

УДК 630*232.13

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.129702

ПОРІВНЯННЯ СОЛЕСТІЙКОСТІ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИН *POPULUS* І *SALIX* В УМОВАХ *IN VITRO*

© Л. В. Худолєєва, Н. К. Куцоконь

Нераціональний вплив людини на ґрунти часто призводить до негативних наслідків, одним з яких є засолення. Серед різних типів засолення найбільший негативний вплив має засолення хлоридами. При накопиченні йонів хлору в клітинах рослин виникають порушення в обміні речовин, викликані ураженням клітинної мембрани. Такі зміни негативно впливають на ріст дерев. Тополі та верби – це енергетичні культури, що характеризуються швидким ростом та широким спектром адаптацій до умов довкілля. Хоча ці рослини не є галофітами, деякі генотипи відносно солестійкі. Вирощування їх на засолених територіях матиме не лише екологічний ефект оздоровлення ґрунту, важливе значення для озеленення міста, але й може принести економічний прибуток зокрема, на ділянках, виключених з сільськогосподарського використання внаслідок їх засоленості. Метою дослідження був аналіз солестійкості осики (*Populus tremula*), гібридної тополі клону 'INRA 717-184' (*P. tremula* × *P. alba*) та верби клону 'Олімпійський вогонь' (*Salix alba* × *S. fragilis*) в умовах культури *in vitro* за концентрації хлориду натрію в живильному середовищі 25 мМ, 50 мМ та 100 мМ. Стан рослин, інтенсивність їх росту (за довжини пагона) та коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й, 30-й та 60-й день культивування. Отримані результати показують, що ступінь солестійкості рослин суттєво відрізняється у різних генотипів. У рослин гібридної тополі клону 'INRA 717-184' зниження інтенсивності ростової активності спостерігали при довготривалому вирощуванні у всіх досліджуваних концентраціях хлориду натрію. Достовірне зниження інтенсивності приросту пагона на 94,3 % у порівнянні з контролем у рослин осики відмічено лише на живильному середовищі за концентрації NaCl 100 мМ після двох місяців культивування. Достовірних відмінностей в інтенсивності росту у верби за дії різних концентрацій хлориду натрію не виявлено на жодному етапі культивування. Статистично достовірне зниження інтенсивності ризогенезу після 1-го та 2-ох місяців культивування показали лише клони осики за вмісту 100 мМ хлориду натрію в живильному середовищі. Загалом, у верби виявлено більша інтенсивність коренеутворення порівняно з клонами тополь

Ключові слова: *Populus*, *Salix*, солестійкість, хлорид натрію, культура *in vitro*, ростові параметри

1. Вступ

Нераціональний вплив людини на ґрунти часто призводить до негативних непередбачуваних наслідків, одним з яких є засолення. Станом на 2013 рік в Україні налічувалося 4,7 млн. га солонцюватих та засолених ґрунтів, що становить 14,3 % площі сільськогосподарських угідь [1]. Крім засолення угідь, існує також проблема засолення ґрунтів у містах, спричинена ненормованим внесенням у довкілля високих концентрацій технічної солі NaCl, що використовують як засіб боротьби проти ожеледиці в зимовий період. Йони Na⁺ (рухома форма) при кризових концентраціях у ґрунті й фітомасі дерев (коріння, листки, кора) є агресивними фітотоксикантами і основними чинниками некротизації листяного покриву крони та дефоліації дерев у літній період, що є ваговою проблемою для деревних насаджень [2].

2. Літературний огляд

Чутливість рослин до засолення залежить як від хімічної природи солей так і від їх концентрації в ґрунті. Засолення ґрунтів викликане переважно катіонами Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ та аніонами Cl⁻, S²⁻ і CO₃²⁻ [3]. Таким чином розрізняють карбонатний, хлоридний, сульфатний, сульфатно-хлоридний, хлоридно-сульфатний та змішаний типи засолення, з яких найбільший негативний вплив має засолення хлоридами. Йони хлору легко проникають в клітини рослин та накопичуються в них. Це викликає ураження клітин-

ної мембрани, внаслідок чого виникають порушення в обміні речовин [4]. Такі зміни призводять до нееконормного використання води рослиною, зниження інтенсивності транспірації та зміни вмісту хлорофілу в листках та, як наслідок, зміни інтенсивності фотосинтезу [5, 6].

Шкідливому впливу солей рослина протидіє шляхом накопичення значної кількості захисних речовин: цукрів, амідів, органічних кислот. Синтез цих речовин знаходиться під генетичним контролем [7, 8]. Стійкість рослин до засолення може суттєво змінюватися не тільки для різних видів рослин, але і для різних клонів одного виду. В умовах лабораторної культури на солестійкість рослин може впливати склад живильного середовища, зокрема, кількість наявних в ньому цукрів [9].

Тополі та верби – це культури, що характеризуються швидким ростом та широким спектром адаптацій до умов довкілля. Проростки тополь здатні переживати як раптові літні повені, так і посушливі, високотемпературні умови, що дозволить успішно використовувати їх в майбутньому при прогнозованих змінах клімату, які нерідко спостерігаються вже зараз. При цьому за оптимальних умов, зокрема, достатнього зволоження, можна очікувати навіть зростання продуктивності короткоротаційних енергетичних плантацій [10]. Хоча ці рослини не є галофітними, деякі види відносно солестійкі. Вирощування їх на засолених територіях матиме не лише екологічний

ефект оздоровлення ґрунту, важливе значення для озеленення міста, але й може принести економічний прибуток зокрема, на ділянках, виключених з сільськогосподарського використання внаслідок їх засоленості [11]. Як відомо, середня продуктивність короткочасних енергетичних плантацій за сприятливих умов може сягати 25 т/(га·рік) [12].

Підвищити природну стійкість рослин до біотичних та абіотичних стресових факторів, в тому числі і до засолення, можливо за використання технологій генетичної інженерії. В багатьох країнах світу (США, Канада, країни ЄС, Китай, Ізраїль та ін.) проводяться роботи з генетичної модифікації тополь, розроблення підходів їх продуктивного вирощування на швидкопоновлюваних плантаціях [13, 14].

Зокрема, в Китаї вже протягом кількох років вирощують промислові плантації трансгенних тополь, стійких до засолення та поїдання комахами [15].

Останнім часом у селекційній практиці все частіше використовують біотехнологічні методи. Застосування культури *in vitro* дозволяє моделювати силу тиску стресового агента на організм, дослідити його вплив на біооб'єкт, контролювати фізичні та хімічні показники вирощування рослинного матеріалу, проводити роботу незалежно від погодних умов та пори року [16]. Ріст рослин та інтенсивність коренеутворення є важливими інтегральними показниками, а ступінь їх пригнічення залежить від солестійкості рослин [17, 18].

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – визначити стійкість клонів тополь та верби до засолення хлоридом натрію в умовах *in vitro*.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Мультиплікувати рослинний матеріал шляхом мікроклонального розмноження.

2. Визначити зміну інтенсивності ростової активності (за довжиною пагона) при культивуванні

клонів тополь та верби на живильному середовищі із різним вмістом хлориду натрію.

3. Визначити зміну інтенсивності ризогенезу при культивуванні клонів тополь та верби на живильному середовищі із різним вмістом хлориду натрію.

4. Порівняти солестійкість досліджуваних клонів.

4. Матеріали і методи

Солестійкість осики (*Populus tremula*), гібридної тополі клону 'INRA 717-184' (*P. tremula* × *P. alba*) та верби клону 'Олімпійський вогонь' (*Salix alba* × *S. fragilis*) оцінювали за дії хлориду натрію. *In vitro* рослини мультиплікували шляхом мікроклонального розмноження та вирощували в пробірках на модифікованому середовищі MS (*Murashige & Skoog medium, Duchefa, Netherlands*) із додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти та вмістом сахарози 30 г/л. Експериментальні рослини культивували на аналогічному середовищі, але з додаванням хлориду натрію у різних концентраціях (25 мМ, 50 мМ та 100 мМ). Рослини вирощували протягом 2 місяців при температурі 25°C і 16-годинному фотоперіоді. Стан рослин, інтенсивність їх росту (за довжиною пагона) та коренеутворення (за кількістю коренів) оцінювали на 10-й, 30-й та 60-й день культивування. Контрольні рослини вирощували на вільному від хлориду натрію середовищі. Результати вимірювань опрацьовували з використанням пакету аналізу MS Excel. Статистичну обробку проводили за загально-визначеними методиками [19]. Відмінності між дослідними та контрольними варіантами вважали достовірними при $p < 0,05$.

5. Результати дослідження та їх обговорення

Досліджувані клони показали різну стійкість до засолення хлоридом натрію. Дані про ступінь впливу засолення на ростову активність та ризогенез клонів тополь та верби представлені на рис. 1, 2.

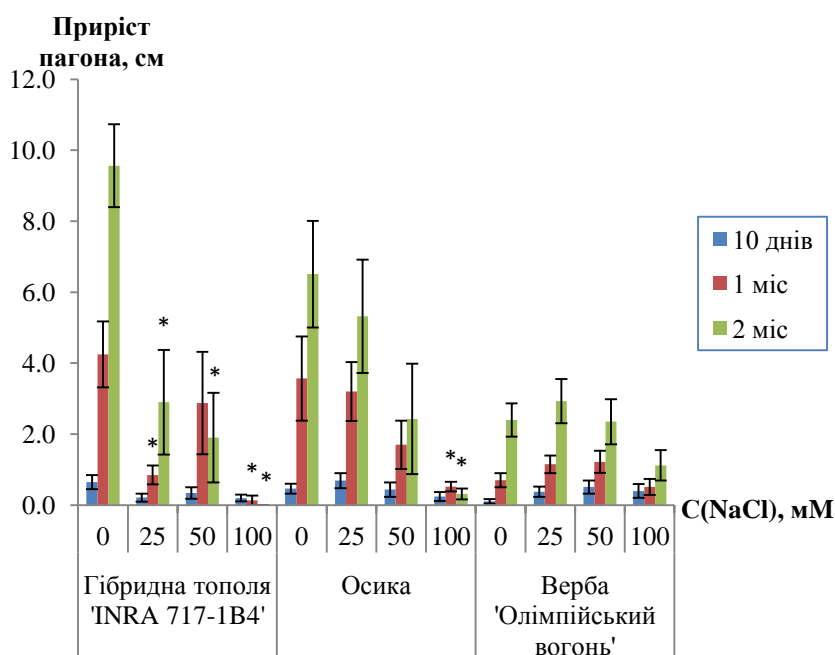


Рис. 1. Вплив хлориду натрію на ростову активність у тополь та верби (* $p < 0,05$)

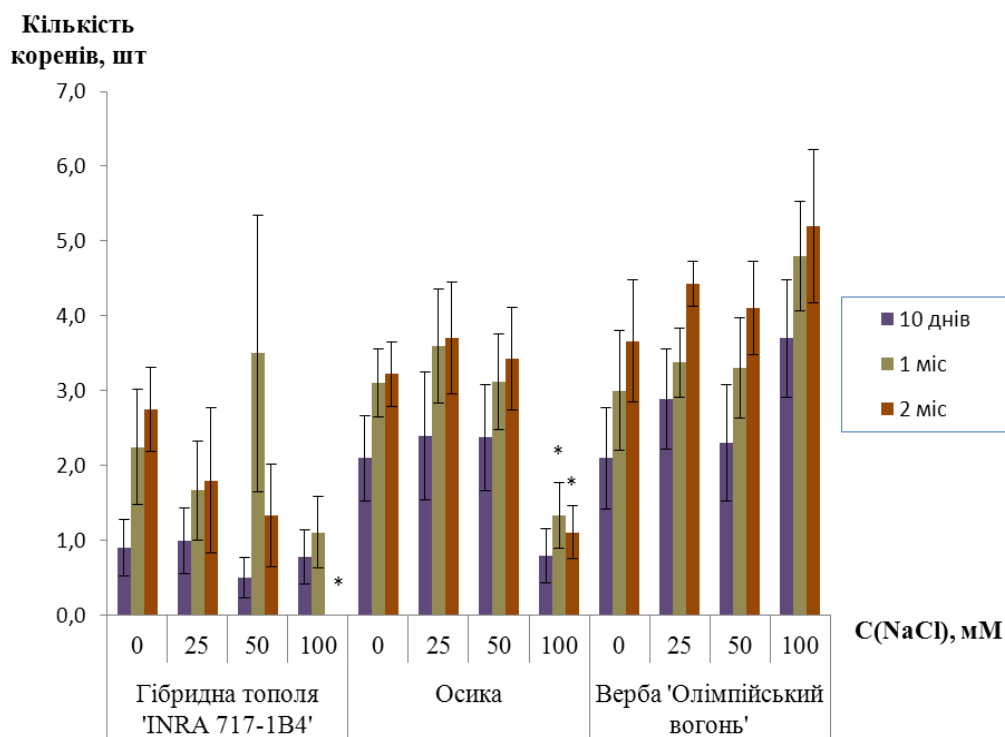


Рис. 2. Вплив хлориду натрію на коренеутворення у клонів тополь та верби (* $p < 0,05$)

У рослин гібридної тополі клону 'INRA 717-184' при короткотривалому впливі стресового фактору (10 діб) та його найменшій концентрації в живильному середовищі (25 мМ) статистично достовірних змін ростової активності у порівнянні з контролем не виявляли. При збільшенні часу культивування до 1 місяця спостерігали зниження ростової активності на 79,1 %, а після 2 місяців на 69,8 %. Після двох місяців культивування рослин на живильному середовищі з 25 мМ NaCl життєздатними залишилися 80 % рослин. При культивуванні рослин на середовищі з 50 мМ NaCl статистично достовірне зниження приросту пагона (на 80 %) спостерігали після 2 місяців вирощування. За концентрації 100 мМ NaCl в живильному середовищі на 10-й день вирощування у рослин цього клону спостерігали ознаки некрозу листків (почорніння та скручення), а також зниження темпів росту на 71,4 %, а після 30 днів – на 97,7 %. Після продовження культивування всі досліджувані рослини загинули.

Рослини осики проявили більшу стійкість до дії сольового стресового фактору. Достовірне зниження інтенсивності росту на 94,3 % у порівнянні з контролем у рослин цього клону відмічено лише на живильному середовищі з 100 мМ NaCl після двох місяців культивування. За цієї ж концентрації спостерігали зниження ризогенезу після 1-го та 2-ох місяців культивування на 58,1 % та 65,6 %, відповідно. Виживаність рослин на середовищі з максимальною концентрацією NaCl склала 40 %.

Найбільшу стійкість до дії NaCl серед досліджуваних рослин показала верба клону 'Олімпійський вогонь'. Порівняно з клонами тополь, у верби виявлено вищий рівень коренеутворення за вирощування на всіх варіантах живильних середовищ. Досто-

вірних відмінностей в інтенсивності коренеутворення та приросту пагона рослин за дослідних умов не виявлено на жодному етапі культивування. Після двох місяців культивування рослин на середовищі з максимальною концентрацією хлориду натрію (100 мМ) всі рослини були життєздатними.

Отримані результати показують, що ступінь солестійкості рослин суттєво залежить від їх генотипу. Так, гібридна тополя клону 'INRA 717-184', що загалом характеризувалася найвищим приростом пагона у контролі, здатна витримати лише короткотривалий вплив малих концентрацій хлориду натрію в живильному середовищі. При довготривалому впливі малих концентрацій NaCl рослини цього клону суттєво знижують темпи росту, а довготривалий вплив високих концентрацій хлориду натрію виявився для них летальним. Очевидно, після тривалого впливу стресового фактору на рослину, настає фаза виснаження, що призводить до загибелі рослин та втрати регенераційних властивостей. У рослин осики відповідь на стресовий фактор відмічена лише за довготривалої дії високої концентрації хлориду натрію, однак, адаптаційні механізми забезпечують частково подальшу регенерацію у менше, ніж половини рослин. Імовірно, за рахунок кращої солестійкості та сильнішої здатності до ризогенезу, порівняно з клонами тополь, верба клону 'Олімпійський вогонь' швидше адаптувалася до дії стресового фактору та переходила у фазу відновлення рослини і активації метаболічних процесів, що забезпечує збереження темпів росту та регенераційної здатності рослин.

В подальшому, нами планується залучення в дослідження більшого числа клонів тополь та верб. Це дозволить визначити найбільш солестійкі, які надалі можна буде використовувати на засолених територіях.

6. Висновки

1. Шляхом мікроклонального розмноження на модифікованому середовищі MS із додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти та вмістом сахарози 30 г/л за короткий період часу мультипліковано рослинний матеріал для дослідження солестійкості клонів тополь та верб.

2. У рослин гібридної тополі клону 'INRA 717-184' зниження інтенсивності ростової активності при довготривалому вирощуванні спостерігали за всіх досліджуваних концентрацій хлориду натрію. Достовірне зниження інтенсивності приросту пагона на 94,3 % у порівнянні з контролем у рослин осики відмічено лише після двох місяців культивування на живильному середовищі зі 100 мМ NaCl. Достовірних відмінно-

стей в інтенсивності росту за дослідних умов у верби не виявлено на жодному етапі культивування.

3. Клони осики показали статистично достовірне зниження ризогенезу після 1-го та 2-ох місяців культивування на 58,1 % та 65,6 %, відповідно. Для інших клонів достовірних змін інтенсивності коренеутворення не виявлено. Загалом, у верби відмічена більша інтенсивність коренеутворення порівняно з клонами тополь.

4. Досліджені клони тополь та верби за збільшенням ступеню солестійкості слід розташувати наступним чином: гібридна тополя (*P. tremula* × *P. alba*) клону 'INRA 717-184' → осика (*P. tremula*) → верба (*Salix alba* × *Salix fragilis*) клону 'Олімпійський вогонь'.

Література

1. Макєва Л. М. Державне регулювання якісного стану земель сільськогосподарського призначення // Держава та регіони. Серія: Державне управління. 2013. № 1. С. 83–87.
2. Луцишин О. Г., Палапа Н. В. Адаптація та виживання дерев Київського мегаполісу. К.: ДІА, 2016. 144 с.
3. Строганов Б. П. Метаболизм растений в условиях засоления // 33-е Тимирязевское чтение. М., 1973. 51 с.
4. Дорохина О. А., Мушинская Н. И., Кудряшова Н. А. Об устойчивости видов рода *Populus* L. к засолению хлористым натрием // Вестник Оренбургского государственного университета. 2008. № 87. С. 90–95.
5. Кулешова Т. Изучение солеустойчивости семян тополя белого // Лесоводство и агролесомелиорация. 1965. Вып. 2. С. 145–149.
6. Кулешова Т. Физиологические особенности тополя канадского на засоленных почвах // Лесоводство и агролесомелиорация. 1965. Вып. 2. С. 54–58.
7. Plant salt-tolerance mechanisms / Deinlein U., Stephan A. B., Horie T., Luo W., Xu G., Schroeder J. I. // Trends in Plant Science. 2014. Vol. 19, Issue 6. P. 371–379. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.001
8. Genetic Engineering Strategies for Abiotic Stress Tolerance in Plants / Marco F., Bitrián M., Carrasco P., Rajam M. V., Alcázar R., Tiburcio A. F. // Plant Biology and Biotechnology. 2015. P. 579–609. doi: 10.1007/978-81-322-2283-5_29
9. Вплив хлориду натрію на калосогенний і регенераційний потенціали ліній кукурудзи плазми Ланкастер / Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Степневська Я. В., Сагарова Т. М. // Физиология и биохимия культурных растений. 2013. Т. 45, № 1. С. 45–52.
10. Kutsokon N. K., Jose S., Holzmueller E. A Global Analysis of Temperature Effects on *Populus* Plantation Production Potential // American Journal of Plant Sciences. 2015. Vol. 06, Issue 01. P. 23–33. doi: 10.4236/ajps.2015.61004
11. Biomass Production of Selected Energy Plants: Economic Analysis and Logistic Strategies / Pszczołkowska A., Romanowska-Duda Z., Pszczołkowski W., Grzesik M., Wysokińska Z. // Comparative Economic Research. 2012. Vol. 15, Issue 3. P. 77–103.
12. Ростові характеристики та енергопродуктивність тополь і верб у короткоротаційній плантації за перший рік вегетації / Куцоконь Н. К., Рахметов Д. Б., Худолєєва Л. В., Рахметова С. О., Фіщенко В. В., Нестеренко О. Г., Рашидов Н. М. // Біологічні системи. 2017. Т. 9, Вип. 2. С. 238–246.
13. Genetic transformation of *Populus tomentosa* to improve salt tolerance / Du N., Liu X., Li Y., Chen S., Zhang J., Ha D. et al. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2011. Vol. 108, Issue 2. P. 181–189. doi: 10.1007/s11240-011-0026-4
14. Genetic transformation and expression of transgenic lines of *Populus x euramericana* with insect-resistance and salt-tolerance genes / Yang R. L., Wang A. X., Zhang J., Dong Y., Yang M. S., Wang J. M. // Genetics and Molecular Research. 2016. Vol. 15, Issue 2. doi: 10.4238/gmr.15028635
15. Ewald D., Hu J., Yang M. Transgenic Forest Trees in China // Tree Transgenesis. 2006. P. 25–45. doi: 10.1007/3-540-32199-3_2
16. Любченко І. О., Рябовол Л. О., Любченко А. І. Використання культури *in vitro* в адаптивній селекції рослин (огляд літератури) // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва України. 2016. Вип. 88. С. 126–136.
17. Удовенко В. Г. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Методическое руководство. М., 1988. 227 с.
18. Munns R., Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance // Annual Review of Plant Biology. 2008. Vol. 59, Issue 1. P. 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
19. Лакин Г. Ф. Биометрия: учеб. пос. 4-е изд. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.

Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Кравець О. П.
Дата надходження рукопису 22.03.2018

Худолєєва Лідія Вікторівна, інженер, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, Україна, 03143, аспірант, кафедра промислової біотехнології, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут ім. І. Сікорського», пр. Перемоги, 37, м. Київ, Україна, 03056
E-mail: khudolieieva.lidiya@gmail.com

Куцоконь Наталія Констянтинівна, старший науковий співробітник, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ, Україна, 03143