

РОЗДІЛ 2 БІОТЕХНОЛОГІЯ В РОСЛИННИЦТВІ (ГЕННА І КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ)

УДК 577.2:167:633.85

СТАН БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ РИЖІЮ ЯРОГО

*Л. Рябовол, д. с.-г. н., А. Любченко, к. с.-г. н., І. Любченко, аспірант
Уманський національний університет садівництва*

Постановка проблеми. Усебічний та раціональний розвиток рослинництва в сучасних екологічних та економічних умовах неможливий без залучення нових перспективних видів рослин, які б могли забезпечити стабільне надходження високоякісної дешевої продукції. Рижій ярий характеризується комплексом цінних біологічних та господарських ознак і може використовуватися як продовольча, технічна та лікарська культура.

Стійкість проти хвороб і шкідників, невибагливість до умов навколишнього середовища дає змогу вирощувати цю культуру в різних ґрунтово-кліматичних зонах із мінімальними виробничими затратами й отримувати екологічно чисту продукцію. Короткий період вегетації (60–90 діб) робить його добрим попередником для озимих і створює умови для розміщення самої культури у пожнивних та післяякісних посівах [1–3].

Насіння рижію містить до 45 % олії з високим вмістом олеїнової (близько 16 %), лінолевої (близько 20 %), ліноленової (близько 35 %) жирних кислот та низьким вмістом ерукової кислоти (1,6–2,2 %), що робить її придатною для використання в харчуванні [4].

Рижієва олія, незважаючи на низькі смакові якості, завдяки специфічному жирокислотному складу має лікувальні та дієтичні властивості (нормалізує артеріальний тиск, знижує рівень холестерину в крові, відновлює стійкість і еластичність кровоносних судин, запобігає порушенню жирового обміну та виникненню запальних процесів) і рекомендована при серцево-судинних захворюваннях та цукровому діабеті [5; 6].

Нині зріс інтерес до рижію ярого як до енергетичної культури. Зокрема, С. М. Каленська та А. В. Юник [7], які оцінювали вміст і вихід енергії з фітомаси ярих олійних культур родини капустяних, найвищу олійність насіння виявили у рижію ярого (47,5 %). Вміст енергії в насінні, олії та соломі відповідно становив 26,4, 38,2 та 17,7 Дж/г. Тому навіть за невисокої врожайності (1,9 т/га) сумарний вихід енергії складає 110 ГДж/га. Висока технологічність рижієвої олії робить її цінною сировиною для виробництва біодизелю та авіаційного палива [8; 9]. Так, у США потенціал виробництва високоякісного, екологічно чистого реактивного палива з рижію оцінюють у понад 3 млрд л на рік [10].

Незважаючи на те, що у світі обсяги вирощування рижію збільшуються, в Україні площі під вказаною культурою залишаються незначними. Основною причиною цього є малоінтенсивна селекційна робота. На 2017 рік до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні [11], внесено дев'ять сортів рижію ярого. Цього недостатньо для задоволення вимог виробництва, тому важливою проблемою є створення нових високопродуктивних, адаптованих до умов вирощування сортів.

Підвищити ефективність селекційного процесу рижію можна за рахунок використання біотехнологічних методів. Застосування культури *in vitro* забезпечує контроль параметрів вирощування біоматеріалу, дає змогу маніпулювати з об'єктами на клітинному та молекулярному рівнях, моделювати стресові фони для добору стійких генотипів, швидко отримувати нові форми рослин із бажаними ознаками. Цього важко досягти з інтактними рослинами [12].

На ефективність культивування та шляхи розвитку біоматеріалу *in vitro* впливає низка чинників: вибір експланту та умови проведення їхньої стерилізації при введенні в культуру, склад живильного середовища, вміст та співвідношення у ньому регуляторів росту, фізичні умови вирощування біооб'єктів тощо. Для кожного біовиду вказані параметри визначають експериментально [13].

Постановка завдання. Мета нашого дослідження – на основі аналізу наукової літератури вітчизняних і закордонних авторів провести оцінку сучасного стану використання біотехнологічних методів у генетично-селекційних дослідженнях рижію ярого та визначити можливі перспективні напрями наукової роботи.

Виклад основного матеріалу. Історія залучення біотехнологічної ланки в селекційно-генетичних дослідженнях *Camelina sativa* L. налічує близько двох десятиліть. Перші повідомлення щодо особливостей культивування *in vitro* рижію ярого зробили дослідники SCRI (Великобританія) та Познанського природничого університету (Польща). Вони розробили систему регенерації *in vitro* пагонів із листових експлантів. Доведено, що для ефективного проходження процесу пагоноутворення необхідною умовою є наявність у живильному середовищі регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи. За комбінації 0,54 мкМ НОК та 4,44 мкМ 6-БАП отримано найвищий показник регенерації – 10 пагонів на одному експланті. На живильних субстратах, які містили лише ауксини, розвиток експлантів проходив або шляхом калюсогенезу, або ризогенезу [14]. Досліджено залежність шляхів розвитку експлантів (фрагменти гіпокотилі) сорту Боровський у стерильній культурі від концентрації та співвідношення регуляторів росту. Найінтенсивніше індукування калюсогенезу спостерігали на середовищі Мурасіге–Скуга, доповненому 2,4-Д в концентрації 1,0 мг/л. Калюсна тканина наростала вже через 5–8 діб культивування. Показник ефективності калюсогенезу був на високому рівні (94,6 %), на деяких мікрокалюсах спостерігали утворення меристематичних осередків. Для регенерації пагонів живильні середовища рекомендовано модифікувати 2,0 мг/л НОК, 3,0 мг/л 6-БАП і 2,0 мг/л кінетину. У цьому варіанті в 72 % експлантів спостерігали морфогенез, у середньому з одного експланта формувалося 7,3 мікропагона [15]. Наступні дослідження було спрямовано на виявлення впливу абсцисової кислоти (АБК) на регенерацію *in vitro* рослин рижію. Остання інгібує

впливала на калюсну тканину, пригнічуючи показники проліферації на 70–90 % залежно від вмісту в живильному середовищі фітогормону. Концентрація 3,0 мг/л АБК викликала майже повний некроз експлантів. Проте за невисокої концентрації (0,3 мг/л) АБК спостерігали найвищу регенераційну активність – проходження соматичного ембріодогенезу відмічено у 53 % експлантів [16].

Дослідник T. Łuczkiwicz зі співавторами [17] провели аналіз шести генотипів рижію ярого та їхніх гібридних комбінацій за діалельних схрещувань щодо здатності морфогенезу в культуральних умовах. Було виявлено, що регенерація рослин проходила за непрямого органогенезу. Після восьми тижнів пасажування на регенераційних середовищах, залежно від походження, з одного мікрокалюса формувалося від 2,8 до 5,8 мікропагона. Регенеровані рослинні лінії характеризувалися індивідуальними морфологічними та біометричними показниками, що могло бути зумовлено соматичною варіабельністю чи епігенетичною мінливістю.

В Інституті біотехнології рослин Національної дослідницької ради Канади [18] розроблено технологію використання культури мікроспор *in vitro* для отримання гаплоїдних матеріалів рижію ярого. Мікроспори було виділено та висаджено на середовище В₅. Культивування проводили у темнових умовах за температурного режиму 24° С на живильному середовищі NLN з додаванням 12,5 % сахарози та 12,5 % ПЕГ 4000. Найвищий показник ембріодогенезу складав 38 регенерантів на 100 тис. мікроспор. Отримані гаплоїдні структури використовували в подальшому селекційному процесі.

Рижій, завдяки його біологічним особливостям, залучають до схем парасексуальної гібридизації *in vitro* для генетичного покращання інших представників родини капустяних, зокрема для підвищення стійкості до хвороб і шкідників. Наприклад, для надання гірчиці абіссінської стійкості до альтернаріозу застосовували метод хімічного злиття ізольованих протопластів. Середня частка формування гетерокаріонів склала 6,8 %. З гібридного мікрокалюса вдалося отримати регенеранти, гібридність яких було підтверджено морфологічним та цитологічним аналізами. Рослини-регенеранти проявляли здатність до пасажування *in vitro*, проте укорінення біоматеріалу провести не вдалося [19]. Усі вегетативні гібриди *Camelina sativa* + *Brassica oleracea* мали проміжне положення між вихідними видами. Два регенеранти з протестованих характеризувалися підвищеною стійкістю до *Alternaria brassicicola*. Після укорінення матеріал вирощували у відкритому ґрунті протягом 4–5 тижнів. Окремі рослини формували стерильні квіти [20].

За допомогою електрозлиття було отримано міжвидові соматичні гібриди *Brassica napus* + *Camelina sativa*. Як експланти використовували ізольовані протопласти. Гібридну ідентичність регенерантів визначали за використання проточної ДНК-цитометрії та SSR-маркерного аналізу. У ході досліджень виділено три гібридні регенеранти, що вирізнялися проміжними морфологічними характеристиками порівняно з вихідними батьківськими формами. Насіння створених гібридних зразків мало поліпшений жирно-кислотний склад, зокрема підвищений вміст ліноленової кислоти [21].

Зафіксовано дані про проведення клітинної селекції рижію ярого на стійкість до негативних чинників довкілля. Вивчали можливість використання рижію для проведення фітомеліорації ґрунтів, забруднених іонами важких металів. Для цього досліджували вплив полутантів на ріст і розвиток рослин рижію в умовах *in vitro*. Критична концентрація стресового чинника для росту рослин – 50 μM Cd, 500 μM Pb, 500 μM Zn і 100 μM Co. Було виділено генотипи з надвисокою експресією гена CsHMA3, які демонстрували підвищену стійкість до негативного впливу іонів важких металів. Трансгенні лінії рижію ярого характеризувалися ширшою формою листків порівняно з рослинами дикого типу внаслідок індукції генів, пов'язаних зі зростанням ширини листової пластини. Вони показали вищу, ніж у вихідного сорту, насінневу продуктивність під впливом стресових навантажень [22].

Для визначення впливу засолення та добору солестійких форм рижію ярого проводили клітинну селекцію *in vitro*. Культуру проростів вирощували на селективному середовищі Мурасіге–Скуга, до якого додавали NaCl в концентраціях 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 мМ. Стійкість біоматеріалу визначали за параметрами росту, фізіологічними та біохімічними показниками. Концентрація хлориду натрію 200 мМ викликала затримку проростання, формування сім'ядолей, утворення першого справжнього листка на 30,6, 17,3 і 28,8 % відповідно до контролю. Також спостерігали зниження висоти рослин, вмісту води в тканинах і вмісту хлорофілу на 85,4, 10,8 та 81,3 % відповідно [23].

Останнім часом *Camelina sativa* L. став об'єктом досліджень генетичної інженерії. У 2006 році розшифровано генетичну карту для *Camelina sativa* з використанням ДНК-маркерів поліморфізму довжини ампліфікованого фрагмента (AFLP) у популяції рекомбінантних інбредних ліній, отриманих із гібридної популяції фенотипічно різних сортів Lindo та Licalla. Було виявлено локалізацію локусів кількісних ознак, які відповідають за висоту рослин, насінневу продуктивність, вміст олії у насінні та інші господарсько цінні характеристики. Генетичний аналіз показав мономорфні продукти ампліфікації, що свідчить про часткову гомологію геному *Camelina sativa* з іншими видами *Brassicaceae* [24].

Генетичний контроль біосинтезу жирних кислот у рижію показав три ізольовані копії FAD2, FAE1 інтергенної зони KCS17-FAE, три виражені гаплотипи спостерігали у шести передбачених однокопійних генів. Цитометричний аналіз засвідчив утричі більший вміст ДНК у *Camelina sativa* порівняно з дикими представниками цього роду. Усе це вказує на поліплоїдну природу зазначеного виду. Філогенетичний аналіз підтверджує можливість дублювання геному та аллогексаплоїдне походження *Camelina sativa* [25].

Для трансформації рижію, щоб уникнути труднощів, які виникають за використання культури *in vitro*, було розроблено метод *in planta*, що передбачає агробактеріальну інокуляцію рослин на ранніх стадіях цвітіння. Ефективність методу становить 0,8 %. Генетичний аналіз показав, що більшість трансгенних рослин містить одну копію трансгена. Насіння генетично змінених форм рижію має високий вміст рицинолевої кислоти [26]. Підвищити ефективність проведення генетичної трансформації рижію можна за рахунок вакуумної інфільтрації.

Бактеріальну інокуляцію рослини проводять у вакуумних ексикаторах протягом 5 хв. за тиску 85 кПа. За допомогою цього методу можна отримати понад 1 % трансгенного насіння. Використання флуоресцентних білків (DsRed) як візуальних маркерів дає змогу легко ідентифікувати трансгенні матеріали. Генетичний аналіз показав, що більшість трансгенних рослин містить одну копію трансгена. Виділено генотипи зі зміненим жирнокислотним складом олії в насінні [27].

Учені Інституту харчової біотехнології та геноміки НАНУ та Національного ботанічного саду ім. Н. Н. Гришка [28] встановили технологію введення біоматеріалу в культуру *in vitro*. Визначено склад живильного середовища та концентрацію регуляторів росту, вивчено вплив типу і віку експлантів на індукцію утворення пагонів рижію ярого, а також встановлено концентрацію НОК, що викликає ризогенез в отриманих пагонів. Розроблено метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рижію з використанням бінарного вектора pGH217, що несе ген-репортер β -глюкуронідази (*gus*) під контролем 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти і *nos*-термінатора, а також селективний маркерний ген *hpt*, що забезпечує стійкість до гігроміцину.

Група дослідників із наукових центрів Гонконгу [29] методами генетичної трансформації отримали лінії рижію зі зміною експресії генів, які кодують вуглецевий метаболізм. Підвищена активність гена *AtPAP2* сприяла стимулюванню активності фотосинтезу та пришвидшенню руху вуглеводів по транспортній системі рослини. Трансгенні лінії характеризувалися подовженими гіпокотиллями, раннім цвітінням, підвищеною насінневою продуктивністю та розмірами насіння порівняно з рослинами дикого типу. Внаслідок вказаних морфологічних змін урожайність створених генотипів зростала на 50–110 % відносно вихідного сорту.

Висновки. Отже, аналіз джерел наукової літератури вказує на перспективність культури рижію ярого та застосування біотехнологічних методів у селекційно-генетичних дослідженнях. Недостатнє вивчення цього питання вимагає розробки нових підходів до вирішення наукової проблеми удосконалення селекційного процесу створення вихідних матеріалів та нових сортів рижію ярого.

Бібліографічний список

1. Комарова І. Б., Рожкован В. В. Рижій – альтернативна олійна культура та перспективи його використання. *Пропозиція*. 2003. № 1. С. 46–47.
2. Семенова Е. Ф., Буянкін В. И., 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. Жирнокислотный состав масла семян рыжика озимого / В. А. Куркин и др. *Фармация*. 2013. № 6. С. 30–32.
6. Кулакова С. Н., Гаппаров М. М., Викторова Е. В. О растительных маслах нового поколения в нашем питании. *Масложировая промышленность*. 2005. № 1. С. 4–8.
7. 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.

8. Рижій посівний як альтернатива ріпаку ярому для виробництва біодизеля / М. Д. Мельничук та ін. Наукові доповіді НУБіП України. 2012. Т. 31. № 2. URL: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2012_2/12dgi.pdf/ (дата звернення: 14.02.2018).
9. Рыжик – перспективная масличная культура для производства биодизельного топлива / В. А. Гаврилова и др. *Агро XXI*. 2013. № 1–3. С. 43–44.
10. Shonnard D. R., Williams L, Kalnes T. N. Camelina-derived jet fuel and diesel: Sustainable advanced biofuels. *Environmental progress & sustainable energy*. 2010. № 9(3). P. 382–392.
11. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні. Київ, 2018. 415 с.
12. Бабилова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. Н. Растение как объект биотехнологии. *Комаровские чтения*. 2007. Вып. LV. С. 184–211.
13. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
14. Tattersall A., Millam S. Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species *Camelina sativa*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1998. Vol. 55, Issue 2. P. 147–150.
15. Zandacka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. Regeneracja pędów z segmentów hypokotylowych lnianki siewnej *Camelina sativa* L. w kulturach *in vitro*. *Rośliny oleiste*. 1999. T. XX. S. 631–636.
16. Mielcarek A., Zandacka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. Wpływ kwasu abscysynowego (ABA) na regenerację roślin *Camelina sativa* L. w warunkach kultury *in vitro*. *Rośliny oleiste*. 2000. T. XXI. S. 309–314.
17. Analiza genetyczna kilku cech ilościowych związanych z regeneracją lnianki siewnej (*Camelina sativa* L.) w warunkach kultur *in vitro* / Łuczkiwicz T. et al. *Biuletyn Instytutu hodowli i aklimatyzacji roślin*. 2006. № 242. S. 261–266.
18. Ferrie A. M. R., Bethune T. D. A microspore embryogenesis protocol for *Camelina sativa* a multi-use crop. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2011. Vol. 106, Issue 3. P. 495–501.
19. Narasimhulu S. B., Kirti P. B., Bhatt S. R. Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1994. Vol. 13, Issue 11. P. 657–660.
20. Sigareva M. A., Earle E. D. Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1999. Vol. 98, Issue 1. P. 164–170.
21. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content / J. Jiang et al. 2009. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2009. Vol. 99, Issue 1. P. 91–95.
22. Park W., Feng Y., Ahn S. Alteration of leaf shape, improved metal tolerance, and productivity of seed by overexpression of CsHMA3 in *Camelina sativa*. *Biotechnology for biofuels*. 2014. 7:96. URL: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/96> (Last accessed: 14.02.2018).
23. Salinity stress tolerance of camelina in vestigated *in vitro* / H. Khalid et al. *Scientia agriculturae bohemia*. 2015. № 46 (4). P. 137–144.
24. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*) / A. Gehringer et al. *Genome*. 2006. № 49 (12). P. 1555–1563.
25. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes / C. Hutcheon et al. *BMC plant biology*. 2010. 10:233. URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/233> (Last accessed: 14.02.2018).
26. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants / X. Liu et al. *In vitro cellular & developmental biology plant*. 2012. Vol. 48, Issue 5. P. 462–468.
27. Lu C., Kang J. Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant cell reports*. 2008. № 27. P. 273–278.

28. Введение в культуру *in vitro*, регенерация и генетическая трансформация рыжика посевного (*Camelina sativa*) / А. И. Емец и др. *Цитология и генетика*. 2013. Т. 47, № 3. С. 14–20.

29. Over-expression of AtPAP2 in *Camelina sativa* leads to faster plant growth and higher seed yield. / Y. Zhang et al. *Biotechnology for biofuels* 2012. 5:19. URL: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/19> (Last accessed: 14.02.2018).

Рябовол Л., Любченко А., Любченко І. Стан біотехнологічних досліджень рижію ярого

На основі аналізу літературних джерел висвітлено сучасний стан та особливості застосування біотехнологічних методів у генетично-селекційних дослідженнях рижію ярого. Розглянуто особливості використання культури *in vitro* та обґрунтовано доцільність проведення наукових досліджень у цьому напрямі.

Науковий пошук спрямовано на розробку технології регенерації *in vitro*, модифіковано живильні середовища для індукування морфогенезу листових експлантів та мікроклонального розмноження біоматеріалу. Доведено, що основною умовою ефективного проходження процесу пагоноутворення є наявність у живильному середовищі регуляторів росту ауксинової та цитокінінової природи.

Рижій залучають до схем парасексуальної гібридизації *in vitro* для генетичного покращання інших представників родини капустяних. Із гібридного мікрокалюса вдалося отримати регенеранти, гібридність яких було підтверджено морфологічними та цитологічними аналізами. Двоє з протестованих регенерантів характеризувалися підвищеною стійкістю до хвороб.

Для створення вихідного селекційного матеріалу рижію ярого використовують гаплоїдію *in vitro* та клітинну селекцію.

Нещодавно *Camelina sativa* L. став об'єктом досліджень у генетичній інженерії. З використанням ДНК-маркерів було розшифровано генетичну карту виду. Виявлено локалізацію локусів кількісних ознак, які відповідають за висоту рослин, насінневу продуктивність, вміст олії у насінні та інші господарсько цінні характеристики. Цитометричний аналіз показав утричі більший вміст ДНК у *Camelina sativa* порівняно з дикими представниками цього роду, що вказує на поліплоїдну природу виду.

Для трансформації рижію, щоб уникнути труднощів, що постають за використання культури *in vitro*, було розроблено метод *in planta*, який передбачає агробактеріальну інюкуляцію рослин на ранніх стадіях цвітіння.

Ключові слова: рижій ярий, біотехнологічні методи, культура *in vitro*, регулятори росту рослин, трансформація.

Ryabovol L., Lyubchenko A., Lyubchenko I. The situation of biotechnological studies on camelina

The current situation and peculiarities of applying biotechnological methods in genetic selection studies on camelina are studied on the basis of the analysis of sources of scientific literature. Peculiarities of using *in vitro* culture are considered and expediency of the scientific research in this direction is justified.

The scientific work is aimed at the development of *in vitro* regeneration technology. Nutriulture media for inducing leaf explant morphogenesis and microclonal reproduction of biomaterials are modified. It is proved that the presence of growth regulators of auxin and cytokinin nature in nutrient area is a necessary condition for effective passing of the process of shoots formation.

Camelina is used in parasexual hybridization schemes *in vitro* for genetically improving other representatives of *Brassicaceae* family. Regenerants were obtained from the hybrid microculus which hybridization was confirmed by morphological and cytological analyzes. Two regenerants from the tested material were characterized by increased resistance to diseases.

In vitro haploid and cellular selection are used to create the initial breeding stock of camelina.

Recently, *Camelina sativa* L. became the object of research in genetic engineering. With the use of DNA-markers, a genetic map was deciphered, localization of loci of quantitative traits, which are responsible for plant height, seed production, oil content in seeds and other economically valuable characteristics, was detected. Cytometric analysis showed a three-fold greater DNA content in *Camelina sativa* L. than wild species of this genus, indicating a polyploid nature of this species.

In planta method was developed to transform camelina avoiding difficulties that arise when using culture *in vitro*. It provides agrobacterial inoculation of plants at early stages of flowering.

Key words: camelina, biotechnological methods, culture *in vitro*, plant growth regulators, transformation.