

КОВБАСЕНКО Р.В.✉, **ДМИТРІЄВ О.П.**, **ПОЛЯКОВСЬКИЙ С.О.***Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, ORCID: 0000-0002-0774-362X*✉ rayasenko@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН ТА МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ ПРОТИ ПОСУХИ

Мета. Запропонувати схему клітинної селекції рослин томату на стійкість проти посухи із застосуванням селективного фактора маніту. **Методи.** Об'єктом досліджень був сорт томату *Світанок*. Роботу з культурою *in vitro*, асептичне пророщування насіння, мікроклональне розмноження, калюсогенез та ініціювання морфогенезу проводили за відомими методиками. **Результати.** Встановлено вплив пероксидази у стимулюванні захисних механізмів та виявлено роль фітогормонів у цих процесах. З'ясовано, що за використання ступінчастої селекції томату у культурі *in vitro* відібрані зразки ТТП-1 і ТТП-2, толерантні проти засолення, робота із ними продовжується. Також доведено вплив пероксидази на зростання стійкості рослин за фоліарної обробки сигнальними молекулами. **Висновки.** З'ясовано, що сигнальні молекули беруть активну участь в антиоксидантному захисті рослин в умовах стресу, викликаного повітряною та ґрунтовою посухою. Використані нами сигнальні молекули проявляють захисний ефект в умовах стресу: характерною особливістю є те, що вони захищають рослину тим контрастніше, чим більшою є стресова дія. Також беруть досить активну участь у процесах відновлення після несприятливих дій різних факторів. Зростання активності антиоксидантного фермента пероксидази теж сприяє активації системної стійкості рослин томату проти високої температури.

Ключові слова: томати, *in vitro*, пероксидаза.

Встановлено, що серед усіх аномальних природно-кліматичних явищ на долю посухи припадає близько 26 % випадків [13]. Вважається, що дефіцит вологи у ґрунті завдає значно більшої шкоди рослинам, ніж усі решта стресових факторів разом узятих [6]. Стрес, викликаний водним дефіцитом, є первинним у випадку посухи та вторинним за засолення ґрунтів [14]. Майже 70 % прісної води, що використовується людством, витрачається у сільському господар-

стві [3]. А тому вивчення механізмів стійкості рослин проти посухи може дати досить важливу інформацію для довготермінового селекційного процесу культурних рослин.

Для найбільш посухостійких рослин характерна добре розвинена коренева система, високий кореневий тиск, значна водоутримуюча здатність тканин, зумовлена нагромадженням у вакуолях осмотично активних речовин: вуглеводів, органічних кислот, розчинних форм азоту та іонів мінеральних речовин. Дефіцит води у тканинах виникає через перевищення її витрати на транспірацію над надходженням із ґрунту. Усе це досить часто спостерігається у спекотну погоду. При цьому вміст води у листках знижується на 25–28 % порівняно із ранковим періодом, рослини втрачають тургор та в'януть. У результаті цього знижується і водний потенціал листків, що активує надходження води із ґрунту у рослину. Зміна кальцієвого гомеостазу є однією із найбільш ранніх реакцій рослин на дію стресорів різної природи, у тому числі і посухи [12]. Посухостійкість може складатися із кількох складових: здатності рослини одержувати доступ до води, що визначається структурою та станом кореневої системи; ефективності використання води рослиною; захисту від пошкоджень, особливо за окислювального стресу під час репродуктивного росту [11].

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був сорт томату *Світанок*. Роботу з культурою *in vitro*, асептичне пророщування насіння, мікроклональне розмноження, калюсогенез та ініціювання морфогенезу проводили за відомими методиками [1; 2] на модифікованому нами агаризованому МС-середовищі. Для отримання калюсної культури використовували сегменти стебла та листка пробіркових рослин вихідного сорту томату.

Результати та обговорення

З метою імітації *in vitro* стресового ефекту зневоднення можуть застосовуватися живильні

© **КОВБАСЕНКО Р.В.**, **ДМИТРІЄВ О.П.**, **ПОЛЯКОВСЬКИЙ С.О.**

середовища, які доповнені осмотично активними речовинами, що знижують зовнішній водний потенціал, зокрема такими, як маніт. Оскільки кожен вид рослин має свою чутливість до осмотиків, рекомендовані в науковій літературі селективні концентрації маніту істотно різняться. Із метою добору методом клітинної селекції толерантних проти кількох абіотичних стресів рослин томату апробовано 2 селективні агенти – ПЕГ-6000 і маніт. З'ясовано, що селективна система із манітом є більш ефективною, оскільки забезпечує більш повну елімінацію чутливих клітин та більш високу життєздатність рослин-регенерантів. Методом клітинної селекції одержано рослини томату, які за відносним та загальним вмістом води, інтенсивністю росту та насінневою продуктивністю мали більш високу стійкість проти посухи, ніж вихідні рослини. Усе це свідчить про можливість використання селективної системи із манітом для добору толерантних проти дефіциту води ліній томату. Рівень вмісту води в рослинах визначає спрямованість та інтенсивність усіх фізіолого-біохімічних процесів, у тому числі і фотосинтезу. Для активної діяльності рослини мають містити в своїх тканинах як мінімум 70–80 % води. За меншого її вмісту гальмується фотосинтетична діяльність рослини, процеси дисиміляції переважають асиміляційні. Організм поступово втрачає життєвий потенціал, ослаблюється і гине. Такий стан у природному варіанті спостерігається в період дозрівання рослин.

Підтверджено збереження підвищеної толерантності проти посухи у польових умовах у

більшості одержаних зразків після клітинної селекції, що вказує на мутаційну природу цієї толерантності. Відмінності між вихідними та відібраними рослинами проявлялися відчутніше в умовах більш жорсткого водного та температурного стресів. Із використанням селективної системи з манітом проведено пряму і ступінчасту селекцію *in vitro*, здійснено добір калюсних ліній томату, стійких до модельованого сольового стресу. Калюсні тканини відібраних зразків успішно виживали на живильному середовищі МС із додаванням 0,55 % NaCl. Серед рослин, регенованих із стійких до маніту клітин, відібрані зразки із підвищеною стійкістю не лише до посухи, але й до засолення та низьких позитивних і негативних температур: ТТП-1 і ТТП-2. Таким чином доведено, що шляхом селекції *in vitro* на середовищах із осмотиком манітом можна одержати рослини, толерантні проти абіотичних стресів, що викликають зневоднення тканин.

Одним із механізмів стійкості рослинного організму є каскад реакцій із утворенням продуктів синтезу специфічних ферментів у клітинах. Основними ферментами протидії окислювальному стресу є ферменти-антиоксиданти, серед яких пероксидаза займає досить важливе місце [10].

Для виявлення впливу основних сигнальних молекул на зростання посухостійкості рослин томату нами було проведено фоліарну обробку рослин нестійкого сорту *Світанок* та визначено динаміку активності пероксидази на 5 і 10 дні після обробки (табл.).

Таблиця. Динаміка активності пероксидази сорту томату *Світанок*, мг-екв/хв

Варіанти	Пероксидаза	
	5-й день	10-й день
Контроль	10,73 ± 0,17	10,75 ± 0,19
Саліцилова кислота, 0,04 кг/га	16,45 ± 0,34	15,56 ± 0,43
Епін, 20 мг/га	16,93 ± 0,32	15,85 ± 0,27
Арахідонова кислота, 2,0 мл/га	16,78 ± 0,37	15,77 ± 0,30
Жасмонова кислота, 0,004 кг/га	17,23 ± 0,41	16,29 ± 0,44
Ейкозапентаєнова кислота, 2,0 мл/га	16,75 ± 0,42	15,73 ± 0,38
Корична кислота, 0,04 кг/га	16,39 ± 0,33	15,45 ± 0,40
Хітозар, 4,0 кг/га	17,16 ± 0,34	16,18 ± 0,32
Фітохит-Т, 100 г/га	16,84 ± 0,39	15,82 ± 0,41
Фітоспорін-М, 4,0 л/га	16,28 ± 0,24	15,35 ± 0,32
Силікат натрію, 0,1 кг/га	16,21 ± 0,21	15,29 ± 0,33

Зростання активності пероксидази у варіантах із застосуванням сигнальних молекул свідчить про те, що ці регулятори росту рослин сприяють зростанню толерантності томату проти абіотичного стресу – засолення. На відміну від багатьох інших ферментів, пероксидаза характеризується поліфункціональністю і високою гетерогенністю своєї ізоферментної системи. Відомо, що підвищення активності пероксидази корелює зі збільшенням техногенного навантаження на рослини. Пероксидаза також здійснює окислення органічних речовин ґрунту, зокрема фенолів, амінів та деяких гетероциклічних сполук, за рахунок кисню пероксиду водню та інших органічних пероксидів. Вона виконує захисну функцію, знезаражуючи перекуси та розкладаючи ароматичні ксенобіотики у ґрунті, а також відіграє досить важливу роль у процесі утворення гумусу. Проведене нами визначення активності ферменту пероксидази показало зростання її показників за фоліарної обробки рослин.

Відносна простота біохімічних механізмів та значний набір робіт з біохімічної генетики робить клітинний рівень адаптації рослин найбільш доступним для генетичного вивчення.

Дієвим способом підвищення стресостійкості рослин є застосування фітогормонів. Існують три варіанти гормонального впливу: до початку дії стресора (попередня адаптація, праймінг), одночасно із початком дії стресора (період стресу) і після дії стресора (етап відновлення).

Встановлено позитивний вплив кремнію на зростання стійкості рослин проти посухи. Елемент сприяє підтриманню водного балансу рослин, підвищенню ефективності фотосинтезу, сприяє рівному положенню листків та покращенню структури судин ксилеми за високого рівня транспірації, що викликається високою температурою та дефіцитом вологи. Також було помічено, що оптимальне живлення рослин кремнієм сприяє більш економному споживанню рослиною води для синтезу органічної речовини, зниження транспіраційного коефіцієнта. Зростання стійкості рослин проти засухи, як правило, вважається одним із основних позитивних ефектів кремнію [10]. Виявлено, що поглинання кремнію тісно пов'язане із натрієм і кальцієм, а тому в умовах засолення ґрунтів рослини здатні інтенсивно накопичувати кремній, що сприяє зростанню їх стійкості проти засолення [4].

Важливий вклад у реалізацію захисної дії метилжасмонату вносить його здатність досить активно діяти на склад ендогенної гормональної системи проростків, про що свідчить інформація про зниження в попередньо оброблених метилжасмонатом та підданих зневодненню рослинах стрес-індукованого нагромадження АБК і зниження вмісту ІОК, а також підтримання концентрації цитокінінів у них на рівні контрольних рослин.

Вважається, що додаткове кремнієве живлення забезпечує зниження транспірації води із листків за рахунок зменшення діаметра пор та зниження швидкості руху води по ксилемі [7]. Крім цього, кремній полегшує окислювальний стрес за посухи шляхом регулювання антиоксидантних ферментів [8].

Встановлено, що саліцилова кислота відіграє значну роль у формуванні посухостійкості рослин за рахунок запуску експресії генів, які контролюють індукцію протеїнових кіназ та МАП-кіназ, чим і забезпечують стійкість рослин.

Для боротьби із посухою оптимальним варіантом застосування є поєднання передпосівної обробки насіння томату і обприскування рослин у фазу «ялинки» робочим розчином епіну перед посухою і за відновлення поливу. При цьому значно підвищується оводненість листків, що сприяє відновленню тургору листків, загальний вміст води (% від сирої маси) зростає до 64–67% порівняно з контролем, унеможливується загибель рослин і забезпечується їх подальший розвиток за рахунок кращого розвитку кореневої системи. З'ясовано, що екзогенний епібрасинолід за інтенсивного засолення значною мірою стабілізував деякі фізіологічні показники: вміст фотосинтетичних пігментів, проліну, розчинних фенолів і рівень осмотичного потенціалу. Виявлені зміни у кінцевому результаті сприяли зниженню негативного впливу засолення на фотосинтетичний апарат та ріст рослин.

Висновки

Використовуючи ступінчасту селекцію томату у культурі *in vitro*, відібрано зразки ТТП-1 і ТТП-2, толерантні проти засолення, робота із якими продовжується. Також доведено вплив пероксидази на зростання стійкості рослин за фоліарної обробки сигнальними молекулами.

З'ясовано, що сигнальні молекули беруть активну участь в антиоксидантному захисті

рослин в умовах стресу, викликаного повітряною та ґрунтовою посухою. Вони також діють на показники водообміну рослин в умовах ґрунтової посухи – при цьому встановлено суттєвий вплив їх на ріст та розвиток рослин. Використані нами сигнальні молекули проявляють захисний ефект в умовах стресу: характерною особливістю є те, що вони захищають рослину тим

контрастніше, чим більшою є стресова дія; також беруть активну участь у процесах відновлення після несприятливих дій різних факторів. Зростання активності антиоксидантного ферменту пероксидази теж сприяє активації системної стійкості рослин томату проти високої температури.

References

1. Butenko R.G. Culture of isolated tissues and phytology of plant morphogenesis. M: Nauka, 1964. 270 p. [in Russian]
2. Vnuchkova V.A. Methodical for tomato tissue culture. M: VASKHNIL, 1985. 15 p. [in Russian]
3. Goncharova E.A., Sitnikov M.N., Chesnokov Y.V. Physiological and genetic aspects of the study of the water status of plants in VIR. *Works on applied botany, genetics and breeding*. 2012. T. 170. P. 93–101. [in Russian]
4. Sheudzhen A.H., Kemecheva M.X. Dissemination of silicon in nature and its importance in plant life. *Vestnik MGTI*. 2003. Is 1. P. 125–135. [in Russian]
5. Yarosh N.P., Arasimovich V.V., Ermakov I.A., Peruanskiy Y.V. Determination of the activity of enzymes and their inhibitors. *Methods of biochemical research*. L.: Higher school, 1987. P. 36–84. [in Russian]
6. Fang Y., Xiong L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, № 4. P. 673–689.
7. Gao X., Zou C., Wang L., Zhang F. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. *Plant Nutrition*. 2006. Vol. 29, № 9. P. 1637–1647.
8. Gong H. J., Chen K. M., Zhao Z. G., Chen G. C., Zhou W. J. Effects of silicon on defense of wheat against oxidative stress under drought at different developmental stages. *Biologia Plantarum*. 2008. Vol. 52, № 3. P. 592–596.
9. Hattori T., Ishii K., An P., Inanaga S. Growth Enhancement of rye by silicon application under two different soil water regimes. *J. of plant nutrition*. 2009. Vol. 32, Is. 2. P. 187–196.
10. Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L. et al. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 34197–34203.
11. Langridge P., Reynolds M.P. Genomic tools to assist breeding for drought tolerance. *Curr. Opin. Biotec.* 2015. Vol. 32. P. 130–135.
12. Penfield S. Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytol.* 2008. Vol. 179. P. 615–628.
13. Tugce K., Yasemin E. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *G.U. J. Science*. 2005. Vol. 5, № 4. P. 723–740.
14. Zhu J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*. 2002. Vol. 53, № 1. P. 247–273.

KOVBASENKO R.V., DMITRIEV A.P., POLYAKOVSKY S.A.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148

THE PECULIARITIES OF PLANT BREEDING AND DROUGHT-RESISTANCE MECHANISMS

Aim. To propose a plan of cellular selection of tomato plants for resistance to drought with the use of selective factor is manit. **Methods.** The object of study was the tomato variety *Svitanok*. Work with cell culture *in vitro*, aseptic seed germination, microclonal reproduction, callusogenesis and initiation of morphogenesis were performed according to known methods. **Results.** The influence of peroxidase in the stimulation of protective mechanisms has been established and the role of phytohormones in these processes has been revealed. It was found that when using stepwise selection of tomato cell culture *in vitro*, samples of TTP-1 and TTP-2, tolerant to salinity, were selected and worked on. The effect of peroxidase on the growth of plant resistance during foliar treatment with signaling molecules is also shown. **Conclusions.** It has been shown that signaling molecules are actively involved in the antioxidant protection of plants under stress caused by air and soil drought. The signaling molecules we use have a protective effect under stress: specialty characteristic is a very active part in the recovery process after the adverse effects of various factors. The increase in the activity of the antioxidant enzyme peroxidase also contributes to the activation of the systemic resistance of tomato plants against high temperatures.

Keywords: tomatoes, *in vitro*, peroxidase.