

УДК 633.522:[631.4+581.1]

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2022.128.47>

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕСТУВАННЯ СТІЙКОСТІ КОНОПЕЛЬ ДО СОЛЬОВОГО СТРЕСУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Мищенко С.В. – д.с.-г.н., с.н.с.,

головний науковий співробітник відділу селекції та насінництва конопель,
Інститут луб'яних культур Національної академії аграрних наук України

Лайко І.М. – д.с.-г.н., с.н.с.,

завідувачка відділу селекції та насінництва конопель,
Інститут луб'яних культур Національної академії аграрних наук України

Марченко Т.Ю. – д.с.-г.н., с.н.с.,

завідувачка відділу селекції сільськогосподарських культур,
Інститут кліматично орієнтованого сільського господарства
Національної академії аграрних наук України

Мачульський Г.М. – к.с.-г.н., доцент,

доцент кафедри географії,
Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка

Успішне забезпечення світової продовольчої безпеки залежить від інтенсифікації аграрного виробництва, підвищення продуктивності сільськогосподарських культур та використання земель, які до цього часу вважались малопридатними для рослинництва, зокрема засолених. Сольовий стрес є одним з найсерйозніших абіотичних стресів, який впливає на ріст і розвиток рослин. Стійкість рослин до несприятливих факторів середовища є генетично детермінованою і проявляється на різних рівнях організації життя, зокрема на клітинному та тканинному. Це дає можливість для використання біотехнологічних методів з метою виділення стійких генотипів при зменшенні матеріальних витрат за порівняно короткий період. У даній статті проведено біоінформаційний аналіз методів (прийомів) тестування солетолерантності сільськогосподарських культур загалом і конопель посівних (*Cannabis sativa* L.) зокрема та здійснено обґрунтування можливостей такого тестування, штучно змодельованого в культурі *in vitro*. У розробленому способі добору *in vitro* толерантних до сольового стресу генотипів конопель, який включає культивування експлантів в умовах дії стресового чинника, спрямованого проти нормального розвитку і виживання нестійких форм, добір окремих генотипів проводять на рівні регенерованих з калюсів сомаклонів з додаванням до живильного середовища залежно від типу засолення 0,25% NaCl або 0,75% MgCl₂ · 6H₂O за хлоридного засолення, 0,5% MgSO₄ · 7H₂O або 1,0% Na₂SO₄ за сульфатного засолення, 0,15% Na₂CO₃ або 0,30% NaHCO₃ за карбонатного засолення. Саме такі концентрації сполук є селективними й виявляють сублетальний та летальний ефект та дають змогу провести добір солетолерантних генотипів конопель. Використання нового способу дозволяє отримувати толерантний (стійкий) до сольового стресу вихідний матеріал конопель і прискорювати селекційний процес.

Ключові слова: ґрунт, абіотичні фактори, сольовий стрес, ріст і розвиток рослин, *in vitro*, коноплі, спосіб.

Mishchenko S.V., Laiko I.M., Marchenko T.Yu. Machulsky H.M. Theoretical aspects of testing hemp resistance to salt stress in *in vitro* culture

The successful provision of global food security depends on the intensification of agricultural production, increasing the productivity of agricultural crops and the use of land that until now was considered unsuitable for crop production, in particular, saline land. Salt stress is one of the most serious abiotic stresses that affects plant growth and development. The resistance of plants to adverse environmental factors is genetically determined and manifests itself at various levels of life organization, in particular at the cellular and tissue levels. This makes it possible to use biotechnological methods for the purpose of selecting resistant genotypes while reducing material costs in a relatively short period. In this article, a bioinformatic analysis of methods

*(techniques) for testing salt tolerance of agricultural crops in general and industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) in particular is carried out. A theoretical substantiation of the possibilities of such testing, artificially simulated in an in vitro culture, was carried out. In the developed method of in vitro selection of hemp genotypes tolerant to salt stress, which includes the cultivation of explants under the influence of a stress factor directed against the normal development and survival of unstable forms, the selection of individual genotypes is carried out at the level of somatic clones regenerated from the callus with addition to the nutrient medium depending on the type salting 0.25% NaCl or 0.75% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ for chloride salting, 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ or 1.0% Na_2SO_4 for sulfate salting, 0.15% Na_2CO_3 or 0.30% $NaHCO_3$ for carbonate salting. Such concentrations of compounds are selective and show a sublethal and lethal effect and make it possible to select salt-tolerant hemp genotypes. Application of the new method makes it possible to obtain tolerant (resistant) to salt stress starting material of hemp and speed up the selection process.*

Key words: soil, abiotic factors, salt stress, plant growth and development, in vitro, hemp, method.

Постановка проблеми. В умовах зростання народонаселення найважливішою проблемою людства є забезпечення продуктами харчування, ось чому в майбутньому попит на продукцію агропромислового виробництва непинно зростатиме. Означена проблема лише посилюється на фоні збільшення дефіциту води та земельних ресурсів. Успішне її вирішення залежить від інтенсифікації аграрного виробництва, підвищення продуктивності сільськогосподарських культур та використання земель, які до цього часу вважались малопродатними для рослинництва, зокрема засолених. Слід пам'ятати, що сольовий стрес є одним з найсерйозніших абіотичних стресів, який впливає на ріст і розвиток рослин.

Засолення ґрунту в багатьох випадках призводить до токсичних ефектів у рослин, негативно впливаючи на встановлення рослинним організмом адекватного балансу поживних речовин, тому існує чіткий негативний зв'язок між рівнем виробництва сільськогосподарської продукції та рівнем засоленням ґрунтів; продуктивність може бути потенційно збільшена за рахунок використання культур, що є стійкими до впливу надмірних концентрацій солей, однак цьому має передувати дослідження фізіологічних та молекулярних механізмів сольового стресу [1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Засоленість ґрунтів залежно від природи засолення поділяють на первинну та вторинну: перша виникає у результаті природного накопичення солей впродовж тривалого часу (наприклад, морської солі, принесеної вітром чи водою, вивільнення солей за ерозії гірських порід), а друга виникає внаслідок діяльності людини (наприклад, штучного зрошення) [1].

Зазвичай вважають, що токсичними для рослин є вміст у ґрунті хлоридів вищий за 1%, сульфатів – за 2%, карбонатів – за 0,6%. Засоленість вважають відсутньою, якщо вміст відповідних солей у сухому залишку не перевищує 0,15% (хлоридно-карбонатний, сульфатно-карбонатний, карбонатно-хлоридний і карбонатно-сульфатний), 0,20% (сульфатно-хлоридний), 0,25% (хлоридно-сульфатний), 0,15% (хлоридний) чи 0,30% (сульфатний тип засолення). З рештою засоленість поділяють на слабку, середню, сильну та у крайньому разі ґрунти відносять до солончаків [2]. Наприклад, карбонати та деякі інші солі погіршують властивості ґрунту, його структуру та щільність, оскільки зменшується здатність колоїдів до коагуляції. Найтоксичнішим для сільськогосподарських рослин є натрій карбонат (Na_2CO_3), за вмісту більше 0,6% він робить ґрунт повністю неродючим, а за вмісту близько 0,1% – пригнічує рослини [2]. Водорозчинні солі підвищують осмотичний потенціал ґрунтового розчину, внаслідок чого й погіршується водопостачання рослин через недостатню всмоктувальну силу корневих волосків. У результаті

знижується інтенсивність транспірації, фотосинтезу і мінерального живлення. Все це призводить до пригнічення, або й загибелі рослин [3]. Сольовий стрес підвищує внутрішньоклітинний осмотичний тиск і може призвести до накопичення Cl^- й особливо Na^+ до токсичного рівня, таким чином, сольовий стрес викликає іонний стрес. Сольовий стрес також негативно впливає на мінеральний гомеостаз ряду поживних мікроелементів, а саме Ca^{2+} та K^+ [1, 4].

Рослини активно уповільнюють швидкість росту у відповідь на сольовий стрес (наприклад, через зниження ефективності фотосинтезу), що призводить до збільшення виживання. Рослини ведуть прикріплений спосіб існування і тому повинні розробити відповідні фізіологічні механізми для пристосування до середовища з високим вмістом солі [4]. У відповідь на сигнали сольового стресу рослини адаптуються за допомогою регуляції іонного гомеостазу, активації шляху осмотичного стресу, опосередкування передачі сигналів рослинними гормонами, регулювання динаміки цитоскелету та складу клітинної стінки. Розкриття механізмів, що лежать в основі цих фізіологічних та біохімічних реакцій на сольовий стрес, може дати цінні стратегії для підвищення врожайності сільськогосподарських культур [4].

Постановка завдання. У зв'язку з вищевикладеним актуальності набуває потреба в розробці методів (прийомів) тестування солетолерантності у сільськогосподарських культур.

Прогрес у транскриптоміці, геноміці та молекулярній біології дозволив виявити нові роди генів, що беруть участь у формуванні відповіді на сольовий стрес рослиною [1]. Отже, стійкість рослин до несприятливих факторів середовища є генетично детермінованою і проявляється на різних рівнях організації життя, зокрема на клітинному та тканинному. Це дає можливість для використання біотехнологічних методів з метою виділення стійких генотипів при зменшенні матеріальних витрат за порівняно короткий період.

Мета статті – провести біоінформаційний аналіз методів (прийомів) тестування солетолерантності сільськогосподарських культур загалом і непсихотропних конопель посівних (*Cannabis sativa* L.) зокрема та здійснити обґрунтування можливостей такого тестування, штучно змодельованого в культурі *in vitro*.

Виклад основного матеріалу дослідження. Оцінка на стійкість до сольового стресу полягає у додаванні різних концентрацій певної солі до живильного середовища та встановлення життєздатності експлантів, особливостей їх проходження за фазами росту і розвитку, за проявом морфологічних ознак тощо. У результаті виникає можливість проведення добору та розмноження стійких генотипів. Культивування *in vitro* є дієвим і швидким інструментом для вивчення відповіді рослин на сольовий стрес, у той час, як інші фактори (поживні речовини, освітлення, температура) залишаються постійними і контролюються оптимальним чином [5]. При цьому толерантність до сольового стресу визначають різними шляхами. Наприклад, у досліді з люцерною толерантними вважали проростки, які вижили у середовищі з найвищою концентрацією NaCl (200 мМ), а потім на основі випробування відібраних клонів в умовах помірного сольового стресу (75 мМ NaCl) [5].

Культура *in vitro* була успішно використана для оцінки впливу сольового стресу багатьох культур: пшениці, ячменю, тритикале [6, 7]; міскантусу [8]; баклажану [9]; люцерни [5]; ммину [10]; тополі, верби [11], пальми [12] та ін. До того ж встановлено, що адаптивну роль до засолених умов відіграють накопичення проліну та цукрів, підвищення активності антиоксидантних ферментів [10] й аскорбінової кислоти [9], а окремі фізіологічно активні речовини виявляють захисний

ефект в умовах сольового стресу, наприклад жасмонова кислота (0,1 і 10 мкМ) частково долає негативний сольовий вплив на основні фотосинтетичні пігменти та підтримує осмос клітин картоплі під час засолення [13]. Також було виявлено, що симптоми сольового стресу у конопель можна полегшити в старих листках саме за допомогою застосування Силіцію (коноплі мають генетичну схильність до поглинання силікатної кислоти і накопичення її у вигляді кремнезему в клітинах епідермісу листків і трихомах) [14] та біостимуляторів росту білкового походження [15].

Стійкі клітинні лінії, наприклад до NaCl, можна отримувати двома шляхами:

- 1) розвинути калюсну тканину відразу пересаджують на середовище з постійною концентрацією солі;
- 2) калюсну тканину піддають впливу ступінчастого збільшення концентрації солі [9].

Другий варіант є більш ефективним, оскільки калюси характеризуються компактним ростом, зеленим кольором, відсутністю некротичних зон [9].

З огляду на актуальність проблеми доцільним є дослідження реакції різних генотипів сільськогосподарських культур на штучно змодельований сольовий стрес. При цьому виділяють наступні етапи дослідження:

- 1) визначення схожості насіння, ступеня виживаності пагонів, рівня розвитку мікроклонів, інтенсивності калюсоутворення, викликаного фітогормонами екзогенного походження, та частки морфогенних калюсів в умовах сольового стресу;

- 2) теоретичне узагальнення даних з реакції експлантів на штучно змодельований сольовий стрес в умовах *in vitro*, зокрема на стійкість до основних типів засолення ґрунтів (хлоридного, сульфатного, хлоридно-сульфатного, хлоридно-карбонатного, сульфатно-хлоридного, сульфатно-карбонатного, карбонатно-хлоридного і карбонатно-сульфатного) за різних концентрацій солей;

- 3) розробка й апробація тест-систем для проведення скринінгу генотипів на стійкість до сольового стресу в культурі *in vitro*, що забезпечуватимуть значну селективність при доборі, та рекомендацій з дослідження стійкості конопель до сольового стресу;

- 4) виділення вихідного селекційного матеріалу з підвищеною стійкістю до сольового стресу [16].

У розробленому нами способі добору *in vitro* толерантних до сольового стресу генотипів конопель [17], який включає культивування експлантів в умовах дії стресового чинника, спрямованого проти нормального розвитку і виживання нестійких форм, добір окремих генотипів проводять на рівні регенованих з калюсів соматоклонів з додаванням до живильного середовища залежно від типу засолення 0,25% NaCl або 0,75% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ за хлоридного засолення, 0,5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ або 1,0% Na_2SO_4 за сульфатного засолення, 0,15% Na_2CO_3 або 0,30% $NaHCO_3$ за карбонатного засолення. Саме такі концентрації сполук є селективними й виявляють сублетальний та летальний ефект та дають змогу провести добір солетолерантних генотипів конопель. Оцінка за умов додавання до живильного середовища різних типів солей (хлоридів, сульфатів чи карбонатів) дозволяє виділяти толерантні до сольового стресу генотипи для різних типів засолення ґрунтів [17].

Калюсну культуру отримують на основі гіпокотильних сегментів, інокульованих на середовищі Мурасіге і Скуга [18], доповненому 0,5 мг/л 2,4-дихлорофеноксоцтової кислоти, 0,3 мг/л кінетину, 0,5 мг/л гіберелової кислоти для калюсогенезу і морфогенезу [19, 20], а також залежно від типу засолення відповідною концентрацією солі. Потім проводять мікроклональне розмноження

утворених соматоклонів (рослин-регенерантів з калюсної тканини), зокрема пагони відокремлюють, за можливості ділять на сегменти, які містять латеральну меристему, і роблять пасаж на безгормональне середовище Мурасіге і Скуга, доповнене залежно від типу засолення вищевказаними концентраціями солей. Після укорінення мікроклони адаптують в умовах *in vivo*. Різну реакцію на сольовий стрес і толерантність (стійкість) до сольового стресу кожного окремого генотипу визначають за рівнем виживання калюсів, інтенсивністю калюсогенезу (приростом тканини) і частотою органогенезу, рівнем виживання рослин-регенерантів, морфометричними показниками мікроклонів за селективних умов в порівнянні з контрольним варіантом – середовищем без додавання солей [17].

Можлива сфера застосування наукових розробок – селекція конопель та інших сільськогосподарських культур, оскільки використання нового способу дозволяє отримувати толерантний (стійкий) до сольового стресу вихідний матеріал конопель та прискорювати селекційний процес.

Висновки і пропозиції. Стійкість рослин до несприятливих факторів середовища є генетично детермінованою і проявляється на різних рівнях організації життя, зокрема на клітинному та тканинному. Це дає можливість для використання біотехнологічних методів з метою виділення стійких генотипів при зменшенні матеріальних витрат за порівняно короткий період. У розробленому способі добору *in vitro* толерантних до сольового стресу генотипів конопель, який включає культивування експлантів в умовах дії стресового чинника, спрямованого проти нормального розвитку і виживання нестійких форм, добір окремих генотипів проводять на рівні регенерованих з калюсів соматоклонів з додаванням до живильного середовища залежно від типу засолення 0,25% NaCl або 0,75% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ за хлоридного засолення, 0,5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ або 1,0% Na_2SO_4 за сульфатного засолення, 0,15% Na_2CO_3 або 0,30% $NaHCO_3$ за карбонатного засолення. Використання нового способу дозволяє отримувати толерантний (стійкий) до сольового стресу вихідний матеріал конопель та прискорювати селекційний процес.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Isayenkov S. V. Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytol Genet.* 2012. Vol. 46, No. 5. P. 302–318. DOI: 10.3103/S0095452712050040
2. Ґрунтознавство: підручник / за ред. Д. Г. Тихоненка. Київ, 2005. 703 с.
3. Назаренко І. І., Польчина С. М., Нікорич В. А. Ґрунтознавство: підручник. Чернівці, 2004. 400 с.
4. Zhao S., Zhang Q., Liu M., Zhou H., Ma C., Wang P. Regulation of plant responses to salt stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, Iss. 9. 4609. DOI: 10.3390/ijms22094609
5. Campanelli A., Ruta C., Morone-Fortunato I., de Mastro G. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) clones tolerant to salt stress: *in vitro* selection. *Cent. Eur. J. Biol.* 2013. Vol. 8, Iss. 8. P. 765–776. DOI: 10.2478/s11535-013-0194-1
6. Пикало С. В., Дубровна О. В., Демидов О. А. Клітинна селекція тритикале озимою на стійкість до сольового стресу. *Фактори експериментальної еволюції організмів.* 2017. Т. 20. С. 247–251. DOI: 10.7124/FEEO.v20.773
7. Пикало С. В., Демидов О. А., Юрченко Т. В., Прокопів Н. І., Харченко М. В., Рибка К. М. Розроблення способів добору *in vitro* генотипів зернових культур на стійкість до несприятливих чинників довкілля. *Екологічні науки.* 2021. № 4 (37). С. 90–97. DOI: 10.32846/2306-9716/2021.eco.4-37.13
8. Коцар М. О. Вплив сольового стресу *in vitro* на розвиток пагонів міскантусу. *Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків.* 2014. Вип. 21. С. 221–225.

9. Hannachi S., Werbrouck S., Bahrini I., Abdelgadir A., Siddiqui H. A., van Labeke M. C. Obtaining salt stress-tolerant eggplant somaclonal variants from *in vitro* selection. *Plants*. 2021. Vol. 10, Iss. 11. 2539. DOI: 10.3390/plants10112539
 10. Razavizadeh R., Adabavazeh F., Chermahini M. R. Adaptive responses of *Carum copticum* to *in vitro* salt stress. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*. 2017. Vol. 11, No. 1. P. 37–42. DOI: 10.5281/zenodo.1128905
 11. Хома Ю., Худолєєва Л., Куцоконь Н. Вплив сольового стресу на рослини тополі клону 'INRA 353-38' та верби клону 'Житомирська-1' в умовах культури *in vitro*. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. 2020. Т. 83, № 4. С. 43–49. DOI: 10.17721/1728_2748.2020.83.43-49
 12. Ibraheem Y. M., Pinker I., Böhme M., Al-Hussin Z. Screening of some date palm cultivars to salt stress *in vitro*. *Acta Hortic*. 2012. Vol. 961. P. 359–365. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.47
 13. Efimova M. V., Mukhamatdinova E. A., Kovtun I. S., Kabil F. F., Medvedeva Yu. V., Kuznetsov V. V. Jasmonic acid enhances the potato plant resistance to the salt stress *in vitro*. *Dokl Biol Sci*. 2019. Vol. 488, Iss. 1. P. 149–152. DOI: 10.1134/S0012496619050077
 14. Berni R., Mandlik R., Hausman J.-F., Guerriero G. Silicon-induced mitigatory effects in salt-stressed hemp leaves. *Physiol. Plant*. 2021. Vol. 171, Iss. 4. P. 476–482. DOI: 10.1111/pp1.13097
 15. Di Mola I., Cozzolino E., Ottaiano L., Conti S., Roupheal Y., Mori M. Performance of hemp grown under salt stress conditions? *Sustainable Management of Cropping Systems: Proceedings of the 49th National Conference of the Italian Society for Agronomy* (16–18 September 2020, Bari, Italy). Bari, 2020. P. 71–72.
 16. Міщенко С. В. Сучасні дослідження сольового стресу рослин в умовах *in vitro* (огляд). *Наукові читання до 85-річчя від дня народження В. Г. Вировця: матеріали наук.-практ. конф.* (Глухів, 05 березня 2022 р.). Глухів, 2022. С. 114–118.
 17. Спосіб добору *in vitro* толерантних до сольового стресу генотипів конопель посівних: пат. 151514 UA / Міщенко С. В., Лайко І. М., Ткаченко С. М. № у 2022 01227; заявл. 14.04.2022; опубл. 03.08.2022, Бюл. № 31.
 18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
 19. Спосіб одержання калусної тканини однодомних ненаркотичних конопель посівних (*Cannabis sativa* L.) середньоросійського еколого-географічного типу в культурі *in vitro*: пат. 132944 UA / Міщенко С. В. № у 2018 05574; заявл. 21.05.2018; опубл. 25.03.2019, Бюл. № 6.
 20. Міщенко С. В. Модифікація живильного середовища для культивування непсихотропних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоевропейського еколого-географічного типу *in vitro*. *Луб'яні та технічні культури*. 2019. Вип. 7 (12). С. 15–23. DOI: 10.48096/btc.2019.7(12).15-23
-