



Я. С. Рябовол
кандидат с.-г. наук,
викладач кафедри рослинництва,
Уманський національний університет садівництва

УДК 631.527.581.143:633.14



Л. О. Рябовол
доктор с.-г. наук, професор
завідувач кафедри генетики,
селекції рослин та біотехнології,
Уманський національний університет садівництва

РЕГУЛЯТОРНА МОДИФІКАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ РИЗОГЕНЕЗУ РОСЛИН ЖИТА ОЗИМОГО В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Анотація. У селекційному процесі особлива увага приділяється вихідному матеріалу як джерелу нових господарсько-цінних ознак. Для пошуку та створення нових форм доцільно використовувати сучасні біотехнологічні методи. В статті викладено результати досліджень стимуляції умов індукції ризогенезу та укорінення рослин цінних зразків жита озимого в культурі *in vitro* за використання мікроклонування, як способу отримання генетично ідентичного матеріалу, під час розмноження самонесумісних форм культури.

Розроблено середовище для індукції розвитку кореневої системи рослин жита озимого. Визначено вплив екзогенних ауксинів і гіберелінів на укорінення біоматеріалу. Доведено, що концентрація 1,0 мг/л індолілоцтової кислоти та 0,5 мг/л гіберелінової кислоти у модифікованому живильному середовищі Мурасіге–Скуга є оптимальною для формування та інтенсивного наростання коренів біоматеріалу за мікроклонування розмноження рослин. При використанні цього середовища в середньому за повторностями 96,3 % зразків формувало розгалужену кореневу систему. Встановлено, що ризогенез клонованого матеріалу є генетично обумовленим чинником.

Ключові слова: жито озиме, генотип, ризогенез, живильне середовище, гіберелінова кислота.

Я. С. Рябовол

кандидат сельскохозяйственных наук,
преподаватель кафедры растениеводства,
Уманского национального университета садоводства

Л. О. Рябовол

доктор сельскохозяйственных наук, профессор
заведующий кафедрой генетики, селекции растений и биотехнологии, Уманский национальный университет садоводства

РЕГУЛЯТОРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ РИЗОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ РЖИ ОЗИМОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Аннотация. В селекционном процессе особое внимание уделяется исходному материалу как источнику новых хозяйственно-ценных признаков. Для поиска и создания новых форм целесообразно использовать современные биотехнологические методы. В статье изложены результаты исследований стимуляции условий индукции ризогенеза и укоренения растений ценных образцов ржи озимой в культуре *in vitro* при использовании микроклонирования, как способа получения генетически идентичного материала, при размножении самонесовместимых форм культуры.

Разработана среда для индукции развития корневой системы растений ржи озимой. Определено влияние экзогенных ауксинов и гиббереллинов на укоренение биоматериала. Доказано, что концентрация 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты и 0,5 мг/л гиббереллиновой кислоты в модифицированной питательной среде Мурасиге–Скуга является оптимальной для формирования и интенсивного нарастания корней биоматериала при микрокловальном размножении растений. Использование среды позволило в среднем за повторностями у 96,3 % образцов сформировать разветвленную корневую систему. Установлено, что ризогенез клонированного материала есть генетически обусловленным фактором.

Ключевые слова: рожь озимая, генотип, ризогенез, питательная среда, гиббереллиновая кислота.

I. S. Riabovol

PhD of Agricultural Sciences, Uman National University of Horticulture

L. O. Riabovol

Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the Department of Genetically, Selections of Plant and Biotechnological, Uman National University of Horticulture

REGULATORY MODIFICATION OF THE LIVING ENVIRONMENT FOR RISGENESIS OF PLANTS OF WINTER RYE IN CULTURE *IN VITRO*

Abstract. In the selection process, particular attention is pay to the source material as a source of new economic and valuable features. To find and create new forms it is expedient to use modern biotechnological methods. The article presents the results of studies of stimulation of the conditions of induction of rhizogenesis and plant rooting of valuable samples of winter rye in culture *in vitro* using microcloning as a method for obtaining a genetically identical material when multiplying self-compatible forms of culture.

An environment for inducing the development of the root system of winter rye plants was developed. The influence of exogenous auxins and gibberellins on rooting of biomaterial is determined. The concentration of 1.0 mg / L of indolyacetic acid and 0.5 mg / L of gibberellic acid in the modified nutritional medium Murassigu-Skooga is optimal for the formation and intensive growth of the roots of the biomaterial for microclonal propagation of plants has been shown. The average of 96.3% of samples formed a branched root system, when using the medium. The rhizogenesis of the cloned material is a genetically determined factor has

been established.

Key words: winter rye, genotype, rhizogenesis, nutrient medium, gibberellic acid.

Постановка проблеми. Основним біотехнологічним методом для розмноження та збереження генетично ідентичного матеріалу рослин є мікроклональне розмноження. Його застосування дає можливість створити активну колекцію цінних біоматеріалів, що особливо важливо для ведення селекції перехреснозапильних культур [1].

Одним із етапів мікроклонування є укорінення клонованих зразків у культурі *in vitro*.

З метою формування коренів, рослини переносять на живильне середовище для ризогенезу, зазвичай, змінюючи основний склад живильного середовища зменшенням у два–чотири рази концентрацію макро- і мікросолей, або замінюючи його середовищем Уайта, зменшуючи кількість сахарози до 0,5–1,0 % і повністю виключаючи цитокиніни та доповнюючи субстрат підвищеними концентраціями ауксинів. Препарати цієї групи регуляторів росту є основними для індукування коренеутворення [1–3].

Під впливом ауксинів (ІОК, НОК, ІМК) стимулюється поділ клітин паренхіми, що призводить до диференціації кореневих зачатків у базальній частині тканини експланту [4–6].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. На процес ризогенезу впливають не лише ауксини. У класичній роботі Ф. Скуга та К.О. Міллера [5] відзначається, що наявність чи відсутність регенерації залежить від вмісту та співвідношення ауксинів до цитокинінів у рослині. Стверджується [4], що відношення ендогенних ауксинів до цитокинінів відіграє важливу роль не тільки за дедиференціації та закладання меристематичних зон, але і при їх детермінації (розвиваються вони у стебловій бруньці чи корені). Для багатьох ізольованих рослинних тканин оптимальним для процесу коренеутворення є співвідношення ауксинів до цитокинінів як 4:1 або 5:1 [4, 7–9].

Аналізуючи дані літературних джерел, можна передбачити, що певне співвідношення «ауксин:цитокинін», яке сприяє процесу ризогенезу, мають і культуральні рослини жита озимого *in vitro*. Зміна цього співвідношення в той чи інший бік може викликати недиференційований поділ клітин і зумовлювати калюсоутворення.

Метою роботи була стимуляція умов індукції ризогенезу та укорінення рослин цінних зразків жита озимого в культурі *in vitro* за використання мікроклонування при розмноженні самонесумісних форм культури.

Методика досліджень. Дослідження проводили упродовж 2012–2016 рр. в лабораторії біотехнології Уманського національного університету садівництва.

Укорінювали клонований матеріал різних зразків жита озимого: сорти Хлібне, Сиріус, Карлик 1, Карлик 2; гібриди Первісток F1, ПР 1; створені зразки 3377/10 67, 3471/10 81, 133/14, 289/15, 302/15. В основу живильного субстрату входили макро- та мікроелементи за прописом середовища Мурасіге–Скуга. Модифікували середовища підвищеними концентраціями ауксинів. Вміст рідкоактивуючої речовини залежно від варіанту змінювався в межах 0,5–2,0 мг/л. Для інтенсифікації ризогенезу живильне середовище доповнювали 0,5–1,5 мг/л гіберелінової кислоти.

На укорінення висаджували рослинний матеріал початковою висотою 1,5–2,5 см. Кількість сформованих коренів та інтенсивність їх наростання визначали на 15-ту добу культивування.

Рослинний матеріал вирощували за 16-годинного фотоперіоду з інтенсивністю освітлення 3–4 клк, температурному режимі 22–24 °С та відносній вологості 75 %.

Основні результати досліджень. Щоб підвищити активність ризогенезу, додатково в живильне середовище для останнього розмноження додавали вищі концентрації гіберелінової кислоти і виключали цитокиніни. Це дозволило ще на ростовому середовищі отримати видовження

Таблиця 1
Вплив генотипу на ризогенез клонованих рослин жита озимого в ізольованій культурі

Селекційний матеріал	Кількість укорінених рослин, %	Формування калюсу в базальній частині клону, %	Кількість сформованих початкових коренів, шт.	Інтенсивність наростання кореневої системи, мм (15-та доба культивування)
Сорти				
Хлібне	97,3±1,0	0,0±0,0	4,8±0,5	18,8±1,0
Сиріус	96,7±0,6	0,0±0,0	4,3±0,2	18,2±0,7
Карлик 1	98,7±1,2	0,0±0,0	5,1±0,6	23,2±1,4
Карлик 2	98,0±0,9	0,0±0,0	4,7±0,8	20,2±1,2
У середньому	97,7±0,9	0,0±0,0	4,7±0,5	20,1±1,1
Гібриди				
Первісток F ₁	98,2±0,7	0,0±0,0	6,4±0,2	25,8±1,0
ПР 1	98,8±0,6	0,7±0,1	6,0±0,9	27,2±1,4
У середньому	98,5±0,7	0,4±0,1	6,2±0,6	26,5±1,2
Лінії				
3377/10 67	94,6±2,0	0,5±0,2	3,0±0,7	18,4±0,5
3471/10 81	91,7±1,1	0,4±0,1	3,5±0,4	17,2±0,7
133/14	95,6±2,2	0,0±0,0	3,8±0,6	20,3±1,5
289/15	90,5±1,7	0,0±0,0	4,6±0,9	17,0±1,3
302/15	91,8±1,3	0,0±0,0	4,0±0,7	16,8±0,9
У середньому	92,8±1,7	0,2±0,1	3,8±0,7	17,9±1,0
У середньому за генотипами	96,3±1,1	0,2±0,1	4,9±0,6	21,5±1,1

*Примітка. У кожній повторності на укорінення висаджували 50 рослин.

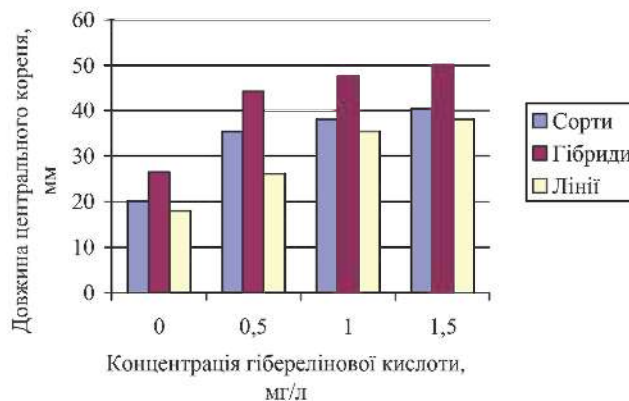
НІР₀₁=1,1

Рис. 1. Вплив гіберелінової кислоти на ріст коренів жита озимого в ізолюваній культурі

міжвузлів та формування ризоїдів у базальній частині рослини. Проте повне виключення цитокиніну уповільнило ріст листового апарату рослин. Тому для підвищення інтенсивності наростання біомаси до живильного середовища додавали 0,3 мг/л 6-бензиламінопурину.

У процесі проведених досліджень встановлено, що для укорінення клонованого рослинного матеріалу жита озимого доцільно використовувати розроблене модифіковане середовище Мурасіге–Скуга з додаванням до його складу 0,3 мг/л 6-бензиламінопурину та 1,0 мг/л індолілоцтової кислоти [10].

За використання цього субстрату в середньому за повторностями 96,3 % рослин формувало розгалужену кореневу систему.

Формування коренів та інтенсивність ризогенезу залежали від генотипу клонованих рослин (табл.).

Найбільшу частку укорінених рослин отримано у гібридів (98,5±0,7 %), дещо нижчу – у сортів (97,7±0,9 %). Найменшу частку укоріненого матеріалу отримано у створених ліній (92,8±1,7 %). Необхідно також зазначити, що у гібридів в ізолюваній культурі формувалась найбільша кількість первинних коренів (6,2±0,6 шт.) з інтенсивністю наростання в середньому за повторностями 26,5±1,2 мм на 15-ту добу вкорінення.

Для інтенсифікації ризогенезу клонованих рослин жита озимого живильне середовище доповнювали підвищеними концентраціями гіберелінової кислоти.

За даними вчених [11] існує тісний взаємозв'язок між гіберелінами і ауксинами за їх впливом на розтягання клітинної стінки, осмотичний тиск клітинного соку, що покращує пластичність клітинної мембрани, стимулюється біосинтез компонентів клітинної стінки. Використовуючи екзогенні гібереліни і ауксини у певних концентраціях та співвідношеннях у культуральних умовах вирощування, можна підвищити інтенсивність укорінення рослин.

Введення до живильного середовища гіберелінової кислоти у концентрації 0,5 мг/л інтенсифікувало коренеформування та галуження коренів рослинного матеріалу жита озимого (рис.). Це сприяло швидкому наростанню кореневої системи всіх зразків, довжина яких на 15-ту добу сягала 26,7±0,4–44,2±0,7 мм.

Підвищення вмісту гіберелінової кислоти до 1,0–1,5 мг/л забезпечило подовження коренів, проте спостерігалось витягування листків та міжвузлів і зниження інтенсивності кущення клонованих рослин.

Висновки. Розроблено середовище для індукції розвитку кореневої системи рослин жита озимого в культурі *in vitro*. Доведено, що концентрація 1,0 мг/л індолілоцтової кислоти та 0,5 мг/л гіберелінової кислоти у модифікованому живильному середовищі Мурасіге–Скуга є оптимальною для формування та інтенсивного наростання коренів біоматеріалу за мікроклонального розмно-

ження рослин культури. Встановлено, що ризогенез клонованого матеріалу є генетично обумовленим чинником.

Література

1. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микроклонального размножения растений. Киев: Наук. думка. 1992. 232 с.
2. Подвигина О. А., Знаменская В. В., Фролова В. В. Индукция ризогенеза у сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Материали VI Междунар. конф. «Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии». Москва, 2001. С. 160.
3. Рябовол Л. О. Клональное микроразмножение растений. Методичні рекомендації для проведення лабораторно-практичних занять з «Біотехнології рослин». Умань: УДАА, 2016. 16 с.
4. Гамбург К. З., Леонова Л. А., Рекославская Н. И. Метаболизм ауксин и рост культур растительных тканей. Культура клеток растений. Киев: Наукова думка, 1978. С. 47–52.
5. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and orgai formation in plants tissues cultures *in vitro*. 11-th. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. V. 11. P. 118–131.
6. Бутенко Р. Г. Культура клеток растений и биотехнология. Москва: Наука, 1986. 236 с.
7. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 487 с.
8. Рябовол Л. О., Парій Ф. М., Рябовол Я. С., Любченко А. І. Укорінення рослин жита озимого в культурі *in vitro*. Зб. наук. праць УНУС. Умань, 2011. Вип. № 76. С. 75–80.
9. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин, В. М. Ковалев, А. А. Ковалев. Москва: Высшая школа, 2003. С. 106–132.
10. Рябовол Я. С., Парій Ф. М., Рябовол Л. О. Генетичні основи створення батьківських компонентів гібридів жита озимого: монографія. Умань: «Візаві», 2017. 188 с.
11. Barfield G. D., Robinson S. I., Shields R. O. Plant regeneration from protoplasts of long term haploid suspension culture of *N. plunibagimfo*. Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 104–107.

Reference

1. Kalinin F. L., Kushnir G. P., Sarnatskaya V. V. Technology of microclonal propagation of plants. Kiev: Scientific. opinion. 1992. 232 p.
2. Podvignina O. A., Znamenskaya V. V., Frolova V. V. Induction of rhizogenesis in sugar beet in culture *in vitro*. Materials of VI International. conf. "Regulators of plant growth and development in biotechnology". Moscow, 2001. P. 160.
3. Riabovol L.O. Clonal microgravity of plants. Methodical recommendations for conducting laboratory and practical classes on "Plant Biotechnology". Uman: USAA, 2016. 16 p.
4. Hamburg K. S., Leonova L. A., Rekolskaya N. I. Metabolism auxin and Growth of Plant Plant Cultures. Culture of plant cells. Kiev: Scientific Opinion, 1978. P. 47–52.
5. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and orgai formation in plants tissues cultures *in vitro*. 11-th. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. V. 11. P. 118–131.
6. Butenko R. G. Plant Culture Culture and Biotechnology. Moscow: Nauka, 1986. 236 p.
7. Kalinin F. L., Sarnatskaya V. V., Polischuk V. E. Methods of tissue culture in physiology and biochemistry of plants. K.: Nauk. dumka, 1980. 487 pp.
8. Riabovol L. O., Pariy F. M., Riabovol I. S., Liubchenko A. I. Rooting of winter rye plants *in vitro* culture. Prob. sciences works UNUS. Uman, 2011. Vip. № 76. P. 75–80.
9. Agricultural Biotechnology / V. S. Shevelukha, E. A. Kalashnikova, E. S. Voronin, V. M. Kovalev, A. A. Kovalev. Moscow: Higher school, 2003. P. 106–132.
10. Riabovol I. S., Pariy F. M., Riabovol L. O. Genetic bases for the creation of parent components of hybrids of winter rye. : monograph. Uman: "Visavi", 2017. 188 p.
11. Barfield G. D., Robinson S. I., Shields R. O. Plant regeneration from protoplasts of long term haploid suspension culture of *N. plunibagimfo*. Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 104–107.