

УДК 631.527.581.143.5:633.14

РЯБОВОЛ Я. С., канд. с.-г. наук

РЯБОВОЛ Л. О., д-р с.-г. наук

Уманський національний університет садівництва

**ВИЗНАЧЕННЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМУ
ДЛЯ ФОРМУВАННЯ АКТИВНОЇ КОЛЕКЦІЇ ВИХІДНОГО
СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ ЖИТА ОЗИМОГО**

Створення генетичного банку вихідних форм і використання активної колекції рослинних матеріалів сприяє оптимізації селекційного процесу перехреснозапилених культур, зокрема жита озимого. Використання культуральної колекції забезпечить збереження та отримання у визначений період донорів генів якісних господарсько цінних ознак у відповідні селекційні схеми протягом тривалого терміну часу.

Найпростішим чинником уповільнення росту за створення активної колекції є зниження температури депонування клонованих зразків. У процесі досліджень визначено умови створення генетичного банку рослин жита озимого за використання температурного обмеження. Розроблено послідовну технологічну схему переведення рослинного матеріалу в стан відносного анабіозу. Доведено, що оптимальною температурою для зберігання рослин є 6 °С. Вживання зразків за вказаного температурного режиму після 12 місяців депонування фіксували на рівні 78,2 %.

Використання біотехнологічних методів для збереження і розмноження цінного вихідного матеріалу допоможе інтенсифікувати селекційний процес отримання гетерозисних гібридів.

Ключові слова: жито озиме, донор, вихідний матеріал, генетичний банк, активна колекція, поживне середовище, температурний режим.

Постановка проблеми. Основними питаннями в селекції рослин є пошук, відбір та збереження джерел продуктивного вихідного матеріалу [1]. Для збереження вихідних форм доцільно використовувати біотехнологічні методи.

Залежно від програмованого терміну збереження генофонду рослин можна створити активну або базову колекції *in vitro*. Обидва типи банків генів вирішують проблему тривалого зберігання біоматеріалу шляхом уповільнення росту рослин (активна колекція) або кріозбереження (базова (пасивна) колекція) [2, 3].

Для зберігання рослинного матеріалу протягом 5–10 років доцільно створювати активну колекцію зразків і не обов'язково формувати базову колекцію. Достатньо перевести рослинний матеріал у стан уповільненого росту, створивши банк активної колекції генетичного матеріалу, яка може терміново використовуватись у селекційній роботі. Для цього необхідно підібрати відповідний режим вирощування, який обмежить можливість проходження інтенсивних процесів метаболізму в рослинному організмі та, за можливості, зведе ріст та розвиток біосистем до нуля [4, 5, 6].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Створення генетичного банку вихідних форм і використання активної колекції рослинних матеріалів сприяє оптимізації селекційного процесу, особливо це стосується перехреснозапилених культур, зокрема жита озимого, тому що для отримання ліній за примусового самозапилення зав'язується незначна кількість насіння. Використання культуральної колекції сприятиме не тільки збереженню вихідних форм, але й у визначений селекційний період дозволить отримати запрограмовану кількість цінного матеріалу [7].

Найпростішим чинником уповільнення росту є зниження температури культивування клонованих зразків. Ефективним методом переходу рослин у стан глибокого або вимушеного спокою є зміна живильного середовища, зокрема, співвідношення між екзогенними регуляторами росту. Використовують і способи, що поєднують зміну температурного режиму із використанням гормональних або осмотичних інгібіторів [6, 8].

В літературі недостатньо інформації щодо умов створення та зберігання активної колекції біологічного виду *Secale cereale* L.

Актуальність питання з вивчення умов створення активної колекції рослинних матеріалів жита озимого не викликає сумнівів, тому що цінні генотипи культурального матеріалу можуть слугувати джерелом генів якісних господарсько цінних ознак у відповідних селекційних схемах протягом

тривалого терміну часу (до 10 років). Жито – перехреснозапильна рослина і збереження генетично ідентичного матеріалу є важливим питанням у технологічній схемі отримання та використання вихідних матеріалів у селекційному процесі за створення високопродуктивних гетерозисних гібридів [9].

Оптимальними умовами вирощування жита озимого є температурний режим у межах 20–24 °С, 16-годинний фотоперіод за інтенсивності освітлення 3–5 кЛк та вологості 75 %. Саме таких умов потребують рослини помірних широт, до яких належить культура.

За такого режиму вирощування на ростових живильних середовищах за результатами наших досліджень з однієї апікальної меристеми за 50–60 діб залежно від генотипу можна отримати до 20 адвентивних бруньок. Таким чином, використовуючи клонування можна забезпечити селекціонера генетично ідентичним рослині-донору експланта матеріалом [10].

Збільшуючи термін культивування без зміни живильного середовища спостерігаємо пожовтіння та некроз нижніх листочків рослин, що призводить до втрати цінного генетичного матеріалу. За оптимального режиму культивування необхідно періодично оновлювати живильний субстрат. Цей процес потребує відповідних затрат. А під час роботи з перехреснозапильними культурами постає питання збереження селекційного матеріалу в культурі *in vitro* та використання цінного генетичного потенціалу протягом тривалого періоду.

Метою роботи було визначення умов формування генетичного банку цінних матеріалів за зміни температурного режиму для тривалого депонування клонованих рослин жита озимого і використання активної колекції вихідних форм за ведення гетерозисної селекції.

Методика досліджень. Дослідження проводили впродовж 2014–2016 рр. у лабораторії біотехнології Уманського національного університету садівництва. Матеріалами слугували культуральні клоновані рослини сортів Хлібне і Карлик 1 та створених зразків (337–2, 133–1, 103–7, 214) жита озимого. Для депонування клонів використовували живильне середовище, до складу якого входили макро- і мікроелементи за прописом середовища Мурасіге-Скуга. Модифікували живильний субстрат цитокінінами і ауксинами. Клони зберігали в культуральних приміщеннях при визначеному за варіантами температурному режимі (6–12 °С) та низькій інтенсивності освітлення (2 кЛк).

Основні результати дослідження. Сформувати активну колекцію та подовжити термін її депонування можна за рахунок уповільнення процесів метаболізму в організмі рослини, створенням умов для припинення інтенсивного росту та розвитку біооб'єктів.

Для переведення рослин жита озимого у стан відносного спокою використовували фактор температурного обмеження (низькі позитивні температури).

Варіанти досліду відрізнялись температурою в культуральних приміщеннях, де протягом 12 місяців зберігали біоматеріал. У процесі досліджень визначали середній щомісячний приріст рослин, період активного росту протягом терміну зберігання, інтенсивність закладання адвентивних бруньок та фіксували відсоток здорових рослин.

У результаті проведених досліджень визначено оптимальні фізичні умови створення та зберігання активної колекції жита озимого (табл. 1).

Таблиця 1 – Вживання рослин жита озимого залежно від впливу низьких позитивних температур та тривалості депонування активної колекції, %

Режим, t °С	Середній приріст, см	Кількість сформованих бруньок, шт.	Період активного росту, діб	Період депонування (місяців)				
				4	6	8	10	12
12 °С	1,2±0,4	4–7	40–60	98,6±0,4	81,4±1,5	74,6±0,4	65,2±1,0	54,5±2,4
10 °С	0,7±0,3	3–5	20–30	99,5±0,2	92,8±0,6	81,3±1,1	76,4±1,2	62,0±1,8
8 °С	0,5±0,2	1–2	10–14	100±0,0	95,6±0,6	86,4±0,8	78,0±0,8	77,0±1,2
6 °С	0,4±0,1	1–2	10–12	100±0,0	96,3±0,4	88,2±0,5	79,5±1,3	78,2±0,9
<i>НІР₀₁</i>	0,1	–	–	0,4	1,1	0,9	1,3	1,2

*Примітка: показники подано в середньому за генотипами.

Найкращі результати отримано у варіанті досліду, де рослинний матеріал депонували за температури 6 °С. Такий температурний режим забезпечив середньомісячний приріст рослин

жита озимого на рівні 0,4 см. Незалежно від генотипу період інтенсивного росту фіксували впродовж перших 10–12 діб, що попередило закладання адвентивних бруньок (1–2 шт.).

Через 12 місяців безпересадочного депонування збереглося 78,2 % здорових рослин жита озимого.

Після десяти місяців зберігання спостерігали істотне зниження життєздатності клонів. А тому, використовуючи температуру зберігання активної колекції на рівні 6 °С, рекомендується оновлювати ростове живильне середовище через дванадцять місяців депонування.

З активної колекції за рік депонування в середньому за генотипами було вибракувано 21,8 % рослин (за причиною інфікування – 5,8 %; некроз рослин – 15,3 %; альбінізм – 0,7 %). Ця закономірність спостерігалась за культивування різних генотипів жита.

Встановлено, що сортова належність за депонування істотно не впливає на життєздатність матеріалу (рис. 1).

Необхідно відмітити і те, що після року депонування між генотипами в межах виду спостерігали незначну різницю в реакції рослинних організмів на низьку температуру зберігання за варіантами 6 °С та 8 °С. Ця температура за тривалого впливу забезпечувала проходження яровизації колекційних зразків жита. Зниження температури зберігання активної колекції нижче 6 °С не вивчали.

У процесі зберігання рослинного матеріалу проводили періодичний цитологічний аналіз окремих генотипів. Він підтвердив генетичну стабільність рослин активної колекції.

НІР₀₁=1,2

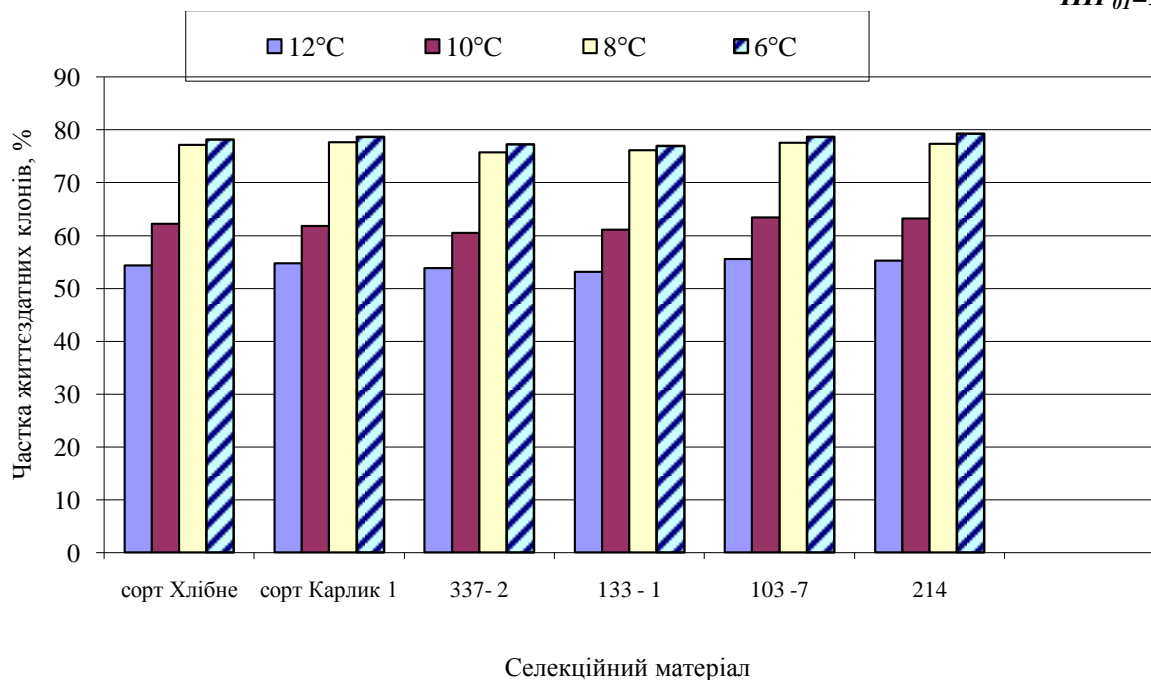


Рис. 1. Вплив генотипу та температурного режиму на стан активної колекції жита озимого (дванадцятий місяць депонування).

Інфікування рослинного матеріалу, як правило, відмічали у перші 20–30 діб культивування на живильному середовищі.

За введення до середовища підвищених концентрацій регуляторів росту, агар-агару та сахарози подовжується термін зберігання селекційного матеріалу без зміни субстрату в культурі *in vitro* [9].

Після перенесення зразків з культурального банку в оптимальні умови вирощування (температурний режим 20–22 °С, 16-годинний фотоперіод з інтенсивністю освітлення 3–4 клк, відносна вологість 75 %), спостерігалось інтенсивне наростання біоматеріалу, особливо у весняний період, за рахунок прискорення процесів метаболізму в клітинах. За місяць розвитку

на ростових середовищах рослини закладали до восьми адвентивних пагонів, а за перенесення на ризогенний субстрат формували корені.

Висновки. Визначено умови створення активної колекції рослин жита озимого за використання температурного обмеження. Розроблено послідовну технологічну схему переведення рослинного матеріалу в стан відносного анабіозу. Доведено, що оптимальною температурою для зберігання зразків є 6 °С. Виживання рослин за вказаного температурного режиму після 12 місяців депонування фіксували на рівні 78,2 %. Використання біотехнологічних методів для збереження і розмноження цінного вихідного матеріалу інтенсифікує селекційний процес отримання гетерозисних гібридів жита.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рябчун В.К. Проблеми та перспективи збереження генофонду рослин в Україні / В.К. Рябчун, Р.М. Богуславський. – Харків, 2002. – 38 с.
2. Рудишин С.Д. Основи біотехнології рослин / С.Д. Рудишин. – Вінниця, 1998. – 224 с.
3. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – С. 223–240.
4. Подвигина О.А. Сохранение селекционного материала в условиях *in vitro* / О.А. Подвигина // Энциклопедия рода Beta: биология, генетика и селекция свеклы; под ред. С.И. Малецкого. – Новосибирск, 2010. – С. 446–454.
5. Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В.И. Негрука; под ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1989. – 284 с.
6. Рябовол Л.О. Визначення оптимального температурного режиму та вуглеводного живлення при створенні в культурі *in vitro* банку рослинного матеріалу видів *Cichorium intybus* L. та *Beta vulgaris* L. / Л.О. Рябовол // Матеріали Міжнарод. наук. конф. «Сучасні проблеми виробництва і використання рослинного білка: глобальні зміни та ризики». – Вінниця, 2008. – С. 24–25.
7. Рябовол Я.С. Створення банку вихідного матеріалу жита озимого за використання біотехнологічних методів / Я.С. Рябовол, Л.О. Рябовол // Матеріали III Міжнародної наук.-практ. конф. «Актуальні питання сучасної аграрної науки». – Умань, 2015. – С. 102–103.
8. Гончаренко С.М. Довготривале культивування рослин стевії в умовах *in vitro* / С.М. Гончаренко, О.М. Сердюк // Цукрові буряки. – 2006. – Вип. 49. – № 1. – С. 18–19.
9. Рябовол Я.С. Умови формування активної колекції вихідних матеріалів жита озимого / Я.С. Рябовол, Л.О. Рябовол // 36. наук. праць Міжнародної наук.-практ. конференції «Селекція, насінництво, технології вирощування круп'яних та інших сільськогосподарських культур: досягнення і перспективи». – Кам'янець-Подільський, 2016. – С. 158–159.
10. Рябовол Л.О. Вплив складу живильного середовища на клонування рослин жита озимого в культурі *in vitro* / Л.О. Рябовол, Я.С. Рябовол // Матеріали Міжнародної наук.-практ. Інтернет-конференції «Проблеми і перспективи розвитку сучасної аграрної науки». – Миколаїв: Миколаївська ДСДС ІЗЗ, 2014. – С. 17–18.

REFERENCES

1. Ryabchun, V.K., Boguslavsky, R.M. (2002). Problemy ta perspektyvy zberezhenja genofondu roslyn v Ukraini [Problems and prospects of preservation of gene pool of plants in Ukraine]. Kharkiv, 38 p.
2. Rudisin, S.D. (1998). Osnovy biotekhnologii' roslyn [Fundamentals of plant biotechnology]. Vinnitsa, 224 p.
3. Melnichuk, N.D., Novak, T.V., Kunah, A.V. Biotekhnologija roslyn [Plant biotechnology]. Kyiv, Agrarmarketing, 2003, pp. 223–240.
4. Podvigina, O.A. Sohranenyte selekcyonnogo materyala v uslovyjah in vitro [Conservation of breeding material in vitro]. Jenciklopedija roda Beta: biologija, genetika i selekcija svekly [Encyclopedia of Beta: biology, genetics and breeding of sugar beet]. Novosibirsk, 2010, pp. 446–454.
5. Butenko, R.G. (1989). Biotekhnologija rastenij: kul'tura kletok [Plant biotechnology: cell culture]. Moscow, Agropromizdat, 284 p.
6. Riabovol, L.O. (2008). Vyznachennja optymal'nogo temperaturnogo rezhymu ta vuglevodnogo zhyvlennja pry stvorenni v kul'turi in vitro banku roslynnoho materialu vydiv *Cichorium intybus* L. ta *Beta vulgaris* L. [Determination of the optimal temperature and carbohydrate supply at the establishment of in vitro culture bank of plant material of the species *Cichorium intybus* L. and *Beta vulgaris* L.]. Materialy Mizhnarod. nauk. konf. «Suchasni problemy vyrobnyctva i vykorystannja roslynnoho bilka: global'ni zminy ta ryzyky» [Materials of the International. Sciences. Conf. "Modern problems of production and use of plant protein: global changes and risks"]. Vinnitsa, pp. 24–25.
7. Riabovol, I.S., Riabovol, L.O. (2015). Stvorennya banku vyhidnogo materialu zhyta ozymogo za vykorystannja biotekhnologichnyh metodiv [Creation of the bank of initial material of winter rye for the use of biotechnological methods]. Materialy III Mizhnarodnoi' nauk.-prakt. konf. «Aktual'ni pytannja suchasnoi' agrarnoi' nauky» [Proceedings of the III International scientific.-pract. Conf. "Topical issues of modern agricultural science"]. Uman, pp. 102–103.
8. Goncharenko, S.M., Serdyuk, E.M. Dovgotryvale kul'tyuvannja roslyn stevii' v umovah in vitro [A long period of

cultivation of stevia plants in vitro]. Cukrovi burjaky [Sugar beet]. 2006, Vol. 49, no. 1, pp. 18–19.

9. Riabovol, I.S., Riabovol, L.O. (2016). Umovy formuvannja aktivnoi kolekcii vyhidnyh materialiv zhyta ozymogo [The conditions of formation of the active collection source materials of winter rye]. Zb. nauk. prac' Mizhnarodnoi' nauk.-prakt. konferencii' «Selekcija, nasinnyctvo, tehnologii' vyroshhuvannja krup'janyh ta inshyh sil'skogospodars'kyh kul'tur: dosjagnennja i perspektyvy» [Col. of sciences. proceedings of the International scientific.-pract. conference "Breeding and seed production, technology of growing cereals and other crops: achievements and prospects"]. Kamenetz-Podolsk, pp. 158–159.

10. Riabovol, L.O., Riabovol, I.S. (2014). Vplyv skladu zhyvylnogo seredovyshha na klonuvannja roslyn zhyta ozymogo v kul'turi in vitro [Influence of nutrient medium composition on the cloning of plants of winter rye in vitro culture]. Materialy Mizhnarodnoi' nauk.-prak. Internet-konferencii' «Problemy i perspektyvy rozvytku suchasnoi' agrarnoi' nauky» [Materials of the International scientific.-practices. Internet-conference "Problems and prospects of development of modern agricultural science"]. Nikolaev, Nikolaev DSDS IZZ, pp. 17–18.

Определение температурного режима для формирования активной коллекции исходного селекционного материала ржи озимой

Я. С. Рябовол, Л. О. Рябовол

Создание генетического банка исходных форм и использование активной коллекции растительных материалов способствует оптимизации селекционного процесса перекрестноопыляющихся культур, в частности ржи озимой. Использование культуральной коллекции обеспечит сохранение и получение в определенный период доноров генов качественных хозяйственно ценных признаков в соответствующие селекционные схемы в течение длительного периода времени.

Самым простым фактором замедления роста при создании активной коллекции является снижение температуры депонирования клонированных образцов. В процессе исследований определены условия создания генетического банка растений ржи озимой при использовании температурного ограничения. Разработана последовательная технологическая схема перевода растительного материала в состояние относительного анабиоза. Доказано, что оптимальной температурой для хранения растений является 6 °С. Выживание образцов при указанном температурном режиме после 12 месяцев депонирования фиксировали на уровне 78,2 %.

Использование биотехнологических методов для сохранения и размножения ценного исходного материала поможет интенсифицировать селекционный процесс получения гетерозисных гибридов.

Ключевые слова: рожь озимая, донор, исходный материал, генетический банк, активная коллекция, питательная среда, температурный режим.

Determination of temperature mode for the creation of the active collection source of winter rye breeding material

Ja. Riabovol, L. Riabovol

The main issues in plant breeding are the search, selection and preservation of starting material productive sources. Biotechnological methods are efficient means of original forms preservation.

Starting materials genetic bank formation and the use of active plant collection contributes to optimization of cross pollination crops selection process, especially winter rye. Using crops collections provide preservation and obtaining donor genes of qualitative commercially valuable traits in relevant breeding schemes in a specified period for a long period of time.

Slowing down the metabolic processes in the crops body, setting conditions for intense growth suspension and of biological objects development provide formation of the active collection and its storage term extension.

The simplest factor slowing the growth down in the formation of active collection is the reduced temperature of cloned samples deposit.

The aim of our work was to determine the conditions of formation of genetic material bank for changing temperature conditions for long-term deposit of winter rye cloned crops and the use of active collection of original forms in heterosis breeding.

The study was conducted during the 2014-2016 in biotechnology laboratory of Uman National University of Horticulture. The varieties of Hlybne and Karlyk 1 and the created samples (337–2, 133–1, 103–7, 214) of winter rye were used as the cultural cloned crops. Nutrient medium composed of macro- and micronutrients was used for clones depositing according to prescription by Murasihe-Skuha medium. The nutrient substrate was modified with cytokinines and auksines. The clones were kept in the cultural areas under variants of temperature range (6–12 °C) and low light intensity (2 KLK).

The conditions of create a genetic bank of winter rye plants for the use of temperature limits were defined during the studies. The consistent technological scheme of transfer of plant material in a relative state of suspended animation was developed.

It was proved that the optimal temperature for storage plants is 6 °C. Such temperature conditions provided average monthly growth of plants of winter rye at 0.4 cm. Regardless of the genotype, intensive growth was recorded during the first 10-12 days, prevented laying of adventive buds. Samples survival at a specified temperature conditions 12 months after the deposit was fixed at 78.2 %.

It was found that the varietal identity for the deposit does not significantly affect the viability of the material.

Little difference between genotypes within the species in the crops organisms respond to storage temperature options for 6 and 8 °C was observed a year after depositing. This temperature ensured vernalization of the rye collection samples under prolonged exposure.

By combining thermal limiting and adding high concentrations of growth regulators, agar-agar and sucrose to the medium shelf life of breeding material without substrate change in the *in vitro* culture extended.

Cytological analysis of the cloned material confirmed the genetic stability of the active plant collection.

After transferring samples from the cultural bank into optimal growing conditions, there was intense growth of biomaterial by speeding up metabolism in plant cells.

Using biotechnological methods for breeding and conservation of valuable starting material contributes to intensification of the process of obtaining heterosis breeding hybrids of winter rye.

Key words: winter rye, donor, source material, gene bank, the active collection, nutrient medium, temperature mode.

Надійшла 21.04.2017 р.