РОЗДІЛ 3
МЕТОДИ Й МЕТОДИКА СЕЛЕКЦІЙНОГО ТА НАСІННИЦЬКОГО ПРОЦЕСІВ

УДК 633:78:576.535

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ *CICHORIUMINTYBUS* L. В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Л.О. Рябовол
Уманський державний аграрний університет

У статті представлено результати досліджень розробки методів отримання калюсної тканини з різних типів експлантів цикорію коренеплідного в культурі in vitro.

Одним із ефективних біотехнологічних методів, що дозволяє прискорити розмноження цінного селекційного матеріалу та отримання нового, є використання морфогенезу калюсної біомаси. Калюсна тканина формується як відповідь на поранення біоматеріалу, в результаті якого паренхімні клітини переходять до активного поділу та індукують недиференційовану тканину [1].

Виявлення здатності до утворення калюсу *in vitro* залежить від біовиду та генотипу рослин, експресії конкретних генів, підбору експланту, умов культивування. Якщо калюсоутворення детерміновано генетично і клітини перебувають у стані компетентності до індукуючих факторів, то досить одного вичленування експланту і перенесення в культуру *in vitro* на живильне середовище, навіть без регуляторів росту, щоб розпочалась активна проліферація клітин. В інших випадках для індукції калюсоутворення потрібно застосувати спеціальні передобробки вихідного матеріалу, специфічні умови вирощування експлантів, використовувати різні типи регуляторів росту, які стимулюють дедиференціювання і проліферацію клітин. Це зумовлено відмінностями між експлантами за наявністю і станом (компетентністю) генів, що визначають метаболізм фітогормонів або регулюються гормонами [2, 3, 4].

Для переважної більшості біовидів калюсогенез індукується підвищеними концентраціями в живильному

середовищі регуляторів росту класу ауксинів (індолілоцтова кислота (ЮК), 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д)) та експлантами, виділеними з онтогенетично молодих тканин і органів із високим потенційним рівнем проліферативної активності [4, 5].

Основним питанням при індукції калюсогенезу залишається морфогенетична активність калюсної біомаси.

Для виду *Cichorium intybus* L. дане питання залишається не вивченим. Тому основною метою наших досліджень було розробка методів для індукції формування калюсної маси з різних типів експлантів цикорію коренеплідного, а також підбір живильного середовища для ефективного наростання клітин при субкультивуванні калюсної тканини.

Суттєвим питанням в даній серії досліджень було отримання розпушеного калюсу в нульовому пасажі, що є важливою передумовою для подальшої роботи з вивчення морфогенетичного потенціалу калюсної біомаси, органогенні властивості якої мають прямо пропорційну залежність щодо її консистенції.

Експлантами для отримання калюсної тканини слугували листкові пластинки, черешки та апікальна меристема рослин цикорію коренеплідного.

Простерилізований рослинний матеріал надрізали в кількох місцях і переносили на агаризоване живильне середовище. Розміщували експланти на субстраті таким чином, щоб ушкоджені ділянки контактували з компонентами середовища.

В основу живильного субстрату входили макро- і мікроелементи за прописами середовищ Мурасіге-Скуга (MS), Гамбурга (B_5), Шенка-Хільдебрандта (SH) [6]. Модифікували середовища підвищеними концентраціями ауксинів та незначною кількістю цитокінинів. Варіанти досліду відрізнялись за концентраціями в їх складі 2,4-Д (0,5-1,5 мг/л).

Біоматеріал культивували без світла (в термостатах) і в світлових (в культуральних) умовах при інтенсивності освітлення 2 кЛк, температурному режимі 22-25°С та відносній вологості 75%.

Проведені нами спостереження показали, що протягом перших п'яти - семи днів культивування помітних змін у стані всіх експлантів відмічено не було. Починаючи з восьмого дня культивування в тканинах експлантів спостерігали морфологічні зміни. Відбувалася деформація біоматеріалу (потовщення тканини експланту, зміна кольору, гофрування поверхневих тканин експланту, крихкість) за рахунок проліферації клітин.

Швидкий хаотичний поділ клітин біоматеріалу при інтенсифікації мітотичних циклів призводив до ініціації калюсогенезу різних типів експлантів. Проте інтенсивність наростання калюсу залежала як від типу початкового матеріалу, так і від складу живильного середовища.

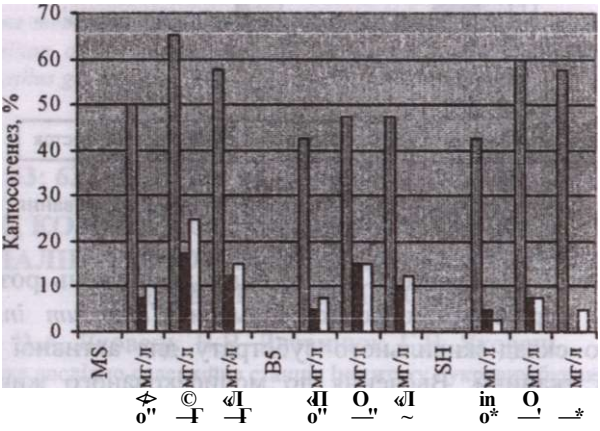
В дослідах для індукції калюсогенезу цикорію коренеплідного нами було вивчено 48 варіантів живильних субстратів. Критерієм ефективності кожного варіанту живильного середовища була тривалість культивування біоматеріалу від експланту до початку появи первинного калюсу та реакція типу експланту на культуральне середовище щодо інтенсивності наростання калюсної маси.

В процесі роботи доведено, що максимальна здатність тканин експланту ініціювати капюс виявлялась на середовищі, до складу якого входили макро-, мікроелементи за MS_5 5 мг/л Fe-хелат, 5 мг/л гліцину, 1 мг/л {З-аланіну, 1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,05 мг/л гібереліновоі кислоти, 30 г/л сахарози. На даному субстраті до 65,0% експлантів формували калюс. Вищі концентрації регулятора росту (1,5-2 мг/л 2,4-Д) також стимулювали калюсоутворення, проте формували, як правило, калюс з низьким морфогенним потенціалом. Виділене середовище стало базовим для ініціації калюсної тканини цикорію коренеплідного з різних типів експлантів (рис.1).

Найкращим експлантом для ініціації первинного калюсу була апікальна меристема вегетативної бруньки, проте не виключена можливість ініціації калюсогенезу з листової пластинки та черешка.

При використанні в якості експланту листової пластинки, важливу роль відіграє вік листка та частина, з якої береться експлант для ініціації калюсогенезу. Доведено, що по мірі збільшення віку листкової пластинки рослини цикорію,

інтенсивність наростання калюсу зростає. У варіантах досліду, де експлантами слугували диски, виділені із старих листків сформованих на початку вегетації рослини, до 25 % висадженого біоматеріалу формувало первинний калюс. У варіантах, де дискові пластинки відбирали з молодих листочків верхівки генеративного пагона, формування калюсної тканини отримали на рівні 7,0 % (рис.2).



• Апікальна меристема • черешок • листок

Рис. 1. Вплив 2,4-Д на калюсотворні властивості різних типів експланту цикорію при зміні основного живильного середовища

Окрім того, відбір експланту з різних частин листової пластинки є важливим фактором щодо оптимізації розвитку калюсної біомаси. Про це свідчить той факт, що базальна частина листкової пластинки має вищу здатність до калюсогенезу, ніж молода дистальна, тобто, верхівкова частина. При виділенні диску з дистальної частини листка отримали на 10 пунктів нижчий відсоток калюсогенезу, ніж із базальної частини. Експлант з дистальної частини молодих листків не індукував розвиток калюсу.

При ініціації калюсної тканини з черешків калюсоформування отримали на рівні варіанту, в якому експлантами слугували диски, виділені з дистальної частини листкової пластинки.

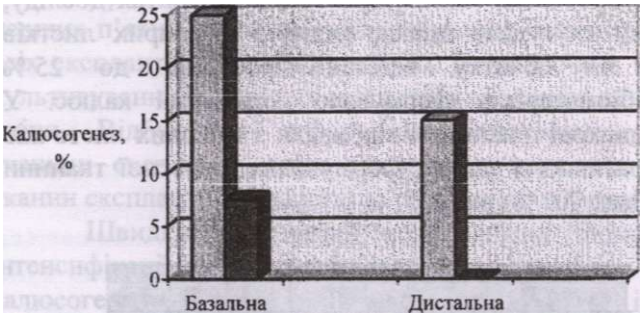


Рис.2. Вплив віку листкової пластинки та її частин на формування калюсної біомаси

Отже, в результаті проведених досліджень розроблено методику отримання калюсної біомаси *Cickorium intybus* L. Підібрано склад живильного субстрату для активної індукції калюсної тканини. Введення до модифікованого живильного середовища MS 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти, 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину, 0,05 мг/л гібереліновой кислоти дозволяє стимулювати розвиток калюсу з різних типів експланту. Найкращим експлантом визначено апікальну меристему бруньки.

При використанні в якості вихідного матеріалу дисків листкової пластинки, зафіксовано нерівномірну чутливість віку та різних частин листка до калюсотвірної здатності. Інтенсивніше формується калюс із тканин базальної частини листкової пластинки рослин тривалої вегетації, ніж із тканин верхівки молодих листків.

Список літератури

1. Бутенко Р.Т. Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986,-280с.

2. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Биополимеры и клетка. - 1998. - Т. 14, № 4 - С. 298-317.

3. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. - 1999.-Т. 15, №5,-С. 235-252.

4. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. -К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003.-520с.

5. Калинин Ф.А., Сарнацкая В В., ГІолищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наукова думка, 1980.- 488с.

6. Биотехнология растений: культура клеток. / Под ред.. Бутенко Р.Г. М.: Агропромиздаг, 1989. - С. 8-32.

Разработаны методы формирования каллусной биомассы цикория корнеплодного. Подобран состав питательной среды и условия культивирования для инициации каллусогенеза различных типов экспланта.

Some methods of formation of callus hiomass of root chicory are worked out. Composition of the nutrient medium and conditions of cultivation for the initiation of callus genesis of various types of explants are defined.

УДК 633. 63: 631. 52: 632. 938

МЕТОД КОМПЛЕКСНОГО ДОБОРУ СЕЛЕКЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ НА СТІЙКІСТЬ ДО ГНИЛЕЙ КОРЕНЕПЛОДІВ

В.А. Яковець, В.В. Литвинюк, Г.В. Яковець

Ялтушківська дослідно-селекційна станція Інституту цукрових буряків УААН

Розроблений метод ранньої діагностики стійкості рослин цукрових буряків до гнилей для оцінки і добору селекційних матеріалів, який передбачає послідовне використання комплексу основних збудників в єдиному технологічному процесі.

Вступ. Останнім часом спостерігається посилення ураженості гнилями сходів молодих рослин та коренеплодів цукрових буряків в період вегетації та при їх зберіганні. В селекції на стійкість до гнилей, як правило, застосовуються інфекційні фони, які передбачають використання одного з патогенів, так як в суміші збудників знижується ефективність добору. Розроблені методи ранньої діагностики стійкості рослин до коренеїду і гнилей коренеплодів [7, 2, 4, 1, 3]. Для ранньої діагностики стійкості до гнилей коренеплодів використовуються штеклінги або черешки рослин [8, 2, 7]. В зв'язку зі зростанням шкодочинності гнилей цукрових буряків, різноманітністю видового складу збудників виникла необхідність розробки більш ефективних методів селекції. Вони передбачають використання штучних інфекційних фонів, які дають можливість провести достовірну оцінку селекційних матеріалів і сортів до комплексу основних збудників з одночасним