
ЗЕМЛЕРОБСТВО, РОСЛИННИЦТВО, ОВОЧІВНИЦТВО ТА БАШТАННИЦТВО

ЗЕМЛЕДЕЛИЕ, РАСТЕНИЕВОДСТВО, ОВОЩЕВОДСТВО И БАХЧЕВОДСТВО
AGRICULTURE, CROP PRODUCTION, VEGETABLE AND MELON GROWING

УДК 633.522:[57.085.2+581.14]

ЕФЕКТИВНІСТЬ РОЗМНОЖЕННЯ *CANNABIS SATIVA* L. З НАСІННЯ З НИЗЬКОЮ СХОЖІСТЮ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЮ В УМОВАХ *IN VITRO*

Мищенко С.В. – к.с.-г.н., старший науковий співробітник,
Інститут луб'яних культур Національної академії аграрних наук України

При зберіганні у звичайних умовах складських чи лабораторних приміщень насіння конопель (*Cannabis sativa* L.) здатне до проростання не більше 3–4 років. У результаті гібридизації утворюється досить невелика кількість гібридного насіння. У самоzapилених ліній конопель більш пізніх генерацій (починаючи з I₅–I₆) проявляється явище інбредної депресії генеративних органів, тому насіння характеризується низькою схожістю та життєздатністю. Для отримання і збереження цінних генотипів конопель із насіння, що має низьку схожість та життєздатність, розроблений спосіб розмноження в умовах культури *in vitro*. Виявлено, що додавання до середовища Мурасиге і Скуга 0,4 мг/л гібереллової кислоти і 4 мг/л бурштинової кислоти підвищує схожість насіння на 7,5–24%.

Ключові слова: конопля, насіння, схожість, розмноження, *in vitro*.

Мищенко С.В. Эффективность размножения *Cannabis sativa* L. с семян с низкой всхожестью и жизнеспособностью в условиях *in vitro*

При хранении в обычных условиях складских или лабораторных помещений семена конопля (*Cannabis sativa* L.) способны к прорастанию не более 3–4 лет. В результате гибридизации образуется достаточно небольшое количество гибридных семян. В самоопыленных линиях конопля более поздних поколений (начиная с I₅–I₆) проявляется явление инбредной депрессии генеративных органов, поэтому семена характеризуется низкой всхожестью и жизнеспособностью. Для получения и сохранения ценных генотипов конопля из семян, которые имеют низкую всхожесть и жизнеспособность, разработанный способ размножения в условиях культуры *in vitro*. Виявлено, что добавление к среде Мурасиге и Скуга 0,4 мг/л гибберелловой кислоты и 4 мг/л янтарной кислоты повышает всхожесть семян на 7,5–24%.

Ключевые слова: конопля, семена, всхожесть, размножение, *in vitro*.

Mischenko S.V. Effectiveness reproduction of *Cannabis sativa* L. from seeds with low germination and viability in vitro conditions

Hemp seed (Cannabis sativa L.) is capable of germination no more than 3–4 years when it stored under normal conditions of the warehouse or laboratory. A small number of hybrid seeds is formed as a result of hybridization. The phenomenon of inbred depression of the generative organs is in the self-pollinated hemp lines of later generations (starting with I₅–I₆), that is why seeds are characterized by low seed germination and viability. To obtain and preserve valuable genotypes of hemp from seeds with low germination and viability, the method of reproduction in vitro culture conditions was developed by us. It was found that the addition of 0.4 mg/l gibberellic acid and 4.0 mg/L succinic acid to the Murashige and Skoog culture medium increases seed germination by 7.5–24%.

Key words: hemp, seeds, germination, reproduction, in vitro.

Постановка проблеми. При зберіганні у звичайних умовах складських чи лабораторних приміщень насіння конопель (*Cannabis sativa* L.) здатне до проростання не більше 3–4 років. Інколи в результаті схрещувань утворюється досить невелика кількість гібридного насіння. У самозапилених ліній конопель більш пізніх генерацій (починаючи з I₅–I₆) проявляється явище інбредної депресії генеративних органів, тому насіння характеризується низькою життєздатністю [1; 2], а значні межі варіювання енергії проростання і схожості (розмах варіації від 1 до 68) дають підстави стверджувати ще й про генотипову залежність цих ознак [3]. У зазначених випадках таке насіння не може достатньою мірою забезпечити відтворення та розмноження селекційного матеріалу, що може призвести до його втрати. Крім того, з однієї пророслої насінини в ґрунті отримують лише одну рослину. Таким чином, актуальним є розроблення способу розмноження рослин конопель із насіння з низькою схожістю та життєздатністю в умовах *in vitro* для збереження цінних генотипів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Відомим є спосіб розмноження рослин міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю [4], який включає використання як експлантів насіння міскантусу, застосування гіпохлориту натрію (NaOCl) для стерилізації насіння, висаджування насіння на агаризоване живильне середовище з макро- і мікроелементами та додаванням регуляторів росту у певних концентраціях, отримання калусів у культурі *in vitro*, культивування калусів та регенерацію з них мікророслин. Також відомим є спосіб відновлення схожості насіння перцю [5], в основу якого покладено пророщування насіння в умовах *in vitro* на середовищі Мурасіге і Скуга, модифікованому гіберелловою кислотою (ГК₃) (0,1 мг/л) і кінетином (3 мг/л) та на середовищі Мурасіге і Скуга, модифікованому бурштиною кислотою (БК) (3 мг/л). Установлено, що культивування на живильних середовищах дозволяє вивести зі стану органічного спокою від 5 до 100% насінин дикорослих видів томата, які зберігалися у неконтрольованих умовах протягом тривалого часу (до 15 років) [6, 7].

Постановка завдання. Мета і завдання дослідження – розробити спосіб розмноження конопель із низькою схожістю та життєздатністю насіння в умовах *in vitro* та підвищити коефіцієнт розмноження шляхом висаджування насіння на живильне агаризоване середовище певного складу з подальшим мікроклональним розмноженням отриманих пагонів.

За основу взяті середовище Мурасіге і Скуга (MS) [8], Гамборга і Евелєга [9], які доповнювали фітогормонами та регуляторами росту у різних поєднаннях і концентраціях. Насіння пророщували у 2017 р., використовували сорти Гляна і

Глесія урожаю 2014–2016 р. і самозапилені лінії I₆ Гляна та I₆ Глесія урожаю 2013 р.

Виклад основного матеріалу дослідження. Розроблений спосіб розмноження рослин конопель із насіння з низькою схожістю та життєздатністю [10] включає використання як експлантів насіння, застосування гіпохлориту натрію для його стерилізації, висаджування насіння на агаризоване живильне середовище Мурасіге і Скуга, мікроклональне розмноження утворених пагонів *in vitro*.

Для запобігання ушкодження зародка насінини і слабких проростків конопель для стерилізації насіння застосовують водний розчин гіпохлориту натрію у зниженій концентрації до 1,5% з експозицією 12,5 хв., у подальшому промиваючи тричі у стерильній дистильованій воді, що запобігає ушкодженню зародка насінини, слабких проростків конопель та появі видимих мутацій. За таких умов вихід стерильних експлантів становить 93–100%.

Простерилізоване насіння висаджують на живильне середовище Мурасіге і Скуга з макро– і мікроелементами у повній дозі, до складу якого входить 5 мг/л тіаміну, 1 мг/л піридоксину, 5 мг/л аскорбінової кислоти, 0,4 мг/л гіберелової кислоти, 4 мг/л бурштинової кислоти, 15 г/л сахарози і яке не містить нікотинової кислоти, культивують 3–4 доби при температурі 20–22°C і надалі при температурі 24–26°C, фотоперіоді 16 год. і порівняній вологості повітря 60–80% (табл. 1).

Таблиця 1

Схожість різних зразків конопель залежно від умов пророщування

Варіант	Схожість насіння залежно від року урожаю, %							
	Гляна			Глесія			I ₆ Гля- на	I ₆ Гле- сія
	2014 р.	2015 р.	2016 р.	2014 р.	2015 р.	2016 р.	2013 р.	2013 р.
Лабораторна схожість	36,25	72,50	83,75	41,25	80,00	87,50	0,00	3,75
MS безгормональне	36,25	73,75	85,00	42,50	81,25	88,75	1,25	5,00
MS + ГК ₃ 0,2 мг/л, кінетин 0,2 мг/л	40,00	76,25	95,00	50,00	90,00	96,75	6,25	7,50
MS + ГК ₃ 0,2 мг/л, БК 3,0 мг/л	40,00	80,00	95,00	50,00	90,00	97,50	5,00	8,75
MS + БК 3,0 мг/л	35,00	80,00	93,75	47,50	90,00	95,00	5,00	6,25
MS + ГК ₃ 0,4 мг/л, кінетин 0,4 мг/л	48,75	86,25	97,50	55,00	93,75	98,75	6,25	10,00
MS + ГК ₃ 0,4 мг/л, БК 4,0 мг/л	50,00	87,50	98,75	65,00	95,00	100,00	7,50	10,00
MS + БК 4,0 мг/л	47,50	86,25	97,50	51,25	93,75	97,50	5,00	8,75
MS + ГК ₃ 0,1 мг/л, кінетин 0,1 мг/л	36,25	73,75	83,75	45,00	86,25	92,50	2,50	7,50
MS + ГК ₃ 0,1 мг/л, БК 2,0 мг/л	36,25	72,50	85,00	42,50	85,00	95,00	2,50	6,25
MS + БК 2,0 мг/л	35,00	75,00	85,00	46,25	87,50	91,25	2,50	7,50
MS + кінетин 0,2 мг/л, БК 3,0 мг/л	41,25	76,25	92,50	50,00	85,00	91,25	5,00	8,75
MS + ИОК 0,6 мг/л, БК 3,0 мг/л	37,50	75,00	85,00	38,45	81,25	90,00	3,75	8,75

Вітамінний склад забезпечує оптимізацію біохімічних процесів у пагоні конопель. Підвищена концентрація аскорбінової кислоти до 5 мг/л, яка є антиоксидантом, попереджує утворення фенольних сполук, які спричиняють пригнічення росту і розвитку або ж ведуть до загибелі експлантів. При цьому коноплі характеризуються природною здатністю до накопичення фенолів (канабіноїдів). Аскорбінова кислота зменшує окиснення канабідіолової, тетрагідроканабінолової і канабінолової кислот до відповідних сполук – канабідіолу, тетрагідроканабінолу і канабінолу. Гібберелова та бурштинова кислота саме у концентраціях 0,4 мг/л і 4 мг/л відповідно стимулюють поділ клітин у зародку насінини, ріст сім'ядоль, зародкових стебельця і корінця при одночасній збереженості генетичної автентичності зразка, що встановлено експериментально, дають змогу призупиняти дію накопиченого в тканинах зиготичних зародків насінини в процесі зберігання природного інгібітора росту – абсцизової кислоти. Таким чином, зазначені регулятори росту впливають на регуляторні механізми, пов'язані з порушенням органічного спокою зрілих зародків конопель. Змінна температура культивування підвищує інтенсивність ростових процесів. Вищезазначені умови дають змогу отримати на 7,5–24% більше проростків порівняно з лабораторною схожістю. Порівняно з лабораторною і польовою схожістю на модифікованому середовищі значно зростає схожість насіння (рис. 1).

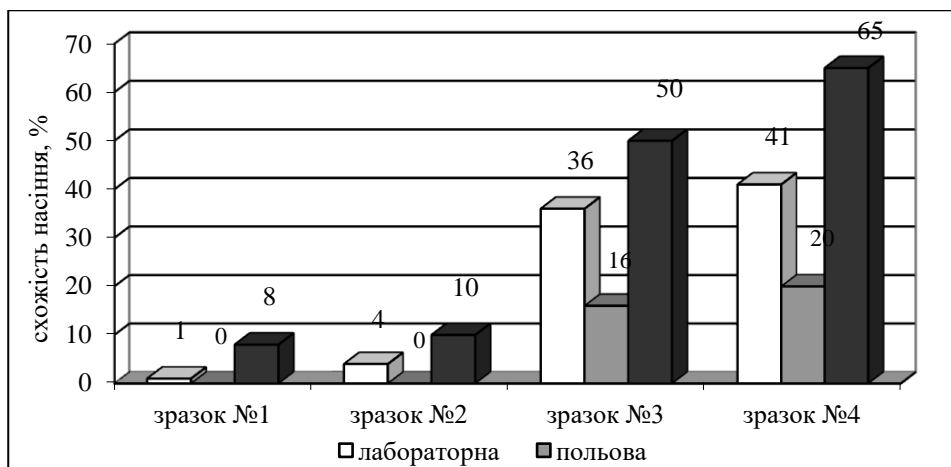


Рис. 1. Схожість різних зразків конопель залежно від умов пророщування: лабораторних, польових, *in vitro* за пропонуванним способом

Після того, як пагони досягнуть 10–12,5 см, проводять мікроклональне розмноження. Бічні бруньки (або живці з латеральними меристемами) пересаджують на безгормональне живильне середовище Гамборга і Евелєга, до складу якого входить 5,0 мг/л тіаміну, 1,0 мг/л піридоксину, 5,0 мг/л аскорбінової кислоти, 15,0 г/л сахарози. Роблять щонайменше 2 пасажі. Певна кількість живців коренів не утворюють (приблизно 22,3%). Для мікроклонального розмноження утворених пагонів без коренів (вони, як правило, відстають у рості) використовують середовище Гамборга і Евелєга, до складу якого входить 5,0 мг/л тіаміну, 1,0 мг/л

піридоксину, 5,0 мг/л аскорбінової кислоти, 1,5 мг/л індол-3-оцтової кислоти, 15,0 г/л сахарози. Додавання індол-3-оцтової кислоти у концентрації 1,5 мг/л до живильного середовища для мікроклонального розмноження утворених пагонів без коренів сприяє активному ризогенезу.

Мікроклональне розмноження (рис. 2) отриманих у результаті дії екзогенних регуляторів росту пагонів на живильному середовищі Гамборга і Евелєга за наявності вітамінного комплексу дає змогу отримувати з 1-го пагона в середньому 5 мікроклонів, причому включення у середовище 0,4 мг/л гіберелової і 4,0 мг/л бурштинової кислоти сприяє у деяких випадках на достовірному рівні збільшенню висоти рослин і кількості міжвузлів (табл. 2) без зміни генетичної автентичності, що підтверджено випробуванням у польових умовах.

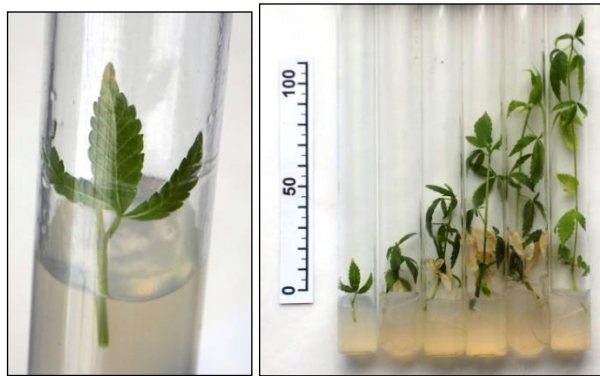


Рисунок 2. Ріст мікроклонів конопель *in vitro*

Таблиця 2

Мінливість ознак висоти рослин і кількості міжвузлів у мікроклонів залежно від умов культивування (сорт Гляна – чисельник, сорт Глесія – знаменник)

Варіант	Ознаки			
	висота рослин ($\bar{x} \pm s\bar{x}$), см		кількість міжвузлів ($\bar{x} \pm s\bar{x}$), шт.	
	через 30 діб	через 45 діб	через 30 діб	через 45 діб
із ризогенезом				
MS безгормональне	$8,82 \pm 0,743$	$9,88 \pm 0,772$	$5,6 \pm 0,28$	$6,0 \pm 0,33$
	$8,78 \pm 0,538$	$12,67 \pm 0,624$	$4,7 \pm 0,22$	$5,8 \pm 0,32$
MS + ГК ₃ 0,4 мг/л, БК 4,0 мг/л	$9,44 \pm 0,668$	$12,50 \pm 0,617$	$4,5 \pm 0,26$	$6,3 \pm 0,25$
	$9,87 \pm 0,615$	$13,11 \pm 0,703$	$5,6 \pm 0,32$	$7,5 \pm 0,38$
t_{ϕ}	$0,62$	$2,65$	$2,88$	$0,72$
	1,33	0,47	2,32	3,42
без ризогенезу				
MS безгормональне	$3,83 \pm 0,426$	$4,51 \pm 0,493$	$3,2 \pm 0,29$	$3,3 \pm 0,35$
	$3,22 \pm 0,306$	$5,61 \pm 0,657$	$2,2 \pm 0,21$	$3,2 \pm 0,26$
MS + ГК ₃ 0,4 мг/л, БК 4,0 мг/л	$4,85 \pm 0,406$	$6,46 \pm 0,596$	$3,5 \pm 0,25$	$4,6 \pm 0,28$
	$4,14 \pm 0,564$	$4,30 \pm 0,687$	$3,4 \pm 0,39$	$3,5 \pm 0,55$
t_{ϕ}	$1,73$	$2,52$	$0,78$	$2,90$
	1,43	1,38	2,71	0,49

$$t_{0,05} = 2,00, t_{0,01} = 2,66, t_{0,001} = 3,46.$$

Висновки і пропозиції. Запропонований спосіб забезпечує отримання і збереження *in vitro* цінного селекційного матеріалу конопель із насіння з низькою схожістю та життєздатністю, високий коефіцієнт їх розмноження, що прискорює селекційний процес і може бути використаний на практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Степанов Г.С. Метод індухту в селекції конопель. *Вісник сільськогосподарської науки*. 1975. № 5. С. 58–61.
2. Міщенко С.В. Прояв репродуктивної депресії у самоzapилених ліній *Cannabis sativa* L. в онтогенезі. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Агронія і біологія»*. 2014. Вип. 3 (27). С. 205–208.
3. Міщенко С.В. Залежність схожості насіння самоzapилених ліній конопель від покоління і тривалості зберігання. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2013. № 2. С. 36–39.
4. Спосіб розмноження рослин міскантусу з низькою схожістю та життєздатністю: пат. 97957 UA, № u 2014 12015; заявл. 06.11.2014; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 7.
5. Івченко Т.В. Наукове обґрунтування ефективності методів біотехнології в селекції та насінництві овочевих рослин родин *Solanaceae* Gals., *Alliaceae* L., *Asteraceae* Dumort., *Apiaceae* Lindl., *Cucurbitaceae* Juss.: автореф. дис. ... докт. с.-г. наук. Харків, 2016. С. 11.
6. Мірошниченко Т.М. Вихідний матеріал для селекції томата, створений з використанням культури клітин і тканин *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. Харків, 2016. С. 11.
7. Збереження насіння пасльонових культур у стані життєздатності та генетичної автентичності: методичні рекомендації / Шабета О.М., Івченко Т.В., Кондратенко С.І. та ін. Харків, 2014. 24 с.
8. Murashige T., Skoog F. A. A revised medium for growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962. V. 15 (3). P. 473–497.
9. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968. V. 46 (5). P. 417–421.
10. Спосіб розмноження рослин конопель з насіння з низькою схожістю та життєздатністю: пат. 120489 UA, № u 2017 02849; заявл. 27.03.2017; опубл. 10.11.2017, Бюл. № 21.