

УДК 602.7:635.55

DOI <https://doi.org/10.32851/2226-0099.2019.107.14>

ЕФЕКТИВНІСТЬ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ЦИКОРІЮ САЛАТНОГО ЕНДІВІЙ ТА ЕСКАРІОЛ

Лук'янець О.Д. – аспірант,

Уманський національний університет садівництва

У статті викладено матеріали щодо вивчення особливостей розмноження цикорію салатного ендівій та ескаріол *in vitro*. У результаті досліджень встановлено, що найбільш ефективною (85,2%) була 1-хвилинна стерилізація експлантів розчином дихлориду ртуті (HgCl₂). Кращі показники (65,4–72,8%) одержали за розмноження експлантів на середовищі MS-3. Водночас значних відмінностей показників гомогенезу залежно від сортів цикорію салатного ендівій та ескаріол не встановлено. Найбільша кількість вкоріненних мікроклонів (88,7%) отримана за використання модифікованого живильного середовища MS-2 з додаванням ІМК у концентрації 0,5 мг/л, де кількість утворених коренів становила 8,1 шт.

Ключові слова: цикорій салатний, ендівій, ескаріол, *in vitro*, стерилізація експлантів, мікроклони, клональне розмноження.

Лук'янець О.Д. Эффективность микроклонального размножения цикория салатного эндивий и эскарюол

В статье изложены материалы по изучению особенностей размножения цикория салатного эндивий и эскарюол *in vitro*. В результате исследований установлено, что наиболее эффективной (85,2%) была 1-минутная стерилизация эксплантов раствором дихлорида ртути (HgCl₂). Лучшие показатели (65,4–72,8%) получили при размножении эксплантов на среде MS-3. При этом значимых различий показателей гомогенеза в зависимости от сортов цикория салатного эндивий и эскарюол не установлено. Наибольшее количество укоренившихся микроклонов (88,7%) получено при использовании модифицированной питательной среды MS-2 с добавлением ИМК в концентрации 0,5 мг / л, где количество образованных корней – 8,1 шт.

Ключевые слова: цикорий салатный, эндивий, эскарюол, *in vitro*, стерилизация эксплантов, микроклон, клональное размножение.

Lukianets O.D. Efficiency of the microcontraction of cycoria of salad endivia and escariol

The article deals with the study of the peculiarities of reproduction of chicory of salad endivia and escariol *in vitro*. As a result of the research, it was found that the most effective (85,2%) was 1-minute sterilization of explants with mercuric dichloride solution (HgCl₂). The best indicators (65,4–72,8%) were obtained at propagation of explants in the medium of MS-3. At the same time, significant differences in the parameters of hemogenesis, depending on varieties of chicory salad endivia and escariol not established. The largest number of rooted microclones (88,7%) was obtained using modified nutrient medium MS-2 with the addition of indulin butyric acid at a concentration of 0,5 mg / l, where the number of formed roots was 8,1 pcs.

Key words: chicory salad, endive, escariol, *in vitro*, explants sterilization, microclone, clonal reproduction.

Постановка проблеми. Серед численних методів вегетативного розмноження важливе місце належить методу мікроклонального розмноження рослин *in vitro*. Це біотехнологічний спосіб вегетативного розмноження, за якого отримують генетично ідентичні вихідній формі рослини-клони. Суть його полягає у використанні здатності рослинних тканин утворювати на живильних середовищах під впливом екзогенних гормонів калюс, листки розетки, рослини [1–5; 6; 7; 8].

Розмноження *in vitro* дає змогу швидко одержати рослини, позбавити їх від грибних та бактеріальних інфекцій, збільшити коефіцієнт розмноження й отримати морфологічно вирівняний матеріал, із цілком успадкованими корисними ознаками. Метод ізольованих клітин і тканин, розроблений для багатьох видів

плодових, лісових, декоративних та інших сільськогосподарських рослин, також широко використовується для вирощування овочевих культур.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Хоча публікації з питань запровадження технологій *in vitro* в селекційно-генетичні та насінницькі дослідження досить часто з'являються в Україні [1] і за кордоном [3; 9; 10], проте низку питань щодо можливості розмноження цикорних салатів у біотехнологічних лабораторіях ще не з'ясовано. Дотепер не розроблено чітких відтворюваних методик, а окремі, що існують, досить трудомісткі та складні і стосуються здебільшого фрагментів технології. Гальмує впровадження технологій *in vitro* також недостатність знань про морфогенні потенції рослин цикорію салатного та способів управління ними в культурі тканин. Нині потребує першочергового вирішення проблема розмноження цінних зразків цикорію салатного із застосування техніки *in vitro*, ефективність якої вже доведена на багатьох культурних рослинах [1; 3; 5; 11; 12; 13].

Постановка завдання. Для вивчення особливостей розмноження цикорію салатного ендивій та ескаріол *in vitro* нами в лабораторії мікроклонального розмноження Національного дендропарку «Софіївка» Національної академії наук України проведені дослідження, якими передбачалося таке:

- підбір вихідного рослинного матеріалу (насіння) для введення *in vitro*;
- стерилізація рослинного матеріалу та введення в культуру *in vitro*;
- підбір живильного середовища з додаванням регуляторів росту;
- гомогенез та розсаджування вторинних експлантів;
- ризогенез експлантів;
- адаптація регенерантів до умов *ex vitro*.

Виклад основного матеріалу дослідження. Відомо, що в культуру *in vitro* можуть бути введені мікроживці, заготовлені з різних частин рослини (корені, пагони, листки, апікальні меристеми тощо), однак кращі результати дає стартовий матеріал зі швидкими темпами росту і розвитку [5; 10]. Матеріалом для досліджень стало насіння цикорію салатного ендивій сортів Сігал, Галанті, Корбі, Жовте серце й ескаріол сортів Очаг і Салгір.

Однією з головних проблем, яку необхідно було вирішити під час застосування культури *in vitro* цикорію салатного ендивій та ескаріол, була дезинфекція посадкового матеріалу перед розміщенням його на живильне середовище. На поверхні насінини або вегетуючої рослини і її частин, пагонів, бруньок, проростків та інших джерел експлантів, є велика кількість різноманітних мікроорганізмів, які здатні рости і розмножуватися на живильному середовищі. У процесі свого росту і розвитку грибові та бактеріальні інфекції не лише використовують поживні речовини живильного середовища, а також значною мірою пригнічують ростові процеси в експлантах. Коли рослина не загинула, часто гальмуються всі біологічні процеси росту і розвитку рослини. Тому стерилізація експлантів повинна бути виконана якомога якісніше.

З метою одержання стерильного, життєздатного рослинного матеріалу стерилізацію проводили у два етапи. Попередня обробка здійснювалася розчином: «Септодор», основна – 0,1% водним розчином дихлориду ртуті (HgCl_2), нітратом срібла (AgNO_3) та мертиолятом натрію ($\text{C}_5\text{H}_9\text{AgNaO}_2\text{S}$) із тривалістю експозиції 0,5 хв., 1 хв. та 1,5 хв. Для більш ефективної дії до реагенту додавали емульгатор «Твін 80». Видалення стерилізуючих речовин проводили шляхом промивання насіння у стерильній воді впродовж 10 хв. Повторність дослідів – триразова. Посуд, матеріали, інструменти та живильні середовища готували згідно із загальноприйнятими методиками [6; 14].

Насіння всіх досліджуваних сортів легко піддавалось стерилізації незалежно від стерилізуючої речовини і концентрації. У результаті досліджень виявлено, що за експозиції 0,5 хв. вихід стерильного насіння не перевищував 13,4–25,6% (рис. 1).

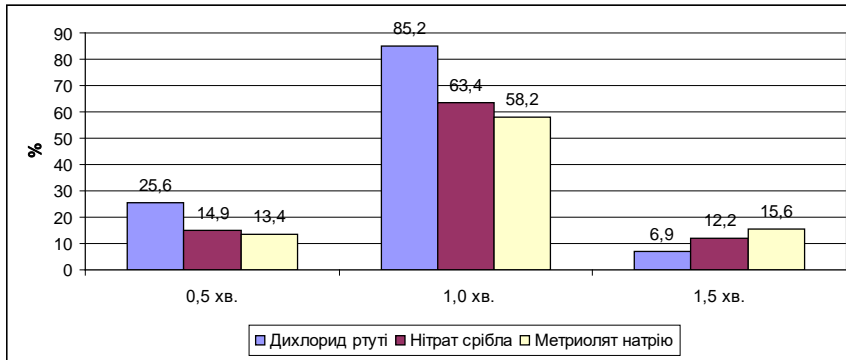


Рис. 1. Вихід стерильного життєздатного насіння залежно від експозиції та стерилізатора, % (середнє, 2014–2018 рр.)

Найбільш ефективною (85,2%) була 1-хвилинна стерилізація HgCl_2 . За використання нітрату срібла стерильність становила 63,4%, а за обробки метриолятом натрію – 58,2%. Збільшення експозиції стерилізації зменшувало вихід стерильного насіння через пошкодження зародка насінини.

Розвиток меристем, експресія або пригнічення тотипотентності значною мірою залежали від умов, у які експланти потрапляли *in vitro*. Серед них найважливішими фізичними чинниками є освітлення, температурний режим, вологість. У наших дослідженнях кращі результати були, коли після стерилізації рослинний матеріал висаджували на живильне середовище і культивували за температури 25 ± 1 °C, у 16-ти годинному фотоперіоді з інтенсивністю освітлення 3–5 кілолюксів і за відносної вологості 75%.

Важливим аспектом біотехнологічної роботи є правильний підбір компонентів живильного середовища, концентрації та співвідношення регуляторів росту в їхньому складі, які і визначають напрями розвитку введеного біоматеріалу. Основою росту тканин і органів рослини є утворення і ріст клітин апікальної меристеми, що проходять низку послідовних етапів: поділу, росту, розтягненням і диференціювання. Реалізація морфогенетичних потенцій апікальних меристем цикорію салатного ендивій та ескаріол *in vitro* залежала від балансу в живильному середовищі компонентів, що забезпечують трофічну (макро- і мікросолі, вуглеводи, амінокислоти) та регуляторну (гормони, вітаміни) функції клітин.

Вирішальним етапом, від якого залежить успіх мікророзмноження рослин, є вибір оптимального живильного середовища для кожного етапу цього процесу. Вибір середовища значною мірою залежить від типу бажаного морфогенезу. Водночас досягти позитивних результатів для кожної культури можна лише коли підібрати відповідне оптимальне живильне середовище та співвідношення ауксинів і цитокінінів у ньому.

Одержаний стерильний матеріал висаджували на живильні середовища Мурагіє і Скуга (МС) із різним вмістом регуляторів росту: цитокініни – 6-бензила-

мінопурином (далі – 6-БАП), ауксини – β -індолилцтова кислота (далі – ІОК), β -індолилмасляна (далі – ІМК), α -нафтилоцтова кислота (далі – НОК). Таким чином отримано три варіанти модифікованих живильних середовищ (табл. 1).

Таблиця 1

Варіанти модифікованих живильних середовищ

Варіант середовища	Фітогормони, мг/л	
	БАП	ауксини
MS-1	0,5	0,1 мг/л ІОК
MS-2	0,5	0,08 мг/л ІМК
MS-3	0,5	0,1 мг/л НОК

Незважаючи на велику кількість експериментальних робіт, присвячених мікро-розмноженню, технологія клонального мікророзмноження ще не розроблена для великої кількості сільськогосподарських культур, зокрема для овочевих. Важливим показником введення в *in vitro* експлантів є отримання гомогенезу. Від загальної кількості успішно простерилізованих і введених в *in vitro* експлантів гомогенез отримано в межах 45,5–72,8% (табл. 2).

Таблиця 2

Гомогенез сортів цикорію салатного залежно від модифікацій живильного середовища, % (2014–2018 рр.)

Сорт (фактор А)	Живильне середовище (фактор Б)		
	MS-1	MS-2	MS-3
Цикорій салатний ескаріол			
Очаг	45,5	61,3	68,9
Салгір	46,8	62,4	70,1
<i>НІР₀₅ факторів: А – 0,98; В – 11,8; взаємодії факторів: АВ – 1,34.</i>			
Цикорій салатний ендивій			
Сігал	51,5	63,1	65,4
Галанті	52,3	60,3	69,5
Корбі	46,5	62,5	72,8
Жовте серце	52,2	63,4	71,2
<i>НІР₀₅ факторів: А – 0,98; В – 12,9; взаємодії факторів: АВ – 2,25.</i>			

Кращі показники (65,4–72,8%) одержали під час розмноження експлантів на середовищі MS-3. Водночас значних відмінностей показників гомогенезу залежно від сортів цикорію салатного ендивій та ескаріол не встановлено.

У результаті вдалого підбору БАП, ІМК, ІОК і НОК та кількісного їх співвідношення створені пагони потребували періодичного пасажування, тривалість якого становила 10–15 діб із кількістю пасажів 5–6. Коефіцієнт розмноження для досліджуваних сортів цикорію салатного становив 12,1–20,4 (табл. 3).

Таблиця 3

**Коефіцієнт розмноження сортів цикорію салатного
залежно від модифікацій живильного середовища (2014–2018 рр.)**

Сорт (фактор А)	Живильні середовища (фактор В)		
	MS-1	MS-2	MS-3
Цикорій салатний ескаріол			
Очаг	12,1	13,2	15,2
Салгір	15,2	16,8	18,1
<i>НІР₀₅ факторів: А – 2,9; В – 1,8; взаємодії факторів: АВ – 1,14.</i>			
Цикорій салатний ендивій			
Сігал	14,6	15,3	17,8
Галанті	15,9	17,9	19,2
Корбі	16,1	18,5	20,4
Жовте серце	14,4	17,9	20,1
<i>НІР₀₅ факторів: А – 1,08; В – 0,46; взаємодії факторів: АВ – 1,56.</i>			

На живильному середовищі MS-1 високий коефіцієнт розмноження зазначено в цикорію салатного ескаріол сорту Салгір (15,2) та цикорію салатного ендивій сорту Корбі (16,1). Таку ж закономірність спостерігали і за пророщування експлантів на живильному середовищі MS-2, з показниками коефіцієнта розмноження 16,8–12,5 відповідно. Найвищий коефіцієнт розмноження зафіксовано за використання для пророщування живильного середовища MS-3 – 15,2–20,4.

Для індукції ризогенезу використовували експланти, що досягли довжини 4–5,5 см, які відокремлювали від материнської рослини і пересаджували на базові живильні середовища з концентрацією ІОК 0,1–1 мг/л, вмістом сахарози 25 г/л та відповідною кількістю вітамінів (табл. 4).

Таблиця 4

**Склад модифікованого живильного середовища
для індукування ризогенезу цикорію салатного в культурі *in vitro***

Живильне середовище	Вітаміни, мг/л					ІМК, мг/л	Сахароза, г/л
	В ₁	В ₅	В ₆	РР	С		
MS-1	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,1	25
						0,5	
						1	
MS-2						0,1	
						0,5	
						1	
MS-3	0,1						
	0,5						
	1						

Зауважимо, що залежно від джерела ауксинів укорінення мікроклонів цикорію салатного *in vitro* було неоднаковим і становила в середньому 33,6–88,7% (табл. 5).

Таблиця 5

**Укорінення мікроклонів цикорію салатного *in vitro*
залежно від джерела ауксинів (2014–2018 рр.)**

Середовище для ризогенезу		Кількість укорінених мікроклонів, %	Середня кількість коренів, шт.	Середня довжина кореня, см
MS-1	0,1 ІМК, мг/л	47,5	6,2	1,1
	0,5 ІМК, мг/л	55,8	8,3	1,3
	1 ІМК, мг/л	49,7	7,4	1,2
MS-2	0,1 ІМК, мг/л	85,3	7,6	1,2
	0,5 ІМК, мг/л	88,7	8,1	1,5
	1 ІМК, мг/л	84,3	7,3	1,3
MS-3	0,1 ІМК, мг/л	42	5,4	1
	0,5 ІМК, мг/л	39,6	3,6	0,9
	1 ІМК, мг/л	33,6	5,4	0,6
НІР ₀₅		4,8	2,1	1,8

Найбільша кількість укорінених мікроклонів (88,7%) отримана за використання модифікованого живильного середовища MS-2 з додаванням ІМК у концентрації 0,5 мг/л, де кількість утворених коренів становила 8,1 шт. Підвищення концентрації до 1 мг/л призводило до зниження ризогенезу, а за комплексного використання в середовищі ІОК і НОК у різних концентраціях спостерігалось зниження кількості вкорінених експлантів. Очевидно, такий ефект можна пояснити синергізмом дії ІОК і НОК.

Пересадка рослин-регенерантів у ґрунтовий субстрат – відповідальний етап, що завершує процес клонального мікророзмноження. Період адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересадки рослин у ґрунт спостерігається зупинка в рості, опадання листя і загибель 100% рослин, зокрема через інтенсивний розвиток грибкових і бактеріальних захворювань.

На даному етапі, під час перенесення рослин-регенерантів цикорію салатного в нестерильні умови, значну увагу необхідно приділити встановленню оптимальної фази розвитку рослин-регенерантів, під час якої вони найбільш пристосовані до перенесення в нестерильні умови. Не кожна рослина, яка росла у пробірці й утворила корінь, здатна до адаптації.

За даними наших спостережень, до адаптації здатні рослини здебільшого в такій фазі розвитку, коли вони мають добре сформований центральний пагін або кілька пагонів з однією або кількома парами листків, здатних до фотосинтезу, мають добре сформований корінь, надзвичайно важлива наявність кореневих волосків, які у всисній зоні виконують функції поглинання із ґрунту води і мінеральних речовин. Такі рослини здатні до продовження свого росту і розвитку після умов *in vitro* та до успішної адаптації в умовах *ex vitro*. За адаптації рослин цикорію салатного, у нашому досліді, розмір коренів становив 1–2 см, водночас бічних корінців налічувалося від 4 до 6 шт. Рослини були у фазі розвитку 2–4 листочків.

На даному етапі для забезпечення фізіологічних процесів рослинам необхідні хімічні елементи і речовини. Частина з них потрібна у значних кількостях, це азот, фосфор, калій, кальцій, магній тощо. До них належать залізо, марганець, цинк, мідь, бор, молібден та ін. Усі з названих елементів життєво необхідні для житте-

діяльності рослин. Тому склад субстрату, наявність у ньому необхідних рослинних живильних речовин є важливою складовою під час адаптації. Для адаптації досліджуваних сортів цикорію салатного в умовах *ex vitro* нами використано п'ять різних субстратів із різним вмістом NPK.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що досліджувані субстрати забезпечили приживання адаптованих рослин на рівні 65,4–88,9% (табл. 6). Найбільш ефективними виявилися субстрати Есо-plus універсальний, Поліський універсальний та Klassmann Deilman, на яких приживання адаптованих рослин становило 81,8–88,9, 75,3–81,8 та 79,3–86,2%.

Таблиця 6

**Приживання рослин-регенерантів цикорію салатного
в умовах *ex vitro* (2014–2018 рр.)**

Сорт	Субстрат				
	ПТС	Есо-plus універсальний	Кротовинка	Подільський універсальний	Klassmann Deilman GmbH
	Приживання, %				
Цикорій салатний ендивій					
Сігал	66,3	81,8	73,6	75,3	79,3
Галанті	65,4	84,5	72,6	77,7	82
Корбі	68,2	86,2	75,7	79,3	83,6
Жовте серце	70,4	88,9	78,1	81,8	86,2
Цикорій салатний ескаріол					
Очаг	65,9	86,6	73,1	79,7	84
Салгір	68,7	83,9	76,3	79,2	81,4

Водночас найвищий показник приживання рослин-регенерантів незалежно від складу субстрату зазначено в сорту цикорію салатного ендивій Жовте серце – 70,4–88,9%.

Висновки. Проведеними дослідженнями встановлено, що методи мікроклонального розмноження *in vitro* є однією з перспективних ланок технології вирощування цикорію салатного ендивій та ескаріол. Для отримання стерильних експлантів ефективно використання дихлориду ртуті ($HgCl_2$) за однохвилинної стерилізації.

Найкращим середовищем для розмноження експлантів було MS-3 з концентрацією 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК, а для індукції ризогенезу найбільш ефективним виявилось живильне середовище MS-2 з концентрацією ІМК 0,5 мг/л.

Дослідженнями умов адаптування вкорінених рослин-регенерантів встановлено, що ефективними методами є адаптація пробіркових рослин із використанням субстрату Есо-plus універсальний. Приживлюваність рослин-регенерантів за такої умови становила 81,8–88,9%.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. Київ : Поліграф-Консалтинг, 2003. 520 с.
2. Поліщук В.В., Рябовол Л.О., Чучмій І.П. Калюсотвірна і регенераційна здатність сортів, гібридів та інбредних ліній кукурудзи. *Збірник наукових праць Уманської ДДА*. Київ : Знання України, 2000. Вип. 52. С. 36–39.

3. Рябовол Л.О. Методи отримання калюсної тканини *Cichorium intybus* L. у культурі *in vitro*. *Збірник наукових праць Інституту цукрових буряків УААН*. 2007. Вип. 9. С. 108–113.
 4. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. Москва : Наука, 1986. 280 с.
 5. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1998. Т. 14. № 4. С. 298–317.
 6. Калинин Ф.А., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев : Наук. думка, 1980. 488 с.
 7. Анастасов А.А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск : ИЦИГ СО РАН, 1993. 240 с.
 8. Китаева М.И. Біотехнології в допомогу огороднику. URL: www.divo-gorod.narod.ru/biotexnologii-v.
 9. Свирщевская А.М., Бормотов В.Е. Культура тканей сахарной свеклы. Минск : Вышейша школа, 1994. 141 с.
 10. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / М.А. Банникова и др. *Цитология и генетика*. 1995. Т. 29. № 6. С. 14–22.
 11. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной ploидности. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2000. Т. 32. № 5. С. 362–368.
 12. Jacq V., Tetu T., Sangwan R. Plant regenerated from in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and flowcytometric nuclear DNA analysis of regenerants. *Plant Cell Rep*. 1992. № 11. P. 329–333.
 13. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. Киев : Наукова думка, 1992. 154 с.
 14. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ : Логос, 2005. 730 с.
-