %.

**Ключові слова:** рижій ярий, морфогенез, калюсна лінія, рослина-регенерант, хлорид натрію, селективний чинник

### **I. O. Liubchenko,**

Postgraduate Student of the Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology, Uman National University of Horticulture (Uman), Ukraine

### **L. O. Riabovol,**

Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology, Uman National University of Horticulture (Uman), Ukraine.

### **A. I. Liubchenko,**

PhD of Agricultural Sciences, Associate Professor of the Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology, Uman National University of Horticulture (Uman), Ukraine

## **MORPHOGENESIS OF SALT RESISTANT CELL LINES OF CAMELINA SATIVA**

**Abstract.** The creation and introduction into production of adaptive varieties is a prerequisite for efficient crop management in areas with adverse agro-climatic conditions. Nowadays, it is advisable to include a biotechnological link in the breeding process of creating resistant varieties. The use of *in vitro* culture can more accurately investigate the effect of a stress factor on the organism, control the physical and trophic parameters of the cultivation of the material, simulate the effect of selective agent on the biological object. However, there are some difficulties with the use of cell selection, the main one being the difficulty of obtaining regenerating plants due to tissue loss of morphogenesis capacity.

The aim of the study was to analyze the effect of the genotype and conditions of regeneration while maintaining the morphogenic potential of salt resistant cell lines of *camelina sativa* and to obtain regenerating plants.

In the course of the stepped cell selection, the callus lines of the *camelina sativa* varieties of Stepovy 1, Peremoha, Yevro 12 and Klondaik with maximum resistance to salt stress were succeeded (maximum NaCl concentration in the nutrient medium was 1.5 %). To obtain regenerating plants, the created biomaterials were transferred to regenerative nutrient media according to Murasige-Skuga prescription, modified with increased cytokinin concentrations (1.0 mg/l 6-BAP). Regeneration was performed in the presence of a stress agent and in the conditions of the control variant.

Chloride salinization exerts strong stress on the tissue culture of *camelina sativa*. Along with the inhibition of proliferation, a decrease in the ability to morphogenesis of created cell lines was observed. When inducing regenerative processes without a selective factor, the ability to morphogenesis was maintained by 65.7 % of cell lines. The presence of sodium chloride

*in the culture substrate reduced the proportion of morphogenically active biomaterials to 56.6 %, with inhibition of the morphogenic activity of microcalluses by 31.6 %. On average, genotype in the control variant of induction of morphogenesis from one microcalus formed 1.9 micropagons, and in the presence of sodium chloride — 1.3.*

*The reserached cell lines of camelina sativa differed in the level of salt resistance, retention of the ability to regenerate and morphogenic activity of microcalluses, which influenced the results of obtaining plants-regenerants. In total, 381 regenerants were obtained as a result of studies performed on the cell lines of the camelina sativa, which were characterized by the highest level of salt resistance. The presence of sodium chloride in regenerative media reduced the production of whole plants by an average of 45.4% by genotype.*

**Key words:** *camelina sativa, morphogenesis, callus line, regenerant plant, sodium chloride, selective factor*

**Постановка проблеми.** Рижий ярий є перспективною сільськогосподарською культурою. Такі характеристики, як невибагливість до умов вирощування, короткий період вегетації, стійкість до хвороб і шкідників дають можливість отримувати продукцію з низькими технологічними та матеріальними витратами [1–3].

У насінні рижію міститься 40–45 % жиру. Незважаючи на дієтичні та лікувальні властивості рижієвої олії, основний напрямок її використання — технічний. З неї виготовляють мастила, лаки, олифи, мила тощо. Вона є цінною сировиною для виробництва біодизеля [4–6].

Збільшення обсягів та підвищення економічних показників виробництва рижієвої продукції можливе завдяки впровадженню у виробництво високопродуктивних сортів стійких до негативних чинників довкілля.

Нині в селекційний процес створення адаптивних сортів включають біотехнологічну ланку. Застосування культури *in vitro* дозволяє точно дослідити вплив стресового чинника на організм, контролювати фізичні та трофічні параметри вирощування матеріалу, моделювати вплив селективного агента на біооб'єкт тощо. Цього важко досягти за роботи з інтактними рослинами [7, 8].

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.**

На рослини постійно здійснюється стресовий вплив негативних чинників навколишнього середовища. Засолення ґрунту є одним з найшкочинніших чинників, що знижує врожайність сільськогосподарських культур. В Україні біля 1,7 млн га земель сільськогосподарського призначення піддаються негативному впливу засолення [9]. За дії солей на клітину спостерігають порушення проходження фізіологічних і біохімічних процесів: відходження протоплазми від клітинних стінок та руйнування міжклітинних зв'язків [10]; посилення інтенсивності дихання із зниженням його енергетичної ефективності [11]; збільшення концентрації фітогормонів інгібувального характеру, пригнічення поділу та росту клітин, зниження інтенсивності фотосинтезу, зміну енергетичного обміну клітин [12]; порушення колоїдно-хімічних властивостей цитоплазми, уповільнення синтезу амінокислот і посилення гідролізу запасних білків, що викликає формування токсичних діамінів і появу некрозів [13]. Все це призводить до зниження життєздатності й продуктивності рослин. Створення та впровадження у виробництво адаптивних сортів є головною умовою для ефективного ведення рослинництва в зонах з несприятливими агрокліматичними умовами [14].

У науковій літературі є дані щодо отримання *in vitro* форм рослин стійких до негативних чинників довкілля, зокрема сольового стресу. Створені біотехнологічними методами генотипи використовують у фундаментальних цитогенетичних і фізіолого-біохімічних дослідженнях та вихідним матеріалом для селекції резистентних сортів сільськогосподарських культур. Багатогранність адаптаційного процесу вимагає, залежно від стресового чинника та біологічних особливостей культури, розробки специфічних схем проведення добору *in vitro* [7, 15, 16]. За використання клітинної селекції виникають певні труднощі, основна з яких — складність отримання рослин-регенерантів внаслідок втрати тканиною здатності до морфогенезу. Це явище виникає внаслідок так званого «фізіологічного звикання» клітин або їхнього «перехресного живлення» [17].

**Метою роботи** був аналіз впливу генотипу та умов індукції регенерації на збереження морфогенного потенціалу стійких до сольового стресу клітинних ліній

рижію ярого і отримання рослин-регенерантів.

**Методика проведення досліджень.** Дослідження проводили в навчально-науково-виробничій лабораторії біотехнології Уманського національного університету садівництва. У процесі проведеної ступеневої клітинної селекції вдалось відібрати калюсні лінії рижію ярого сортів Степовий 1, Перемога, Євро 12 та Клондайк з максимальною стійкістю до сольового стресу. Гранічна концентрація NaCl у живильному середовищі становила 1,5 %. Для отримання рослин-регенерантів відібрані біоматеріали переносили на регенераційні живильні середовища за прописом Мураціге-Скуга, що модифікували підвищеними концентраціями цитокініну (1,0 мг/л 6-БАП). Регенерацію проводили у присутності стресового агента та умовах контрольного варіанту. Концентрацію стресового агента, при якому проводили регенерацію рослин, обирали з таким розрахунком, щоб створювався високий стресовий тиск, але калюси повністю не втрачали здатність до морфогенезу. Біоматеріал культивували за інтенсивності освітлення 4 кЛк, 16-годинного фотоперіоду, температурного режиму 20–24 °C та відносної вологості повітря 75 %.

**Основні результати дослідження.** За створення оптимальних умов культивування морфогенез *in vitro* відмічено у 75,8 % первинних калюсних ліній рижію ярого. З одного мікрокалюса масою 50–60 мг утворювалось 6,3 регенерантів. Процес морфогенезу проходив за органогенезу та соматичного ембріодогенезу [18]. Хлоридне засолення здійснює сильний стрес на культуру тканин рижію. Поряд з пригніченням показників проліферації, відмічено зниження здатності до морфогенезу відібраних клітинних ліній. Структуровані ділянки з зеленими морфогенними осередками перетворюються на розпушені тканини обводненої консистенції світло-зеленого кольору.

Загалом за тривалого добору в культуральних умовах вдалось виділити 99 клітинних ліній. За перенесення на модифіковані регенераційні живильні середовища без селективного чинника здатність до морфогенезу зберігали 65 клітинних ліній, що становило 65,7 %. Присутність хлориду натрію в культуральному субстраті знижувало частку морфогенноактивних біоматеріалів до 56,6 %. Регенераційні процеси відмічено у 56 клітинних ліній.

Найвищі відносні показники збереження морфогенного потенціалу тканинних структур зафіксовано у номерів, отриманих з експлантів сорту Клондайк. У контрольному варіанті досліді морфогенез проходив у всіх сомональних ліній, а в присутності селективного чинника — у 75,0 %. Для біотипів отриманих з сорту Євро 12 цей показник відповідно становив 50,0 і 75,0 % (табл. 1)

З клітинних ліній індуктованих з експлантів сорту Степовий 1, за створення оптимальних умов, у 26 номерів (74,2 %) відмічено проходження регенераційних процесів. За проведення регенерації у присутності хлориду натрію морфогенну активність реалізували 60,0 % біоматеріалу.

Найбільшу кількість соматональних клітинних ліній, що зберігали життєздатність за 1,5 %-го рівня засолення, отримано з експлантів сорту Перемога. У контрольному варіанті за індуктування морфогенезу з 33 калюсних ліній вдалось отримати рослини-регенеранти, що становило 58,9 % від загальної кількості номерів. За проведення регенерації у селективних умовах частка морфогенних калюсів знижувалась до 51,8 %.

Таблиця 1

**Регенераційна здатність солестійких клітинних ліній рижю ярого залежно від сортових особливостей та умов індукування морфогенезу**

Селекційний матеріал	Частка ліній, що зберігала здатність до морфогенезу			
	контрольний варіант		селективні умови (1,5 % NaCl)	
	шт.	%	шт.	%
Степовий 1	26	74,2	21	60,0
Перемога	33	58,9	29	51,8
Євро 12	2	50,0	3	75,0
Клондайк	4	100,0	3	75,0
НІР <sub>01</sub>	–	3,9	–	3,7

Таблиця 2

**Інтенсивність морфогенезу клітинних ліній рижю ярого залежно від сортових особливостей та умов проведення регенерації**

Селекційний матеріал	Вихід рослин-регенерантів з одного мікрокалюса, шт.	
	контрольний варіант	селективні умови (1,5 % NaCl)
Степовий 1	2,0±0,6	1,3±0,7
Перемога	1,9±0,7	1,6±0,8
Євро 12	2,1±0,4	1,4±0,6
Клондайк	1,6±0,3	0,9±0,5
НІР <sub>01</sub>	0,1	0,1

Таблиця 3

**Отримання рослин-регенерантів з стійких клітинних ліній рижю ярого**

Селекційний матеріал	Контрольний варіант		Селективні умови (1,5 % NaCl)		Всього
	шт.	%	шт.	%	
Степовий 1	89	62,7	53	37,3	142
Перемога	120	58,3	86	41,7	206
Євро 12	8	50,0	8	50,0	16
Клондайк	12	70,6	5	29,4	17
Загалом	229	60,1	152	39,9	381

У калюсних ліній рижю ярого, що зберігали здатність до морфогенезу, спостерігалось суттєве зниження інтенсивності проходження регенераційних процесів (табл. 2). У середньому за генотипами у контрольному варіанті з одного мікрокалюса формувалось 1,9 мікропагони. Найнижчий показник активності морфогенезу в неселективних умовах мали лінії сорту Клондайк (1,6 регенеранти), найвищі — Євро 12 та Степовий 1 (2,1 та 2,0 регенеранти відповідно).

Наявність у живильному середовищі хлориду натрію знижувала регенераційну активність мікрокалюсів рижю ярого на 31,6 %. На селективних регенераційних субстратах у середньому за генотипами з одного мікрокалюса вдалось регенерувати 1,3 мікропагона. Найменше зниження вказаного показника відмічено у клітинних ліній сорту Перемога — на 15,8 %, найбільше — сорту Клондайк (на 43,7 %).

Створені клітинні лінії рижю ярого відрізнялись за рівнем солестійкості, збереженням здатності до регенерації та морфогенною активністю мікрокалюсів, що вплинуло на результати отримання рослин-регенерантів зі стійких до селективного чинника біоматеріалів (табл. 3).

Найбільшу кількість інтактних рослин отримано з клітинних ліній сорту Перемога — загалом індуковано 206 регенерантів, з них 120 рослин у контрольному варіанті. Присутність хлориду натрію знижувала

показники отримання рослин на 58,3 %. На селективних регенераційних середовищах отримано 86 мікропагонів. Високі показники отримання рослин-регенерантів з експлантів сорту Перемога пов'язано з індукцією великої кількості солестійких клітинних ліній.

З 35 калюсних ліній рижю ярого сорту Степовий 1, що характеризувались стійкістю до 1,5 %-ї концентрації NaCl, було регеновано 142 рослини. З них у присутності селективного чинника 37,3 %, а у варіанті без хлоридного засолення — 62,7 %. Отримані результати пояснюються високими показниками регенераційного потенціалу ліній (60,0–74,2 %) і морфогенною активністю мікрокалюсів (1,3–2,0 рослин-регенерантів з одного мікрокалюса).

З клітинних ліній індукованих з експлантів сортів Євро 12 та Клондайк, незважаючи на досить високі відносні показники збереження здатності до регенерації, було отримано найменше рослин-регенерантів (відповідно 16 та 17 номерів). Малий вихід рослинних ліній з клітинних структур вказаних генотипів зумовлено низькою часткою калюсних ліній, що було відібрано в результаті селекції *in vitro* (по чотири клітинні лінії кожного сорту). З калюсних структур сорту Євро 12 у присутності стресового чинника та оптимальних умов регеновано рівну кількість рослин (по вісім номерів). На регенераційних середовищах у присутності NaCl з біоматеріалу сорту Клондайк отримано п'ять рослинних ліній, що становило 29,4 %. На контрольних морфогенних

субстратах регенеровано 12 рослин (70,6 %).

**Висновки.** Тривале культивування калюсних тканин рижію ярого в умовах сольового стресу призводить до суттєвого пригнічення морфогенних показників. Присутність у регенераційних середовищах хлориду натрію знижує отримання цілісних рослин у середньому за генотипами на 45,4 %. Доведено, що індукція проліферації калюсної тканини і морфогенезу в умовах сольового стресу є генетично обумовленим чинником. Найбільше рослинного матеріалу отримано з калюсних ліній сортів Перемога та Степовий 1.

### Література:

1. Комарова І. Б., Рожкован В. В. Рижий — альтернативна олійна культура та перспективи його використання. Пропозиція. 2003. № 1. С. 46–47.
2. Семенова Е. Ф., Буянкін В. І., Тарасов А. С. Масличный рыжик: биология, технология, эффективность. Волгоград: Издательство ВолГУ, 2007. 82 с.
3. Москва І. С. Стан та перспективи вирощування рижію ярого на півдні Степу України. Вісник аграрної науки Причорномор'я. 2016. Вип. № 1. С. 99–109.
4. Лях В. О., Комарова І. Б. Вміст та жирнокислотний склад олії рижію ярого. Бюлетень Інституту зернового господарства. 2010. № 38. С. 137–142.
5. Кулакова С. Н., Гаппаров М. М., Викторова Е. В. О растительных маслах нового поколения в нашем питании. Масложировая промышленность. 2005. № 1. С. 4–8.
6. Мельничук М. Д., Демидась Г. І., Квітко Г. П., Гетман Н. Я. Рижий посівний як альтернатива ріпаку ярому для виробництва біодизеля. Наукові доповіді НУБіП України. 2012. Т. 31. № 2. [http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012\\_2/12dgi.pdf](http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dgi.pdf).
7. Сергеева Л. Е. Изменение культуры клеток под действием стресса. Киев: Логос, 2001. 99 с.
8. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
9. Балюк С. А. Екологічний стан ґрунтів України. Український географічний журнал. 2012. № 2. С. 38–42.
10. Филатова Л. А., Мельникова Е. Н. Влияние экзогенных регуляторов роста на некоторые показатели азотного обмена в проростках пшеницы в условиях засоления. Рост, развитие и адаптация растений к экстремальным факторам: Сб. науч. тр. Пермского ун-та. Пермь, 1987. С. 110–120.
11. Huang J., Redmann R. Root growth, respiration and ion relations of barley and wild barley under salt stress and contrasting calcium supply. Amer. Soc. Agron. Annu. Meet. Madison, 1993. P. 114.
12. Кузнецова С. А., Климачев Д. А., Кузнецова С. А., Карташов С. Н. Влияние засоления на показатели фотосинтетической активности растений. Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2014. № 1. С. 63–68.
13. Ісаєнко С. В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин. Цитология и генетика. 2012. Т. 46. № 5. С. 50–71.
14. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. Экологическая селекция растений. Минск: Тэхналогія, 1997. 372 с.
15. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин. Збірник наукових праць УНУС. 2016. № 88. Ч. 1. Сільськогосподарські науки. С. 126–139.
16. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. Комаровские чтения. 2007. Вып. LV. С. 184–211.
17. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наук. думка, 1990. 280 с.
18. Любченко І. О., Любченко А. І. Індукція морфогенезу калюсної тканини рижію ярого. Матеріали VI міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної аграрної науки». Умань, 2017. С. 70–71.

### References

1. Komarova I. B., Rozhkovan V. V. (2003) Ryzhii alternatyvna oliina kultura ta perspektyvy yoho vykorystannia. Propozytisia, 2003, № 1, pp. 46–47.
2. Semenova E. F. Buiankyn V. I., Tarasov A. S. (2007) Maslichnyy ryzhik: biologiya, tehnologiya, effektivnost. Volhograd, Izdatelstvo VolHU, 2007, 8 p.
3. Moskva I. S. (2016) Stan ta perspektyvy vyroshchuvannya ryzhiu yaroho na pivdni Stepu Ukrainy. Visnyk aharnoi nauky Prychornomorja, 2016, no. № 1. pp. 99–109.
4. Liakh V. O., Komarova I. B. (2010) Vmist ta zhynokyslotnyi sklad olii ryzhiu yaroho. Biuletyn Instytutu zernovoho hospodarstva, 2010, № 38, pp. 137–142.
5. Kulakova S. N., Happarov M. M., Vyktorova E. V. (2005) O rastitelnykh maslakh novogo pokoleniya v nashem pitanii. Maslozhirovaya promyshlennost, 2005, № 1, pp. 4–8.
6. Melnychuk M. D., Demydas H. I., Kvitko H. P., Hetman N. Ya. (2012) Ryzhii posivnyi yak alternatyva ripaku yaromu dlia vyrobnytstva biodyzelia, Naukovi dopovidі NUBiP Ukrainy, 2012, T. 31, № 2. Available at [http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012\\_2/12dgi.pdf](http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dgi.pdf).
7. Serheeva L. E. (2001) Zmnenie kulturyi kletok pod deystviem stressa. K.: Logos, 2001. 99 p.
8. Kunakh V. A. (2005) Biotekhnolohiia likarskykh roslyn. Henetychni ta fiziolohe-biokhimichni osnovy. Kyiv: Lohos, 2005. 730 p.
9. Baliuk S. A. Ekolohichni stan gruntiv Ukrainy. Ukrainyskyi heohrafichnyi zhurnal, 2012, № 2, P. 38–42.
10. Filatova L. A., Melnikova E. N. (1987) Vliyanie ekzogennykh regulyatorov rosta na nekotorye pokazateli azotnogo obmena v prorstkah pshenitsy v usloviyah zasoleniya. Rost, razvitie i adaptatsiya rasteniy k ekstremalnym faktoram: Sb. nauch. tr. Permskogo un-ta. Perm, 1987, pp. 110–120.
11. Huang J., Redmann R. (1993) Root growth, respiration and ion relations of barley and wild barley under salt stress and contrasting calcium supply. Amer. Soc. Agron. Annu. Meet., Madison, 1993. P. 114.
12. Kuznetsova S. A., Klimachev D. A., Kartashov S. N. (2014) Vliyanie zasoleniya na pokazateli fotosinteticheskoy aktivnosti rasteniy. Vestnik MGOU. Seriya «Estestvennyye nauki», 2014, № 1, pp. 63–68.
13. Isaenko S. V. (2012) Fizioloheichni ta molekuliarni aspekty solovoho stresu roslyn. Tsytolohiya y henetyka, 2012, T. 46, № 5, pp. 50–71.
14. Kilchevskiy A. V., Hotyileva L. V. (1997) Ekologicheskaya selektsiya rasteniy. Minsk: Tehnalogiya, 1997. 37 p.
15. Liubchenko I. O., Riabovol L. O., Liubchenko A. I. (2016) Vykorystannia kultury in vitro v adaptyvni selektsii roslyn. Zbirnyk naukovykh prats UNUS, 2016, № 88, pp. 126–139.
16. Babikova A. V., Gorpenchenko T. Yu., Zhuravlev Yu. N. (2007) Rastenie kak ob'ekt biotekhnologii. Komarovskie chteniya, 2007, no. IV. pp. 184–211.
17. Sidorov V. A. (1990) Biotekhnologiya rasteniy. Kletochnaya selektsiya. K.: Nauk. dumka, 1990. 280 p.
18. Liubchenko I. O., Liubchenko A. I. (2017) Induktsiia morfogenezu kaliusnoi tkany ny ryzhiu yaroho. Materialy VI mizhnarodnoi naukovy-praktychnoi konferentsii «Aktualni pytannia suchasnoi aharnoi nauky». Uman, 2017, pp. 70–71.