

Волинський національний університет імені Лесі Українки

Факультет біології та лісового господарства

Кафедра лісового та садово-паркового господарства

**Валентина Андрєва**

**Тетяна Бортнік**

**Юлія Рибак**

**Марія Шепелюк**

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

до виконання лабораторних робіт

ЛУЦЬК – 2022

**УДК 60(072)**  
**Б 63**

*Рекомендовано до друку науково-методичною радою Волинського національного університету імені Лесі Українки (протокол № від 24 лютого 2022 року).*

**Рецензенти:**

**С. О. Волгін** – д. б. н., професор кафедри ботаніки і методики викладання природничих наук

**А. М. Бортнік** – канд. с.-г. наук, старший науковий співробітник Поліської дослідної станції Національного наукового центру «Інститут ґрунтознавства і агрохімії О.Н. Соколовського»

**Андреєва В. В.**

**Б 63** Біотехнологія: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 091 «Біологія» / В. В. Андреєва, Т. П. Бортнік, Ю. Л. Рибак, М. О. Шепелюк. Луцьк, 2022. 47 с.

У рекомендаціях наведено методичні поради щодо виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнологія». Розглядаються основні принципи підготовки поживних середовищ, методи стерилізації, способи мікроклонального розмноження сільськогосподарських та ягідних культур, принципи отримання клітинної суспензії.

Рекомендовано студентам 3 курсу факультету біології та лісового господарства спеціальності 091 «Біологія».

**УДК 573.6 (072)**

**Б 63**

© В. В. Андреєва, Т. П. Бортнік,  
Ю. Л. Рибак, М. О. Шепелюк, 2022

© Волинський національний  
університет імені Лесі Українки,  
2022

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>Техніка безпеки і правила роботи в біотехнологічній лабораторії</b> .....	6
<b>Тема 1. ТЕХНІКА КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН РОСЛИН В УМОВАХ <i>IN VITRO</i></b> .....	10
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1. Приготування поживного середовища Мурасіге-Скуга для культивування ізолюваних клітин і тканин рослин в <i>in vitro</i> .....	10
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2. Методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізолюваних клітин і тканин рослин.....	17
<b>Тема 2. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН</b> .....	20
<b>Розділ 2.1. ПРЯМИЙ ОРГАНОГЕНЕЗ</b> .....	23
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3. Виділення і культивування в умовах <i>in vitro</i> апікальних меристем картоплі.....	23
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4. Мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів.....	25
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5. Виділення і культивування апікальних меристем суниці.....	28
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6. Індукція коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці.....	30
<b>Розділ 2.2. КАЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН</b> .....	31
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7 Одержання і культивування калусу із стебел стерильних рослин картоплі .....	33
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8. Пасажування калусної тканини на свіже поживне середовище.....	34
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 9. Отримання первинного калусу з листових експлантів інтактноі рослини .....	35
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 10. Отримання калусу з пиляків вишні і яблуні .....	38
<b>Розділ 2.3. КУЛЬТУРА СУСПЕНЗІЙ</b> .....	35
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 11. Отримання клітинної суспензії з калусної тканини.....	38
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 12. Посів суспензії на тверде агаризоване середовище.....	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	41
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	42
<b>ДОДАТКИ</b> .....	43
Таблиця 1. Поживне середовище <i>Мурасіге-Скуга</i> для вирощування ізолюваних тканин і клітин рослин в умовах <i>in vitro</i> .....	43
Таблиця 2. Модифіковане поживне середовище <i>Мурасіге-Скуга</i> для культивування апікальних меристем картоплі.....	43
Таблиця 3. Основні методи стерилізації органів рослин при введенні їх у культуру <i>in vitro</i> .....	44
Таблиця 4. Модифіковане поживне середовище <i>Мурасіге-Скуга</i> для мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів.....	45
Таблиця 5. Модифіковане поживне середовище <i>Мурасіге-Скуга</i> для культивування апікальних меристем суниці.....	45
Таблиця 6. Поживне середовище для коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці.....	45
Таблиця 7. Поживне середовище для культивування калусу із стебла картоплі.....	46
Таблиця 8. Склад поживних середовищ для культивування калусної тканини картоплі.....	46

## ВСТУП

Біотехнологія відома з давніх часів, але як самостійна прикладна наука сформувалася в середині 60-х років ХХ сторіччя, коли людство усвідомило необхідність першочергового рішення, на принципово нових основах, найголовніших проблем сучасності – продовольчої, енергетичної, ресурсної, забруднення навколишнього середовища і ін.

В даний час в багатьох країнах світу розвитку біотехнології надається першорядне значення через ряд істотних переваг перед іншими видами технологій: біотехнологічні процеси володіють низькою енергоємністю, майже безвідходні, екологічно чисті. Разом з тим, ці технології передбачають використання стандартного устаткування і препаратів, а також проведення досліджень круглий рік, незалежно від кліматичних умов, займаючи при цьому незначні площі.

Біотехнологія як наука базується на використанні біологічних процесів в техніці і промисловому виробництві. Одним з центральних напрямків досліджень біотехнології є клітинна біотехнологія, яка базується на використанні культури ізольованих клітин, тканин і протопластів. Для того, щоб маніпулювати клітинами, потрібно виділити їх з рослини і створити такі умови, при яких вони могли б жити і розмножуватися поза рослинним організмом.

Метод культивування ізольованих клітин і тканин на штучних поживних середовищах в стерильних умовах *in vitro* отримав назву культури ізольованих тканин і придбав особливе значення у зв'язку з можливостями використання його в біотехнології

В світлі сучасних уявлень клітинна біотехнологія – це поєднання методів культури клітин і тканин рослин з методами молекулярної біології і технікою рекомбінантних ДНК. Створена система – клітини і тканини вищих рослин, що вирощуються поза організмом на штучних поживних середовищах у строго контрольованих умовах, – дозволяє вивчати ріст, клітинне диференціювання і розвиток рослинного організму, розробляти нові клітинні технології для промисловості і сільського господарства.

Використання мікроклонального розмноження (МКР) рослин дає змогу вирішувати важливі проблеми рослинництва, а саме: в десятки і сотні тисяч разів збільшити коефіцієнт розмноження рослин, отримати здоровий, позбавлений вірусної й бактеріальної інфекції посадковий матеріал. Цей метод можна застосовувати і у селекційній роботі для репродукції нових гібридних сортів і отримання трансформованих рослин, а також за його допомогою зберегти генофонд рідкісних і зникаючих видів природної флори.

Метод культури ізольованих тканин незамінний у дослідженні послідовності метаболічних процесів при індукції проліферації, вивченні біохімії клітинного циклу, механізму морфогенезу, дії фітогормонів, а також створенні нових форм рослин за допомогою генної інженерії.

Технологія МКР рослин постійно розвивається й удосконалюється: в культуру вже введено понад 1000 видів декоративних, овочевих, технічних і деревних рослин.

Мікроклональне розмноження має ряд переваг порівняно із звичайним методом вегетативного розмноження: високий коефіцієнт розмноження; оздоровлення рослин від вірусів і патогенних мікроорганізмів; прискорення селекційного процесу; розмноження рослин, які важко або зовсім не розмножуються вегетативно; економність; отримання молодих рослин (омолодження старих особин); підтримання круглорічного росту рослин.

Слід зазначити, що ефективність і рентабельність цього методу розмноження можливі лише у разі залучення кваліфікованих спеціалістів і чіткої організації усіх етапів процесу. Цьому певною мірою сприятиме і лабораторний практикум з курсу «Біотехнологія» для студентів спеціальності «Біологія» біологічного факультету.

*Основною метою виконання лабораторних робіт* – освоєння студентами принципів і методик стерилізації приміщень, рослинного матеріалу, посуду, інструментів і поживних середовищ; приготування поживних середовищ; виділення апікальних меристем рослин; отримання, культивування і пасажування калусних тканин; отримання і пасажування суспензійних культур.

У методичних рекомендаціях подано зміст, опис і послідовність виконання лабораторних занять, які передбачають аудиторну і позааудиторну роботу студентів спеціальності «Біологія», можуть бути використанні лаборантами спеціалізованих біотехнологічних лабораторій, аспірантами, вчителями-біологами, науковими співробітниками та іншими фахівцями, які цікавляться досягненнями сучасної біологічної науки і практики.

## **ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ І ПРАВИЛА РОБОТИ В БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ**

Робота в біотехнологічній лабораторії вимагає строгого дотримання спеціальних правил, пов'язаних із забезпеченням стерильності досліджень. У лабораторії не повинно знаходитися ніяких зайвих предметів. Слід регулярно проводити гігієнічне прибирання лабораторних приміщень.

Забезпечити повну стерильність лабораторії дуже важко і це не завжди необхідно, але значно понизити кількість мікроорганізмів в повітрі і на різних поверхнях, в лабораторних приміщеннях можливо. Для цього застосовують різні способи дезинфекції. Слово «дезинфекція» означає знезараження, тобто знищення збудників інфекційних хвороб на об'єктах зовнішнього середовища.

### **1. Обробка приміщень біотехнологічної лабораторії**

Підлогу, стіни і меблі в біотехнологічній лабораторії протирають розчином різних дезинфікуючих речовин. Як дезинфікуючі розчини найчастіше використовують дво-, трьохпроцентний розчин бікарбонату натрію, трьох-, п'ятипроцентний водний розчин фенолу (карболової кислоти), лізолу (препарату фенолу з додаванням зеленого мила) або трипроцентний водний розчин хлораміну і деякі інші дезинфікуючі речовини.

Повітря в лабораторії очищають провітрюванням – це найбільш простий спосіб. Тривала вентиляція приміщення (не менше 30-60 хвилин) різко знижує кількість мікроорганізмів в повітрі, особливо при значній різниці в температурі між зовнішнім повітрям і повітрям приміщення.

Ефективніший і найбільш часто використовуваний спосіб дезинфекції повітря – ультрафіолетове опромінювання променями з довжиною хвилі від 260 нм. Ці промені володіють високою антимікробною активністю і можуть викликати загибель не тільки вегетативних клітин, але і спор мікроорганізмів. В залежності від ступеня забруднення повітря для його стерилізації потрібне опромінювання від 20 хвилин до декількох годин. Як джерело ультрафіолетового випромінювання використовуються бактерицидні лампи. Випромінювачем в них служить електрична дуга, що виникає в парах ртуті низького тиску. Зазвичай бактерицидними лампами є трубки різного діаметру і довжини, виготовлені із спеціального скла. Кожна трубка вмонтована в корпус-утримувач і може бути забезпечена відбивачем. Необхідно мати на увазі, що ультрафіолетові промені можуть викликати важкі ураження очей, тому при роботі з бактерицидними лампами потрібно строго стежити за тим, щоб ні прямі, ні відбиті ультрафіолетові промені не попадали в очі. У невеликих приміщеннях при включеній бактерицидній лампі знаходитися не можна.

Робоче місце, де безпосередньо працюють з ізольованими культурами, вимагає особливо ретельної обробки. Робочий стіл слід дезинфікувати не тільки до початку роботи, але і після її закінчення. Для протирання поверхні столу можна використовувати розчини лізолу і хлораміну, а також 70%-і розчини ізопропілового і етилових спиртів. Названі спирти можна також застосовувати для дезинфекції рук. У тих випадках, коли поверхня столу покрита водовідштовхувачими речовинами, особливо зручний лізол. Поверхню робочого столу можна дезинфікувати і ультрафіолетовими променями. При цьому слід враховувати, що бактерицидна дія променів тим вище, чим ближче опромінювана поверхня до джерела випромінювання.

### **2 Правила техніки безпеки при роботі в біотехнологічній лабораторії**

#### **2.1. Загальні правила роботи студентів у лабораторії**

Підготовку лабораторії до занять проводить лаборант.

Студенти, виконуючи завдання, повинні дотримувати наступні правила:

1. Кожен студент в біотехнологічній лабораторії працює на постійному місці, виконуючи завдання індивідуально.

2. На робочому місці не повинно бути сторонніх предметів, особисті речі студентів слід зберігати в спеціально відведеному місці.

3. Студент повинен працювати тільки в чистому халаті, змінному взутті, волосся має бути підібрані, не падати на плечі.

4. При роботі з ізолюваними культурами необхідно дотримуватись всіх правил техніки: на пробірках, колбах, чашках Петрі має бути зроблений напис, що містить родові і видові назви культури, дату посіву, прізвище студента і номер групи.

5. Не дозволяється залишати відкритими чашки Петрі, пробірки, колби з культурами.

6. Строго дотримуватись правил поводження з хімічними реактивами і фарбниками.

7. З великою обережністю користуватися сумішшю спирту з ефіром, не переносити її на столи з пальниками.

8. Набирати речовини лише піпеткою з грушею.

9. У жодному випадку не можна дути на ватну пробку, що зажевріла, оскільки це тільки підсилить горіння, її потрібно швидко ввести в пробірку, де вата сама потухне.

10. Всі предмети, використані при роботі з культурами, мають бути знезаражені або обпаленням в полум'ї пальника (петлі, голки), або зануренням в дезінфікуючий розчин (предметні та покривні скельця, піпетки, шпатель).

11. Всі засіяні пробірки, чашки поміщаються в термостат або здаються лаборантові; відпрацьований матеріал (пробірки, чашки Петрі) також поміщаються в певні ємності по вказівці лаборанта для їх подальшого знезараження.

12. В кінці заняття студент повинен привести в порядок робоче місце, ретельно вимити руки; необхідно мати індивідуальний рушник, серветки для витирання рук.

13. Перед виходом з лабораторії черговий повинен перевірити, чи вимкнені газ, вода, електроприлади.

Кожен студент веде журнал лабораторних робіт, який є документом, що дозволяє контролювати правильність отриманих результатів. Записи проводяться в певній послідовності і повинні містити наступне:

а) номер роботи, її назву, дату постановки і закінчення досліджу;

б) об'єкт дослідження;

в) умови проведення досвіду, включаючи методи аналізів;

г) отримані результати і висновки.

## **2.2. Правила роботи з хімічними реактивами**

1. Всі хімічні реактиви повинні зберігатися у спеціальній тарі, мати ярлики з чітким позначенням вмісту.

2. Забороняється зберігати у лабораторії хімічні сполуки невідомого походження з подальшим їх використанням.

3. Скляні ємності з концентрованими розчинами повинні бути сухими і чистими ззовні і вміщені у корзини, які мають прокладки з тирси, змоченої негорючими матеріалами.

4. Під час роботи з кислотами і лугами, потрібно:

- розливаючи кислоти, використовувати скляні трубопроводи із сифонами;

- переливання «димлячи» кислот проводити тільки у витяжних шафах;

- готуючи розчини кислот, кислоту вливати у воду при охолодженні, а не навпаки, тому що під час взаємодії кислоти з водою відбувається виділення великої кількості тепла, внаслідок чого суміш може розбризкуватися;

- розчинення лугів проводити у глибоких фарфорових чашках з постійним перемішуванням і охолодженням у витяжній шафі;

- всі роботи з великими об'ємами концентрованих розчинів лугів і кислот проводити тільки в гумових рукавичках, захисних окулярах, халатах;
- розливати концентрований розчин аміаку тільки у протигазах;
- якщо кислота або луг попали на стіл чи підлогу, розчин спочатку змити великою кількістю води, а потім нейтралізувати і знову промити.

5. Аптечка повинна містити: розчин йоду (5%), вату, валеріанові краплі, насичений розчин  $KMnO_4$ , спирт, розчин  $NaHCO_3$  (2%), розчин бури (2%), розчин оцтової кислоти (5%), розчин  $NH_4OH$  (3%), розчин  $(NH_4)_2CO_3$  (10%), кристали  $NaHCO_3$  або  $CaCO_3$ , вапняну воду.

### **2.3. Основні правила роботи з електроприладами**

1. Електронагрівальні прилади (до 800 Вт) вмикаються у звичайні розетки.
2. Електронагрівальні прилади (більше 800 Вт) під'єднуються до щитів, вони повинні мати контрольну лампочку.
3. Усі нагрівальні прилади повинні мати постійне місце, теплоізоляцію знизу і біля стін (кераміка). Над розетками повинні бути етикетки, які вказують напругу.
4. Причинами пожеж є замикання, струмові перевантаження електрообладнання. Для попередження замикання потрібно передбачити електрозахист електроприладів: використання повітряних автоматичних вмикачів (автомати).
5. При експлуатації електропровідників не можна вмикати додаткові електроприлади, якщо провідники на це не розраховані. Не допускається перегрівання електроприладів.

### **2.4. Правила роботи з автоклавом**

До використання автоклаву допускаються особи, у віці не менше 18 років, які пройшли медичний огляд, курсове навчання і інструктаж по безпечному обслуговуванню автоклава. При роботі з автоклавом, категорично забороняється:

1. Випускати пар в стерилізаційну камеру при неповності закріпленій кришці.
2. Включати автоклав при недостатньому рівні води у водопаровій камері.
3. Відкривати кришку автоклава або ослабити її міцність при наявності тиску в стерилізаційній камері, доливати воду у водопарову камеру при наявності тиску в ній.
4. Працювати на автоклаві, якщо він не заземлений, якщо пройшли строки гідравлічного дослідження автоклаву і перевірок манометра, при несправному або невідрегульованому попереджувальному клапані.
5. Залишати автоклав без нагляду в робочому стані, тобто під тиском. Автоклав повинен бути зупинений, якщо тиск автоклаву піднімається вище дозволеного, не дивлячись на виконання всіх вимог інструкції, а також, якщо на елементах автоклаву працюючих під тиском, знайдені тріщини, здуття або протікання у зварних швах і т.д.

### **2.5. Правила роботи з сушильною шафою**

1. Обслуговування шафи може виконувати особа, ознайомена із положенням по обслуговуванню і кваліфікована для проведення стерилізації гарячим паром.
2. Протягом експлуатації апарату контролюють температуру і слідкують за тим, чи горять контрольні лампочки на електрощиті і на апараті.
3. Робота із незаземленою шафою категорично забороняється. Використання в якості заземлення опалювальної, електропровідної або газової мережі не допускається.
4. Забороняється класти в камеру шафи матеріал, що загоряється при температурі термостатування або близькій до неї.
5. При експлуатації сушильна шафа не повинна встановлюватися поблизу опалювальної системи.
6. Праця на несправному апараті забороняється.



## **2.6. Правила роботи з дистиллятором**

1. Перед експлуатацією апарата необхідно перевірити правильність підключення всіх проводів і наявність заземлення.
2. Категорично забороняється вмикати апарат в електричну мережу не заземливши його.
3. При аварійному режимі, у випадку його зупинки подачі води із водопроводу, в камері випарювання починається бурне кипіння і посилене піноутворення – не затримуючись швидко відключити апарат від електричної мережі.
4. Категорично забороняється включати апарат в освітлювальну мережу.
5. При несправності (заміні сигнальної лампочки і т.д.) апарат повинен бути відключений від мережі.
6. При роботі із апаратом потрібно стояти на гумовому килимку.
7. Перед вмиканням апарату включити воду.

**Тема 1.**  
**ТЕХНІКА КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН**  
**В УМОВАХ *IN VITRO***

**ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 1**

*Тема: ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА МУРАСИГЕ-СКУГА ДЛЯ*  
*КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН РОСЛИН*

**МЕТА:** навчитись готувати поживні середовища для культивування ізольованих клітин і тканин рослин.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** стакани хімічні на 1 л, колби з притертими корками для зберігання маточних розчинів, пляшечки з-під пеніциліну, мірні піпетки на 10, 5 і 1 мл, вага технічна, вага електронна торзійна або аналітична, електроплитка, набір хімічних реактивів, сахароза, агар-агар, ватні корки.

*Теоретична частина*

Поживне середовище – головний фактор, що обумовлює успіх мікроклонального розмноження. Основою усіх середовищ є мінеральні солі, які містять необхідні для росту рослин макро- (N, P, K, Ca, Mg, S) і мікроелементи (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Na, Co, Mo, Cl, Ni). Крім того, до їх складу входять вітаміни, амінокислоти, вуглеводи, фізіологічно активні речовини.

Основне завдання під час приготування середовища для культивування рослинних тканин *in vitro* це вибір оптимальної концентрації іонів і їх співвідношення. Макро- і більшість мікроелементів вводять до складу поживного середовища у вигляді солей. У середовищах – водних розчинах – кожна розчинна сіль дисоціює на два іони – катіон і аніон. Рослинні клітини поглинають кальцій, магній і калій у вигляді катіонів  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  і  $\text{K}^+$ . Азот надходить у клітину у вигляді іонів  $\text{NH}_4^+$  або  $\text{NO}_3^-$ , фосфор – у вигляді іонів  $\text{HPO}_4^{2-}$  і  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , сірка – у вигляді іонів  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Азот** у рослині знаходиться майже повністю у відновленій формі. В більшості середовищ переважають нітрат-іони. Ефективне надходження нітратів має місце у кислому середовищі; воно супроводжується виділенням аніонів із рослини, в результаті чого середовище стає менш кислим. І навпаки, при поглинанні амонію з клітин у середовище виділяються протони ( $\text{H}^+$ ), внаслідок чого воно підкислюється. Свіже середовище, як правило, має рН 5,4-5,8. Якщо у середовищі одночасно містяться іони нітратів і амонію, спочатку відбувається швидке поглинання амонію, що знижує рН середовища до 4,2-4,6. За цих умов поглинання амонію припиняється, але стимулюється поглинання нітратів, унаслідок чого рН підвищується. Існує тісна залежність між поглинанням азоту культурами тканин, ростом клітин і використанням азоту для синтезу органічних сполук. За достатньої кількості легкодоступного азоту культивовані клітини довше залишаються недиференційованими. У разі зниження вмісту азоту розпочинається синтез безазотистих сполук на основі фенілпропанів, наприклад лігніну, який пов'язаний з диференціацією клітин – утворенням елементів провідної системи. І навпаки, за наявності у середовищі іонів амонію має місце швидкий синтез амінокислот і білка внаслідок синтезу вуглеводневих сполук; при цьому з'являються гіпергідратовані пагони. Гіпергідратація – це утворення *in vitro* деформованих крихких органів, які мають вигляд просякнутих водою.

У деяких випадках для підсилення ембріогенезу і росту зародків крім  $\text{NH}_4^+$  та  $\text{NO}_3^-$  у середовище вводять амінокислоти. Позитивний ефект від амінокислот має місце при використанні середовищ із невисокою концентрацією солей (середовища Уайта, Хеллера, Ніча і Ніч) і майже відсутній за наявності таких оптимальних концентрацій і

співвідношень  $\text{NO}_3^-$  і  $\text{NH}_4^+$ , які є в середовищі Мурасіге-Скуга (MS). Поглинання амінокислот із середовища призводить до зниження рН, як це буває при поглинанні іонів  $\text{NH}_4^+$ . Найчастіше у середовищах використовують гліцин (2 мг/л) і суміш амінокислот, які отримують при ферментативному або кислотному гідролізі казеїну чи лактальбуміну.

Аміди для середовищ використовують рідше, головним чином сечовину, алантоїн і алантоїнову кислоту. Сечовина може бути єдиним джерелом азоту для культур тканин, але ріст їх при цьому буде менш інтенсивний, ніж у разі використання іонів амонію і нітратів. Через декілька пасажів на середовищі з сечовиною в тканинах підвищується активність уреаз. Хоча при метаболізації сечовини, як і інших відновлених сполук азоту, утворюється надлишок іонів водню, у зв'язку з чим сечовина менш, ніж амоній, здатна нормалізувати рН середовища. Коли в середовищі є одночасно і нітрати, і сечовина, іони нітратів використовуються в першу чергу.

**Фосфор** входить до складу нуклеїнових кислот, сполук, що беруть участь у синтезі білків і нуклеїнових кислот, та сполук, які сприяють перенесенню енергії. Рослина поглинає іони фосфору у вигляді повністю окисненого ортофосфату ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Поглинання фосфатних іонів є активним процесом і вимагає витрат енергії у процесі дихання.

У поживних середовищах фосфор представлений у вигляді натрію і калію моно- і двозаміщених фосфатів. Іони моновалентного  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  найлегше засвоюються рослиною при рН нижче 7, а оптимумом для надходження фосфатів ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) є рН 4

**Калій.** Основна фізіологічна роль іонів (катіонів) калію в клітині – компенсування негативного заряду неорганічних і органічних аніонів. Він швидко проникає через мембрани, зв'язується з органічними аніонами і таким чином одночасно виконує дві функції: регулює рН і осмотичний стан. В інтактній рослині іони  $\text{K}^+$  беруть участь у транспорті аніонів по ксилемі. Для багатьох ферментів  $\text{K}^+$  є кофактором, який, змінюючи конфігурацію білка, робить його активним. Нестача в середовищі  $\text{K}^+$  веде до гіпергідратації і зниження поглинання фосфатів. Як правило, у середовищах концентрація іонів калію і нітратів витримується на одному рівні. Потреба в іонах калію різко зростає під час переходу до органогенезу.

**Натрій** здебільшого не потрібен для росту і розвитку рослин, крім солевитривалих рослин.

**Магній.** Основна фізіологічна роль магнію в рослинному організмі зумовлена тим, що він входить до складу молекули хлорофілу і є обов'язковим кофактором для багатьох ферментів, наприклад РНК- і ДНК-полімераз та АТФ-аз. Іони  $\text{Mg}^{2+}$ , як і  $\text{K}^+$ , мобільні і сприяють нейтралізації аніонів і органічних кислот. Середовища для культур тканин містять відносно низькі концентрації магнію. У середовищах магній наявний у вигляді  $\text{MgSO}_4$ , який у цьому випадку є єдиним джерелом і  $\text{Mg}^{2+}$ , і  $\text{SO}_4^{2-}$ .

**Сірка** поглинається рослинами переважно в окисненій формі  $\text{SO}_4^{2-}$ , але входить до складу хімічних сполук у вигляді відновлених груп  $-\text{SH}$ ,  $-\text{S}$  або  $-\text{S}-\text{S}-$ . У рослинній клітині вона регулює структуру білків через утворення містків  $\text{S}-\text{S}$ . Деякі амінокислоти (цистин, цистеїн і метіонін) містять сірку.  $\text{SH}$ -групи – це реакційні центри деяких ферментів, а також ліганди, що приєднують іони заліза, міді і цинку до білків і ферментів. За нестачі сірки порушується синтез білка, рослини мають тонке і крихке стебло.

**Кальцій.** Іони  $\text{Ca}^{2+}$  виконують роль вторинного месенджера – внутрішньоклітинного посередника, що бере участь у посиленні і передачі первинного стимулу зі довколишнього середовища до клітини. Маючи здатність зв'язувати біологічні структури,  $\text{Ca}^{2+}$  є елементом, від якого залежать структура і функції клітинних стінок. Вважають, що кальцифікація зміцнює клітинну стінку і завдяки цьому посилює стійкість до патогенів. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  беруть участь у процесах морфогенезу, зокрема в морфогенезі *in vitro*, вони потрібні для передачі сигналів ауксинів і цитокінінів.

**Хлор.** Вважається, що іони хлору (Cl<sup>-</sup>) потрібні для росту рослинних тканин і основна їх роль полягає в підтримці тургору клітин і збалансуванні різних змін рівня вільних катіонів – K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> та Na<sup>+</sup>. Багато видів рослин переносять досить високі концентрації хлоридних іонів, але у деяких рослин надлишок Cl<sup>-</sup> спричинює гіпергідратацію, і в таких випадках виключення хлоридних іонів із складу середовища попереджує появу цих симптомів у регенерантів.

**Мікроелементи** входять до складу більшості культуральних середовищ. Найчастіше використовують суміш мікроелементів середовищ Мурасіге-Скуга (MS) і Гамборга (B5). Як і у разі макроелементів, для успішного культивування і морфогенезу окремих видів потрібно підбирати відповідну суміш мікроелементів або встановлювати їх оптимальну концентрацію експериментально.

**Марганець** – мікроелемент, який є обов'язковим компонентом більшості культуральних середовищ. Його основна фізіологічна роль зумовлена тим, що він входить до складу металопротейнів, які беруть участь у процесах дихання і фотосинтезу. Марганець необхідний для функціонування деяких ферментів (дегідрогеназ, кіназ, декарбоксилаз, оксидаз та супероксиддисмутаз) і підтримання ультраструктури хлоропластів.

**Цинк** входить до складу багатьох ферментів. Серед них РНК-і ДНК-полімерази, а також фермент, який бере участь у синтезі триптофану – попередника ІОК, і через це існує тісний зв'язок між доступністю цинку для рослин і вмістом у них ауксину.

**Бор** – елемент, який підтримує меристематичну активність тканин, тому що бере участь у синтезі азотистих основ, а отже, й РНК. Він сприяє метаболізму фенольних кислот і біосинтезу лігніну, оскільки є кофактором ферменту. Вважають, що бор стабілізує природні металохелати, які, в свою чергу, підтримують структуру і функції клітинної стінки і мембран.

**Мідь** входить до складу ферментів, пов'язаних із участю кисню в метаболізмі, під дією яких відбувається окиснення фенольних сполук. Також мідь є складовою частиною пластоціаніну – пігменту, що бере участь у перенесенні електронів.

**Молібден** також є компонентом низки ферментних систем – нітратредуктази і нітрогенази, які необхідні для засвоєння азоту.

**Кобальт** – складова частина вітаміну B<sub>12</sub>, а також половини опублікованих середовищ для культур тканин. Кобальт іноді стимулює ріст калусів деяких однодольних. Крім того, вважають, що він може виявляти захисну дію щодо токсичності металохелатів, а також пригнічувати окиснювальні реакції, каталізовані іонами міді і заліза.

**Нікель** є компонентом ферменту уреазы, необхідного для метаболізації сечовини до аміаку. Існує припущення, що позитивний вплив іонів йоду пов'язаний із їх відновлювальною дією.

**Залізо** в рослині бере участь в окисно-відновних реакціях, які відбуваються у хлоропластах, мітохондріях і пероксисомах. Цей елемент входить до складу амінолевулінової кислоти і протопор-фіриногену – попередників хлорофілу. Залізо є також компонентом ферредоксину – переносника електронів у процесі фотосинтезу. У живильних середовищах залізо – один із важливих компонентів. Більшість сучасних середовищ містить залізо у вигляді хелату з етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА).

**Вуглеводи.** Для росту в культурі *in vitro* ізольованих органів, тканин або клітин потрібно до складу середовища включати джерело вуглецю. Для більшості культур тканин з цією метою використовують цукрозу. Встановлено, що при промисловому мікроклональному розмноженні рослин до складу середовища можна додавати звичайний рафінований білий цукор. Тільки для деяких культур кращий ріст *in vitro* спостерігали за використанням глюкози. Для культури ізольованих коренів використовують переважно глюкозу або фруктозу.

**Регулятори росту рослин (фітогормони).** Ендогенні ростові речовини, або фітогормони, регулюють процеси росту і розвитку рослин. Культури тканин і органів *in vitro* потребують введення у середовище екзогенних регуляторів росту і морфогенезу рослин. Як правило, це синтетичні аналоги ауксинів і цитокінінів, гібереліни і абсцизова кислота природного походження.

**Ауксини.** Введення в культуру потребує наявності в середовищі ауксинів для індукції поділу клітин і дедиференціації тканин первинного експланта. Під впливом ауксинів тканини репрограмується на меристематичний ріст, який можна спрямувати далі під дією інших комбінацій регуляторів росту до різного типу органогенезу – утворення пагонів чи ембріодів. Існує багато синтетичних аналогів ауксинів, а саме: індолілоцетова кислота (ІОК), 2,4-дихлор-феноксиоцетова кислота (2,4-Д), індолілмасляна кислота (ІМК), 2-нафтилоцетова кислота (НОК), фенілоцетова кислота, 4-хлорфеноксиоцетова кислота, 2-метил-4-хлорфеноксиоцетова кислота, 2,4,5-трихлорфеноксиоцетова кислота (2,4,5-Т), дікамба (3,6-дихлоранісова кислота) або її диметиламінова сіль (Банвел Д), піклорам (4-аміно-3,5,6-трихлорпіколінова кислота).

Ауксини є найефективнішими фітогормонами в індукції коренеутворення. Однак, залежно від мети використовують певний ауксин. Фітогормони ауксинового типу неоднаково впливають на різні фізіологічні процеси (індукція меристематичної активності диференційованих тканин, індукція органогенезу, стимуляція утворення коренів або пагонів) та на рослини, що належать до різних видів.

Найчастіше і для індукції калусоутворення та морфогенезу, і для культури меристем у поживні середовища додають ІОК, 2,4-Д, НОК та ІМК. Синтетичну ІОК використовують для калусоутворення, індукції морфогенезу, культури меристем і пагонів, НОК і ІМК – у поживних середовищах для укорінення культури пагонів, 2,4-Д – для індукції калусу і росту суспензійних культур. 2,4,5-Т використовують рідше і виключно для індукції калусу і непрямого ембріогенезу однодольних. Для індукції ембріогенного калусу однодольних – рису, пшениці – часто використовують дікамбу та фенілоцетову кислоту.

**Цитокініни** – це регулятори росту, ефект від яких найбільший при застосуванні на культурах ізольованих тканин, в яких вони разом з ауксинами стимулюють поділ клітин і морфогенез. Обробка цими речовинами інтактних рослин підвищує синтез білків. Цитокініни є найефективнішими фітогормонами в індукції пагонів.

У рослині цитокініни синтезуються переважно в кінчиках коренів, особливо в клітинах центру спокою, а також у клітинах камбію і апексах пагонів. Синтезовані в коренях цитокініни транспортуються по ксилемі в інші частини рослини.

Найширше використовують такі цитокініни природного походження: зеатин, дигідрозеатин, кінетин, NN-дифенілсечовина (кокосове молоко), до синтетичних – 6-БАП (6-бензламінопурин).

**Гібереліни.** Основні фізіологічні ефекти гібереліну – стимуляція росту стебла (витягування), індукція цвітіння, стимуляція зав'язування плодів, зміна активності ферментів, індукція синтезу *de novo* L-амілази і мальтози.

**Абсцизова кислота** (АБК) – природний регулятор росту, який визначає період спокою бруньок і насіння, а також пригнічує підкислення і розм'якшення клітинної стінки, що є передумовою росту розтягненням, бере участь у регуляції закривання продихів, пригнічує ріст калусів. Низька концентрація АБК (0,01 – 1 мг/л.) стимулює морфогенез у багатьох рослин. Найчастіше це стимуляція утворення адвентивних бруньок на експлантах вегетативних органів і стимуляція ембріогенезу.

**Етилен.** Під час культивування ізольованих органів, тканин і клітин рослин утворюється етилен ( $H_2C = CH_2$ ). Інтенсивність його синтезу збільшується в умовах стресу, при старінні культур. Завдяки накопиченню цієї речовини в посудинах відбувається індукція калусоутворення і морфогенезу.

**Поліаміни.** Останнім часом досить інтенсивно вивчається роль поліамінів, аліфатичних сполук амінів, у процесах росту, диференціації та морфогенезу. Найпоширенішими речовинами цього класу є путресцин (діамін), спермідин (тріамін) і спермін (тетраамін). Фізіологічна роль поліамінів зумовлена їх властивостями. Як катіони вони легко зв'язуються із негативно зарядженими групами нуклеїнових кислот і білків. При зв'язуванні з поліамінами РНК і ДНК стають стійкішими до дії нуклеаз і термальної денатурації, активують реплікацію і транскрипцію ДНК. Їх дія в деяких аспектах нагадує дію катіонів  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  і  $Mg^{2+}$  в умовах стресу.

**Органічні кислоти.** Позитивний ефект від наявності органічних кислот у середовищах має місце переважно при використанні кислот циклу Кребса. Щодо ролі органічних кислот у живильних середовищах, то вони можуть діяти як хелатуючі агенти, бути буфером і підтримувати сталий рН або слугувати елементами живлення.

Найширше використовують такі органічні кислоти: яблучну, лимонну, бурштинову, малеїнову, малонову.

**Вітаміни** є необхідними компонентами поживних середовищ для культур тканин, оскільки ізольовані клітини і тканини втрачають здатність до їх синтезу. Найчастіше використовують тіамін ( $B_1$ ), ніотинову кислоту (ніацин) і піридоксин ( $B_6$ ), пантотенову кислоту ( $B_5$ ), рибофлавін ( $B_2$ ) та мезоінозитол.

Роль *тіаміну* визначається його участю в метаболізмі вуглеводів і біосинтезі амінокислот.

До складу багатьох середовищ входить *піридоксин*, фосфорнокислий ефір якого, є складовою частиною ферментів декарбоксілювання і переамінування амінокислот.

*Ніотинова кислота* у вигляді амідів входить до складу дегідрогеназ, які каталізують віднімання водню від речовин, що при цьому окиснюються.

*Пантотенова кислота* необхідна для росту культур тканин деяких видів.

За наявності *рибофлавіну* поліпшується ріст і якість пагонів, але пригнічується утворення калусу.

До складу багатьох середовищ входить *мезоінозитол*, який вважають вітаміном; здебільшого він міститься в дріжджовому екстракті, лише невелика кількість – в агарі. Мезоінозитол у рослинах знаходиться у складі фосфатидилінозитулу, який є компонентом клітинних мембран.

**Компоненти невизначеного складу.** Внаслідок розвитку методу культури тканин, створення збалансованих поживних середовищ, які містять амінокислоти і нові регулятори росту, добавки до середовищ компонентів невизначеного або нестійкого складу застосовують значно рідше.

Серед компонентів, які й зараз використовують для стимуляції росту, органогенезу і накопичення речовин вторинного синтезу, є *дріжджовий екстракт*, *екстракт бульби картоплі*, *кокосове молоко*.

**Речовини, які застосовують для отримання твердого середовища.** Для цього найчастіше використовують агар – поліцукрид із морських водоростей. Зараз існує чимало видів порошкоподібного очищеного агару: "Difco", "Bacto", "Noble", "Purified" та ін.

Останнім часом дослідники шукають замітники агару. Так, для культивування пиляків ячменю у середовище додають 5 % крохмалю, при культивуванні протопластів використовують агарозу, Фітогель (комерційний замітник агару) і Гелрїт.

**Приготування поживних середовищ.**

На сьогоднішній день розроблено велику кількість різних за складом поживних середовищ, найчастіше це модифікації середовищ *Кнопа*, *Уайта*, *Готре*, *Хеллера*, *Мурасіге-Скуга*. Мінеральний склад середовищ зумовлений головними фізіологічними потребами рослин. Він стабільний, змінюється переважно вміст амінокислот, регуляторів росту, вітамінів. Найчастіше використовують середовище *MS*, що містить збалансовану кількість поживних речовин, яка сприяє росту ізольованих тканин багатьох рослин.

Деякі середовища – це його модифікації (середовища *Піріка*, *Лінсмайєр-Скуга (LS)*, *Джонса*, *Міллера та ін.*).

*Маточні розчини макроелементів.* Для зручності у роботі та прискорення цього процесу доцільно заздалегідь готувати концентровані розчини макроелементів об'ємом 0,5-1 л, в яких концентрація солей в 20 разів вище, ніж у робочому розчині. Солі кальцію готують окремо для запобігання випаданню осаду.

*Маточні розчини мікроелементів* готують у концентраціях, що в 100 разів перевищують необхідні, з таким розрахунком, щоб 1 мл маточного розчину містив масу речовини, потрібну для приготування 1 л робочого розчину.

Всі концентровані розчини зберігають у холодильнику при 2-4 °С у пляшках із темного скла не довше 4-6 тижнів. Розчини регуляторів росту та вітамінів готують з розрахунку 1 мг речовини у 1 мл розчину. Цитокініни спочатку розчиняють у невеликій кількості 1,0 н луку, ауксини – у краплі етанолу, а потім доводять до потрібного об'єму дистильованою водою.

Концентровані розчини органічних речовин зберігають у холодильнику при – 20 °С.

*Вуглеводи, амінокислоти, гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт* зважують і додають безпосередньо у середовище під час приготування.

*Реакція середовища* – визначальний показник придатності середовища для росту рослин і агрегатного стану самого середовища, оскільки рослини добре розвиваються при рН 5,5, при більш кислій реакції середовище буде залишатися в рідкому стані оскільки агар в таких умовах не активний. Корекцію рН проводять шляхом додавання 1н HCl або 1н NaOH до необхідного значення.

*Розчинник.* Універсальним розчинником для приготування середовищ є дистильована вода.

## ХІД РОБОТИ

Приготувати поживне середовище *Мурасіге-Скуга (додаток, табл. 1)*, яке буде використовуватися для виконання наступних лабораторних робіт. Спочатку слід приготувати маточні (концентровані) розчини макросолей, мікросолей і вітамінів, а після цього робоче поживне середовище. Кількість солей, необхідних для приготування маточних розчинів поживного середовища *MS*, а також кількість маточного розчину, який необхідно взяти для приготування робочого поживного середовища наведено в таблиці (табл. 1.2).

*Послідовність приготування маточних розчинів макро-, мікросолей і вітамінів.*

1. Виготовити згідно з прописом розчин  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Кожну сіль розчинити в окремому хімічному стакані при нагріванні (крім  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), а потім злити разом і об'єм довести до 1л. Розчин  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  вливають останнім без нагрівання, причому в охолоджену суміш, що попереджує випадання осаду.

2. Виготовити згідно з прописом розчин  $CaCl_2$ .

3. Виготовити згідно з прописом розчин хелату заліза (розчин  $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$  і  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ), який слід нагріти до кипіння.

4. Виготовити згідно з прописом розчин мікроелементів.

5. Одержані розчини макро- і мікроелементів злити окремо в скляні посудини з притертою пробкою, наклеїти етикетку і помістити в холодильник. Хелат заліза зберігати в окремі посудині з темного скла.

6. Виготовити згідно з прописом концентровані розчини вітамінів. Для їх приготування беруть 10-разові наважки і розчиняють кожен вітамін окремо в 10 мл води. При цьому 1 мл цього розчину містить порцію вітаміну, необхідну для приготування 1 л

робочого розчину за прописом *Мурасіге-Скуга*. Зберігають розчин у пляшечках-флакончиках з-під пеніциліну в замороженому стані.

**Таблиця 1.2.**

Розрахунки для приготування маточних розчинів поживного середовища *Мурасіге-Скуга*

Компонент	Наважка	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1 л середовища, мл
<i>Макросолі, г на 1 л маточного розчину</i>			
KNO <sub>3</sub>	38	4 <sup>0</sup> C	50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O або	7,4		
MgSO <sub>4</sub> безводний	3,6		
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O або	13,8	4 <sup>0</sup> C	5
CaCl <sub>2</sub> безводний	8,8		
<i>Fe – хелат, мг на 100 мл маточного розчину</i>			
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	557	4 <sup>0</sup> C	5
Na <sub>2</sub> ЕДТА · 2H <sub>2</sub> O	745		
<i>Мікросолі, мг на 100 мл маточного розчину</i>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	4 <sup>0</sup> C	1
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	2230		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	860		
KJ	83		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	25		
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2,5		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,5		
<i>Органічні компоненти, мг на 10 мл маточного розчину</i>			
Мезоінозит	1000	- 20 <sup>0</sup> C	по 1 мл
Нікотинова кислота	5		
Піридоксин HCl	5		
Тіамін HCl	5		
Гліцин	20		
Сахароза	-	кімнатна	30 г/л
Агар	-	кімнатна	7 г/л

*Приготування розчинів фітогормонів.*

Взяти 100 мг речовини ауксинів (2,4-Д, ІОК, НОК) і розчинити в 0,5-2 мл етанолу; цитокініни (кінетин, зеатин, БАП) розчинити в невеликій кількості 0,5н NaOH або KOH, абсцизову кислоту (АБК) - у 70%-му етанолі. Потім розчини підігрівають (крім АБК) і заливають водою до об'єму 100 мл (1 мл містить 1 мг гормону). У холодильнику їх можна зберігати за температури + 4<sup>0</sup>C, але не більше одного місяця.

На основі маточних розчинів готують поживне середовище MS.

*Послідовність приготування робочих розчинів об'ємом 1 л.*

1. У хімічний стакан об'ємом на 1 л налити дистильованої води приблизно до 400 мл.



2. Зробити наважку сахарози (30 г), додати її в стакан з дистильованою водою і повністю розчинити. Для кращого розчинення можна злегка підігріти.
3. Додати згідно з прописом середовища необхідну кількість маточних розчинів макросолей (50 мл).
4. Додати згідно з прописом необхідну кількість маточних розчинів мікросолей (1 мл).
5. Додати згідно з прописом даного середовища розчини вітамінів і регуляторів росту.
6. Виміряти рН розчину. Якщо рН не буде в межах 5,6-5,8, то його слід довести до норми додаванням до середовища лугу (0,1н КОН, NaOH) або кислоти (0,1н НСІ).
7. У другий хімічний стакан налити 300 мл дистильованої води. У ній розчинити 7 г агар-агару, нагріваючи його на електроплитці і перемішуючи до повного розчинення.
8. Розчин гарячого агар-агару злити з розчином солей, вітамінів і сахарози і довести загальний об'єм дистильованою водою до 1 л.
9. Розлити поживне середовище в пробірки (приблизно на 1/3 об'єму), закрити їх ватними корками або алюмінієвою фольгою.
10. Простерилізувати поживне середовище в автоклаві згідно з режимом стерилізації.

Контрольні запитання: 1. Яка роль складових поживних середовищ? 2. Охарактеризуйте основні компоненти поживних середовищ і яку роль відіграє кожен із них? 3. Які стандартні поживні середовища використовуються при розмноженні рослин в умовах *in vitro*? 4. Яка послідовність приготування поживних середовищ? 5. Яка різниця між рідким і твердим поживним середовищем? 6. Що таке маточний і робочий розчин і чим вони відрізняються?

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 2**

### **Тема: МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ РОБІТ З КУЛЬТУРОЮ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН РОСЛИН**

**МЕТА:** навчитись методів стерилізації під час роботи з культурою ізольованих клітин і тканин рослин.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** чашки Петрі, стакани хімічні на 300-500 мл, колба на 1 л з дистильованою водою, пробірки з поживним середовищем MS, скальпелі, пінцети, голки, марлеві мішечки, 1%-й розчин бікарбонату натрію, обгортковий папір, шпагат, ножиці, папір фільтрувальний або інший для матрасиків, пральний порошок, хромпик, автоклав, сушильні шафи, фарфорові стакани, спиртівка, целофан, сірники.

#### *Теоретична частина*

Однією з основних умов успішного культивування ізольованих органів, тканин, клітин і протопластів є дотримання стерильності, оскільки на штучних поживних середовищах, крім рослинних об'єктів, добре розвиваються і мікроорганізми, що становить подвійну небезпеку. По-перше, у результаті життєдіяльності мікроорганізмів може істотно змінитися склад поживних середовищ, по-друге, ізольовані від рослини тканини, клітини і особливо протопласти легко пошкоджуються мікроорганізмами. Тому, всі досліді проводяться у стерильних приміщеннях – боксах і ламінар-боксах.

Стерилізують бокс, інструменти, посуд, рослинний матеріал, поживні середовища, ватні корки та всі інші матеріали, необхідні для роботи.

**Стерилізація ламінар-боксу.** Ламінар-боксы призначені для культури ізольованих клітин, тканин і деяких інших робіт, які підлягають стерильності. Стерильність забезпечується з допомогою бактеріальних фільтрів, встановлених у ламінар-боксі, через які нагнітається повітря. За 2 год. до початку роботи ламінар-бокс опромінюють (насвічують) бактерицидними ультрафіолетовими лампами. Попередньо до цього в ламінарі переносять спиртівку, сірники, фарфоровий стакан з 96%-м спиртом і стакан із стерильною водою. Розміщують також стерильний посуд та інструменти, необхідні для роботи. При вичлененні апікальної меристеми у ламінар-боксі розміщують бінокулярну лупу.

Розпочинати роботу в ламінар-боксі слід з ретельного протирання внутрішньої поверхні ламінару, спиртівки, пробірок з поживним середовищем, 70%-м спиртом.

**Стерилізація посуду.** Неодмінною умовою успішного культивування тканин є чистий стерильний посуд. Найпоширенішим і надійним методом підготовки скляного посуду, особливо нового, є замочування на 2-3 год. у хромпіку – розчині хромової кислоти в концентрованій сірчаній кислоті (9,2 г  $K_2Cr_2O_7$  розтирають у ступці і розчиняють під час нагрівання у фарфоровій чашці на водяній бані в 100 мл концентрованої  $H_2SO_4$ ). Потім посуд ретельно миють у теплій воді з пральним порошком, споліскують дистильованою водою, висушують і стерилізують сухим теплом у сушильній шафі 1–2 год за температури 170–180 °С.

Температура вище 175°C недопустима, оскільки при цьому ватні корки буріють, а паперова обгортка стає ламкою.

Більш строгої стерилізації можна досягнути під тиском в автоклаві, оскільки вологий жар більш пагубний для мікроорганізмів і спор. Посуд (стакани з кришками, чашки Петрі, піпетки) загортають у фольгу або обгортковий папір, зверху в целофан. При автоклавованні градуйованих піпеток верхню частину їх загортають ватою і кожну загортають у папір окремо. Автоклавують під тиском 2 атм. протягом 25-30 хвилин.

**Стерилізація інструментів.** Попередня стерилізація інструментів (скальпелів, пінцетів, голки і т.д.) полягає в нагріванні сухим жаром у сушильній шафі протягом 2 год. при 140°C. Шприци, ножиці, скальпелі зручніше кип'ятити. Металічні предмети не можна автоклавувати: під дією пари вони вкриваються іржею і затуплюються. Безпосередньо перед і в процесі роботи інструменти ще раз стерилізують в ламінарі, поміщуючи їх у фарфоровий стакан з 96%-м етиловим спиртом і обпалюючи в полум'ї спиртівки. Після стерилізації обпалюванням кожен інструмент поміщають між листками попередньо простерилізованого паперу, складеного в пачку. Стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним вживанням його слід простерилізувати спиртом і обпалити. Дуже тонкі інструменти (голки, лезо, скальпелі) можуть втрачати свої властивості при обпалюванні, тому їх стерилізують, занурюючи в спирт.

**Стерилізація матеріалів.** Вату, марлю, ватні корки, паперові матрасики, фільтрувальний папір, халати, косинки, шапочки стерилізують в автоклаві під тиском 2 атм. протягом 25-30 хвилин.

#### **Стерилізація рослинного матеріалу.**

Перед стерилізацією рослину звільняють від залишків ґрунту, сухих листків, покривних лусок. Ретельно миють щіткою з милом у теплій проточній воді протягом 40-60 хв, потім споліскують дистильованою водою. Така попередня підготовка значно знижує контамінацію поверхневих тканин.

Листки, пагони трав'яних і деревних рослин промивають теплою водою з милом, потім проточною (30-40 хв) і дистильованою водою. Загалом стерилізацію починають із занурення рослинного матеріалу у 96%-й етанол: листки, бруньки, насіння – на декілька секунд (2-10 с), корені, бульби, цибулини – на 1-5 хв.

Для стерилізації непошкоджених рослин застосовують велику кількість різноманітних стерилізуючих речовин. Найпоширенішими є розчини, що містять активний хлор (гіпохлорит кальцію і натрію, хлорне вапно, хлорамін, хлорокс, доместос),

ртуть (сулема, діацид) та окисники – пероксид водню та перманганат калію. Дуже часто використовують сполуки срібла – 0,8-1,0 % AgNO<sub>3</sub>.

Для стерилізації насіння, верхівкових меристем, шматочків тканини, виділених із різних частин рослини, застосовують наступні розчини: 0,1%-ї сулеми (двохлориста ртуть), 0,1%-го діациду, 13-20%-го пергідролю, 3-6%-го хлораміну, 10%-го гіпохлориту натрію або кальцію.

Основні методи стерилізації органів рослин при введенні їх у культуру *in vitro* наведені в додатках (табл.3).

*Техніка стерилізації.* Стерилізацію проводять у стерильних хімічних склянках, накриваючи їх чашками Петрі. Очищений і промитий рослинний матеріал у боксі занурюють на кілька секунд у склянку з етанолом, виймають і переносять у стерилізуючий розчин (згідно з заданим режимом). Аби тканини не спливали під час стерилізації, їх накривають стерильним ватним тампоном. Дрібне насіння стерилізують у мішечках із цупкої тканини або марлі, послідовно проводячи усі етапи. Стерильний рослинний матеріал висушують між аркушами стерильного фільтрувального паперу і зберігають у чашках Петрі до початку роботи.

*Стерилізація поживних середовищ.* Розлиті в пробірки поживні середовища закривають ватними корками, загортають у целофан і автоклавують за температури 120<sup>0</sup>С і тиску 1 атм. протягом 20 хвилин.

Середовище, яке не містить термолабільних речовин, стерилізується автоклавуванням при тиску 1 атм. за об'єму середовища 25-50 мл – протягом 20 хвилин, 1-2 л середовища – протягом 30-40 хвилин.

*Холодна стерилізація.* Для стерилізації розчинів з термолабільними речовинами (вітаміни, антибіотики, амінокислоти, рослинні екстракти, абсцизова кислота), які руйнуються під час автоклавування, використовують бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. У цьому випадку стерилізацію проводять у стерильному боксі.

## ХІД РОБОТИ

1. Простерилізувати інструменти, посуд і поживні середовища, які необхідні для проведення робіт в наступних роботах.

2. Загорнути в щільний папір і простерилізувати сухим жаром у сушильній шафі протягом 2 год. при температурі + 160<sup>0</sup>С наступний посуд: чашки Петрі, хімічні стакани на 300-500 мл (по 2 шт. на робочу бригаду студентів з 4 чол.).

3. Піддати попередній стерилізації в сушильній шафі скальпелі і пінцети. Перед помещенням у сушильну шафу інструменти загорнути в щільний папір.

4. Простерилізувати в автоклаві паперові матрасики і дистильовану воду в колбі. Матрасики загорнути в щільний папір, а зверху - у целофан. Для одержання стерильної води в колбу налити 1/3 об'єму дистильованої води, закрити ватним корком, зверху щільним папером і целофаном. Автоклаувати матеріали при тиску 2 атм. протягом 30 хв.

5. Простерилізувати в автоклаві пробірки з поживним середовищем закриті ватними корками. Перед автоклавуванням пробірки із середовищем загорнути по 10-20 шт. у целофан або обгортковий папір і автоклаувати при тиску 1 атм. протягом 20 хв. Одночасно в автоклаві слід простерилізувати марлеві мішечки для рослинного матеріалу. Перед перенесенням в автоклав мішечки загорнути в целофан або обгортковий папір.

*Контрольні запитання:* 1. З якою метою стерилізується лабораторне обладнання та необхідні предмети, задіяні в культивуванні клітин, протопластів? 2. Які основні стерилізуючі речовини використовують при проведенні стерилізації? 3. Які існують методи стерилізації при проведенні культивування клітин та протопластів? 4 Від чого залежить тривалість стерилізації рослинного матеріалу? 5 Розкажіть суть стерилізації поживних середовищ.

## Тема 2. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

Залежно від характеру морфогенетичних процесів (способів одержання рослин-регенерантів) в культурі тканин розрізняють типи (методи) мікроклонального розмноження, в основі яких лежать відмінності одержання рослин (з уже існуючих у рослин *in vitro* або новоутворених *in vitro* ініціалей).

*Перший тип* рослин утворюється внаслідок активації існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки стебла), тобто шляхом прямого органогезу. Ці рослини, регенеровані з меристем, генетично ідентичні батьківським формам.

*Другий тип* рослин утворюється зі спеціалізованих і калусних клітин, яким властива генетична мінливість, нерідко відрізняються від батьківських, тобто шляхом непрямого органогезу. Цей метод застосовується до рослин, у яких калус відрізняється генетичною стабільністю і коли варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості.

Мікроклональне розмноження включає 4 етапи, кожен з яких має свою чітку мету: ініціація культури; мультиплікація пагонів; укорінення та дорошування.

**Стадія 1 - ініціація культури.** Перший етап мікроклонального розмноження рослин або їх частин розпочинається з перенесення частини тканини рослини (експланта) в спеціальні умови для його подальшого розвитку. Він складається з чотирьох завдань:

- вибір місця відбору вихідної тканини (експланта);
- дезинфекція експланта;
- розміщення експланта на середовище;
- стабілізація культури.

*Вибір місця відбору вихідної тканини.* Бажано, щоб вихідні рослини не були ушкоджені грибними, бактеріальними і вірусними хворобами.

Першим рішенням, котре слід прийняти є вибір найбільш придатної для розмноження частини рослини з якої береться експлант. В переважній більшості випадків цією частиною є пазушна брунька або бічний пагін, хоч у випадку з рослинами родини папоротей вихідною тканиною буде частина столона. Розмір вихідної тканини (експланта) зазвичай є дуже малим (довжиною 1-2 см) який поміщають на напівтверде середовище на основі агару. Вік експланта має істотний вплив на його успішний подальший розвиток - найкращими для відбору вихідного матеріалу є наймолодші з доступних рослин. В загальному чим більш ювенільною є рослина - тим більш схильною до активного росту вона буде.

При розмноженні здерев'янілих рослин, в якості вихідних рослин обирають наймолодші з них. У випадку необхідності розмноження старих деревоподібних рослин можна провести *реювенілізацію* — для цього проводять щеплення або окуліровку частини необхідної рослини на сіянцеву підщепу, яка викликає омолодження прищепленого компонента і отриманий пагін буде мати достатню ювенільну фазу розвитку, щоб бути джерелом вихідного матеріалу для мікророзмноження.

*Дезинфекція.* Вибравши відповідну вихідну частину материнської рослини для подальшого розмноження, відділяють необхідну частину відповідного розміру і проводять її поверхневу дезинфекцію (стерилізацію). Поверхнева дезинфекція це процес видалення забруднення (вірусів, бактерій, грибів тощо) тільки з поверхні рослинного матеріалу, а не з внутрішньої її частини. Вона передбачає застосування хімічних речовин, котрі є токсичними для мікроорганізмів і нешкідливими для рослини. Основні дезинфектанти містять алкоголь (80-90% спирт): етил, метил, ізопропіл або хлорвмісні відбілювачі (хлорид кальцію, гіпохлорид натрію в концентрації 5 - 6% активного компонента).

*Розміщення експланта на середовище.* Підготовлену частину рослини переносять у стерильну посуду (чашку Петрі). Використовуючи простерилізований (вмочені у спирт і пропалені на вогні спиртівки робочі частини) інструмент (скальпель та пінцет) експлант

подрібнюється на частини, які переносяться на поживне середовище. Кількість експлантів в одній посудині залежить від культури і розміру посуду (картопля - 1, суниця - 4 і більше).

Після висадки експлантів на середовище, посудину закривають і герметизують. Цю роботу проводять в лабораторних умовах під спеціальною витяжкою із зворотною подачею повітря, яке попередньо проходить через надтонкий фільтр, який вловлює бактерії, спори та інші патогени.

*Стабілізація культури.* Посудини з тканинами поміщають в умови регульованого середовища. Основними параметрами якого є:

Температура. Більшість лабораторій дотримуються практики підтримування постійної температури  $+20...+27^{\circ}\text{C}$ . Однак, для оптимального розвитку окремих культур (формування бульбочок у лілій) необхідно знижувати температуру протягом нічного циклу. Температура є визначальним фактором для гальмування інтенсивності росту культур.

Світло впливає на ріст і розвиток рослин шляхом світлового випромінювання (ФАР), тривалості (фотоперіоду) та спектру. Оптимальними умовами розвитку є 16 годинний світловий день і 8-ми годинний нічний цикл. Для освітлення використовуються флуоресцентні лампи з білим денним світлом спектр яких становить 400-800 нм.

Газовий склад повітря. Оптимальний вміст вуглекислого газу в повітрі - 0,3-5,0% концентрації, який у більшості культур сприяє інтенсивному росту і укоріненню.

Завершення першого етапу мікророзмноження настає через 4-6 тижнів, коли вільні від інфекції культури утворюють кілька однакових пагонів.

**Стадія 2 - мультиплікація пагонів (розмноження культури).** Після 4-6 тижнів після ініціації, в стабілізованих культурах тканин відбувається проліферація пагонів (їх галуження). При утворенні певної кількості однакових пагонів вони є придатними для пересаджування (субкультури). Кожен пагін, за допомогою скальпеля і пінцета в стерильних умовах під витяжкою, відділяється від загальної маси і розрізають на кілька живців або висаджують цілий на нове середовище аналогічного складу як і попереднє.

Поділені на частини пагони поміщаються в такі ж інкубаційні умови як і на першому етапі. Протягом наступних 4-6 тижнів відбувається ріст їх вегетативної маси і проліферація. Це означає, що розмноження і пересаджування культур можна проводити кожних 4-6 тижнів на регулярній основі.

При створенні оптимальних інкубаційних умов та відповідного середовища, кожен вид рослин забезпечує прогнозовану кількість пагонів протягом всього циклу розмноження. Їх кількість називається *коефіцієнтом розмноження*. Знання даного показника необхідне для планування кількості вихідних культур для отримання необхідної кількості пагонів, що будуть переходити до наступної фази розмноження.

**Стадія 3 - ризогенез (укорінення) культур.** На цій стадії необхідно створити умови для утворення на пагонах, що надходять із стадії розмноження адвентивної кореневої системи. Існує два методи укорінення пагонів:

- *метод А - укорінення в in vitro* передбачає пересаджування відділених у фазі розмноження пагонів на нове середовище, основним складником якого є один або суміш кількох регуляторів росту - ауксинів, які вводяться до складу середовища. Цитокініни, які використовувалися в середовищах на попередніх етапах розмноження у цій фазі не застосовуються - це означає, що у рослинах проходить зміщення активності ростових процесів - вони перестають галузитися (пригнічується діяльність латеральних меристем), більш активно розвивається верхівкова меристема: пагони збільшуються в рості і розпочинає утворюватися коренева система. Тривалість перебування рослин на стадії коренеутворення - 2 - 4 тижні.

- *метод Б - укорінення в умовах теплиці або парників.* Мікропагони висаджуються в стаканчики або палетні контейнери і переносяться в парники або теплиці, де їм створюють умови, аналогічні як і при укорінення зелених живців. Такий спосіб має свої

переваги: більша швидкість висаджування неукорінених мікроживців, ніж вкорінених; вартість такого укорінення значно нижча, ніж у лабораторії. Проте існує і ряд недоліків такого способу укорінення. Не вкорінені пагони з лабораторії не є цілком сформованими і функціонуючими рослинами. Умови зовнішнього середовища під час культивування тканин не забезпечували достатнього рівня фотосинтезу і рослини були залежними від наявності вуглеводів у субстраті, крім того умови високої вологості в умовах *in vitro* не сприяють утворенню достатнього шару кутикули на листках і тому таким рослинам складно адаптуватися і вижити в більш сухих умовах, а при збільшенні інтенсивності освітлення не вкорінені рослини будуть відчувати водний стрес. Тому для успішного укорінення рослин в умовах парника - теплиці слід створити умови високої вологості повітря і субстрату, затінити від прямого сонячного світла і забезпечити помірно теплою температурою. Поганий контроль цих показників у парнику є основною причиною загибелі рослин, оскільки вони не можуть залишатися живими достатньо довго для того, щоб утворилася коренева система. Особливою проблемою є ураження рослин грибовими хворобами, особливо в умовах тепла і високої вологості, тому слід дотримуватися рекомендацій по стерилізації субстрату і проводити захист рослин, застосовуючи хімічні засоби захисту.

**Стадія 4 - акліматизація і дорошування рослин.** Після укорінення *in vitro* рослини пересаджуються у 48 або 64 коміркові палетні контейнери, які заповнюються пористим субстратом до складу якого додається незначна частина органічних і мінеральних добрив, а основна їх частина подається з поливом. При застосуванні з поливом мінеральних добрив дотримуються рекомендацій і застосовують нижні дози, оскільки дуже легко переудобрити субстрат в контейнерах. Рослини витримують напівзатіненими до повної їх акліматизації і відновлення ефективної фотосинтетичної діяльності.

Після успішного укорінення відбувається збільшення інтенсивності росту і утворення нових листків - з цього часу можна поступово збільшувати інтенсивність освітлення і знижувати температуру до значень характерних для відкритого ґрунту. При доброму рості і розвитку рослин їх переносять на відкриті площадки на дорошування, реалізують або висаджують у шкільку. Всі зміни умов зовнішнього середовища проводять поступово, оскільки різкі зміни можуть викликати тривалий стрес, ушкодження рослин і навіть їх загибель.

Метод *клонального мікророзмноження* рослин на штучних поживних середовищах в умовах *in vitro* в порівнянні із звичайним (вегетативним) має переваги:

- дуже великий коефіцієнт розмноження - у тисячі разів більший, ніж за звичайного вегетативного розмноження (наприклад, з 1 рослини суниці садової можна одержати в рік 1 млн. рослин і більше);
- рослини звільняються від вірусів та іншої інфекції, тобто відбувається оздоровлення посадкового матеріалу;
- дозволяє розмножувати рослини цілорічно - поза залежністю сезону і погодних умов;
- можна розмножувати важкорозмножувані рослини, наприклад, троянди, орхідеї;
- економляться виробничі площі теплиць, які займають під маточні рослини;
- пробіркові рослини можна легко транспортувати на будь-які відстані;
- меристеми зберігаються протягом тривалого часу з допомогою кріометоду (зберігання в умовах глибокого заморожування в рідкому азоті при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ ), що дає можливість створювати банк їх цінних форм.

## Розділ 2.1. ПРЯМИЙ ОРГАНОГЕНЕЗ

Вважається, що утворення рослин-регенерантів безпосередньо з експланта (шляхом активації існуючих меристем, утворення бруньок чи ембріодів) характеризує прямий морфогенез. При цьому методи розмноження найчастіше застосовують:

- *культуру верхівкової (апикальної) меристеми*, яка передбачає використання в якості вихідного матеріалу звичайних верхівкових (апикальних) меристем, котрі в подальшому використовуються для репродукції нових поколінь. Це означає, що апікальна меристема відділяється від материнської рослини і продовжує розвиватися в асептичних умовах як мініатюрний пагін (живець). Апікальна меристема і сама верхівкова сферична її частина із зачатковими листками зазвичай є вільною від вірусів навіть у системно інфікованих рослин.

- *культура латеральної (аксилярної) меристеми* - найбільш поширений метод масового розмноження рослин в культурі тканин. Вихідним матеріалом для ініціації культури є будь яка частина рослини, яка є найбільш готовою для активного росту, найменш ураженою і найбільш генетично стійкою. Такою частиною є латеральні (бічні) пагони і пазушні (аксилярні) бруньки. На відміну від апікальних меристем вони є більш генетично стійкими і менше піддаються мутаціям.

Метод мікроклонального розмноження ґрунтується на індукованому фітогормонами розростанні верхівкових та пазушних меристем, кожна з яких започатковує осередок пагонів. Після формування такого осередку його поділяють на дрібніші групи пагонів, переносять на свіже середовище, і процес повторюється. Швидкість мікроклонального розмноження залежить від виду і, навіть, сорту або лінії рослини, але часто можливо отримувати із окремої бруньки до кількох мільйонів рослин за рік.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 3

#### Тема: ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ В УМОВАХ *IN VITRO* АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ КАРТОПЛІ

*МЕТА:* оволодіти методиками виділення та культивування апікальних меристем картоплі в умовах *in vitro*

*МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:* бульби картоплі різних сортів; бінокулярна лупа або мікроскоп біологічний порівняльний; стерилізовані скальпелі, препарувальні голки, леза, затиснуті в держачки; пробірки із стерильним поживним середовищем для культивування апікальних меристем картоплі; спиртівка; сірники; 96%-й спирт у фарфоровому стаканчику.

#### Теоретична частина

Метод культури тканин для звільнення картоплі від вірусної інфекції застосовують вже близько 50 років. У 1952 р. французькі вчені Ж. Морель і С. Мартін оздоровили один сорт картоплі, використавши апікальну меристему паростків бульб. До середини 1970-х років технологія звільнення картоплі від вірусів була розроблена і удосконалена в багатьох країнах світу. Для підвищення ефективності методу застосовували термотерапію, хіміотерапію, обробку холодом. Останнє десятиліття характеризується подальшим розвитком досліджень у галузі біотехнології картоплярства та їх широким впровадженням у генетико-селекційний процес для створення високоякісних сортів, стійких до негативної дії зовнішнього середовища (засолення, гербіцидів, хвороб, шкідників тощо).

Інститут картоплярства УААН – один з перших колективів, що розробив і застосував методи МКР і клітинної селекції у картоплярстві і отримав практичні

результати зі створення рослин-регенерантів картоплі. Розроблено низку технологій для отримання нових форм і поліпшення існуючих сортів картоплі.

Технологія оздоровлення сортів картоплі є складовою частиною системи первинного насінництва і складається з декількох етапів:

- підготовка бульб для видалення меристем, перевірка їх інфікованості методом імуноферментного аналізу, пророщування в темряві 1-2 міс при 35-37 °С;
- вичленування меристем і культивування їх на поживному середовищі в умовах регульованої температури, освітлення та вологості;
- пересадка проростків (3-5 мм) на середовище з ауксином для прискорення росту та укорінення, живцювання пагонів; перевірка зараженості регенерантів;
- пересадка рослин у теплиці для утворення бульб і повторна перевірка інфікованості.

Для вичленування меристем використовують паростки (2-3 см) бульб після термотерапії. Їх відділяють і стерилізують у 0,1%-му діациді протягом 5 хв., потім промивають у 2 порціях стерильної дистильованої води.

### ХІД РОБОТИ

1. Наперед підготувати і простерилізувати в автоклаві при тиску 1 атм. протягом 20 хвилин модифіковане поживне середовище MS для культивування апікальних меристем картоплі (додаток табл. 2).

2. У декількох сортів картоплі проростити в темноті бульби (у термостаті при температурі 20-22°С. На нестерильних паростках під мікроскопом (біокулярною лупою) розглянути, як виглядає апікальна меристема у картоплі. Детально відпрацювати технологію вичленення апікальної меристеми.

3. Підготувати для вичленення меристеми ламінар-бокс. Простерилізувати приміщення і ламінар бактеріцидними лампами.

4. Протерти спиртом робоче місце – стіл, біокулярну лупу, внутрішні стінки ламінара і штативи з пробірками.

5. Робочі інструменти (пінцети, скальпелі, голки) стерилізувати перед кожним вичлененням, занурюючи в спирт і обпалюючи на спиртівці.

6. З термостата взяти пророщені бульби картоплі (різні сорти). Відрізати паростки, опустити в хімічний стакан і залити 0,1%-м розчином діациду на 3-5 хвилин (або 1-6%-м розчином гіпохлориту кальцію чи натрію, або 0,1%-м розчином сулеми).

7. Вийняти паростки із стерилізуючого розчину і не менше 3 разів промити їх стерильною водою.

8. Простерилізовані паростки помістити в стерильну чашку Петрі і додати декілька крапель стерильної автоклавованої води для попередження підсихання паростків.

9. Помістити паросток на предметний столик біокулярного мікроскопа (лупи) і з допомогою препарувальної голки під мікроскопом з верхівки паростка видалити покривні листочки, послідовно оголюючи бокові і верхівкові меристеми з примордіальними листочками.

10. Звичайною голкою, затиснутою в тримач, вичленити меристему, яка містить шматочок рослинної тканини розміром 100-250 мікрометрів (0,1-0,25 мм) без листових зачатків (примордіїв). Для вправного виділення меристеми потрібні відповідні навички, тому технологію слід спочатку добре освоїти на нестерильних паростках картоплі.

11. Після вичленення, меристему на кінчику голки перенести на поверхню поживного середовища у пробірку.

12. Обпалити пробірку та корок над полум'ям спиртівки, закрити пробірку корком і поставити в штатив.



13. Штатив з пробірками, в яких поміщені апікальні меристеми різних сортів картоплі, закрити для попередження підсихання середовищ і поставити у світлову кімнату.

15. Через 2, 3, 4 тижні послідовно провести спостереження за розвитком рослин з меристем пагонів і замалювати етапи цього процесу. Порівняти, як іде розвиток рослин з меристем різних сортів картоплі; зробити відповідні висновки.

Контрольні запитання:

1. Які бувають методи культури тканин? Охарактеризуйте їх. 2. В чому суть оздоровлення рослин? Методи оздоровлення та їх особливості. 3. На чому ґрунтується метод мікроклонального розмноження? Типи (методи) мікроклонального розмноження, їх характеристика. 4. Етапи мікроклонального розмноження та їх особливості. З яких завдань складається перший етап мікроклонального розмноження рослин? 5. Що таке прямий органогенез?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 4

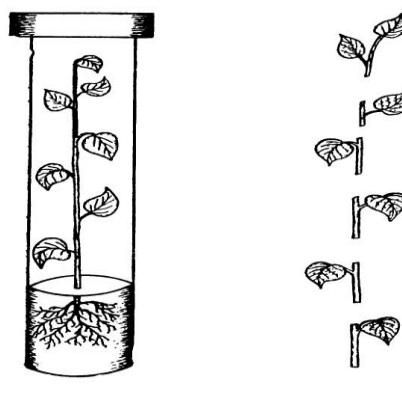
### Тема: МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ КАРТОПЛІ ЖИВЦЮВАННЯМ ПАГОНІВ

**МЕТА:** оволодіти методикою мікроклонального розмноження картоплі – живцюванням пагонів.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** пробіркові рослини різних сортів картоплі; пробірки з модифікованим стерильним поживним середовищем для живцювання пагонів картоплі; стерильні скальпелі, пінцети, чашки Петрі; 96%-й спирт у фарфоровому стаканчику; спиртівка; сірники.

#### Теоретична частина

Одним із найпоширеніших способів розмноження картоплі є живцювання стерильних рослин у пробірковій культурі (рис.1). Для цього рослини виймають з пробірок, розрізують на частини, кожна з яких містить *живець* – відрізок стебла з листком і пазушною брунькою. Живці пересаджують у пробірки з поживним середовищем *Мурасіге-Скуга*.



**Рисунок 1. Живцювання картоплі в умовах *in vitro*:**

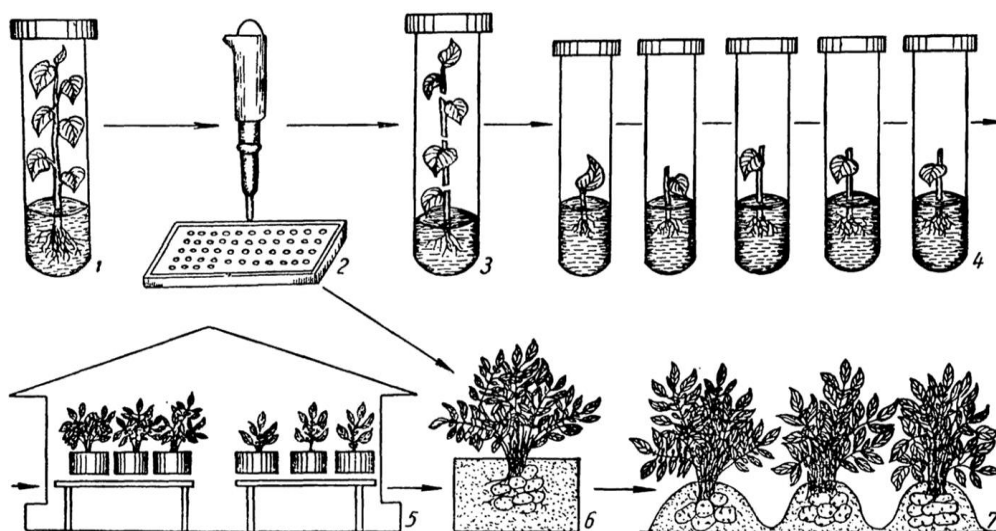
А – рослина картоплі в пробірці на штучному поживному середовищі; Б – загальна схема живцювання пробіркових рослин картоплі на окремі частини – живці.

Розмноження живцями засноване на пригніченні апікального домінування і активації пазушних меристем при видаленні верхівки пагона. З пазушної бруньки живця при поміщенні його на поживне середовище розвивається пагін.

Кожне наступне живцювання у картоплі проводять через 14-21 день. З однієї рослини одержують 5-8 живців. За 2-3 місяці живцюванням можна одержати від однієї рослини 3-5 тис. рослин, а за 7 місяців можна досягти коефіцієнта розмноження 1 : 30-40 тисяч.

Після живцювання і одержання в умовах *in vitro* пробіркових рослин переходять до наступного етапу розмноження оздоровленого посадкового матеріалу. Розмноження проводять в умовах теплиці. Рослини з пробірок разом з агаровим поживним середовищем переносять в горшечки з ґрунтовою сумішшю, яка складається з торфокрихти, дернової землі і піску у співвідношенні 3 : 1 : 1. Отвір у зволоженому ґрунті роблять тупим кінцем пробірки незадовго до пересаджування. На 3-7-й день рослини підживлюють розчином Кнопа і мікроелементів за Мурасіге-Скугом: 5 мл маточного розчину мікроелементів у концентрації 1x100 розводять в 1 л води. Через 7-10 днів після приживлення рослин їх пересаджують на постійне місце в теплиці для одержання безвірусних бульб (міні-бульб), які в подальшому використовуються для посадки в полі.

Схема мікроклонального розмноження і одержання оздоровленого вихідного матеріалу картоплі живцюванням рослин подана на *рисунку 2*.



**Рисунок 2. Схема одержання оздоровленого вихідного матеріалу картоплі за допомогою живцювання рослин:**

1 - рослина, яка виросла з меристеми; 2 - діагностика на виявлення латентних вірусів; 3-4 - розмноження здорових клонів живцюванням у пробірках (декілька циклів); 5 - розмноження в закритому ґрунті, одержання 1-го бульбового покоління (мінібульб); 6 - розсадник вихідного матеріалу в полі; 7 - розсадник клонів, масове розмноження.

Один із шляхів подолання цих труднощів - одержання бульб (мікробульб) на поживному середовищі в стерильній культурі. Цей процес може бути прискорений видаленням верхівок рослин, коливаннями температури і зниженням її до +15°C, слабкою освітленістю і коротким світловим днем. У ранніх і середньоранніх сортів бульбоутворення розпочинається через 1,5-2 місяці, у середньопізніх і пізніх сортів - через 2-2,5 місяці після посадки живця на середовище. Ріст мікробульб у пробірках добре поєднується з живцюванням. Верхівка рослини відділяється і пересаджується на свіже середовище, потім зрізуються 2-3 верхівки з пазушних пагонів, які також використовують для подальшого розмноження. Таким чином, кожна рослина, призначена для одержання мікробульб, дає стільки ж живців, як і при живцюванні всього стебла в пробірці без утворення бульбочок.

При висаджуванні в ґрунт мікробульб з пробірок не потрібно спеціальних вегетаційних приміщень і укриття, рослини розвиваються швидше, частіше дають більший коефіцієнт розмноження, чим при висадці з пробірок. В даний час у картоплярстві використовують обидва способи розмноження оздоровленого вихідного матеріалу картоплі: пробірковими рослинами і мікробульбами.

### ХІД РОБОТИ

1. Підготувати до роботи ламінар – бокс, простерилізувати його бактерицидними лампами протягом 2 годин до початку роботи. Внутрішні стінки ламінара, робочий стіл, штатив з пробірковою культурою картоплі ретельно протерти спиртом. Робочі інструменти простерилізувати спиртом і обпалити на спиртівці.

2. У ламінарі, в асептичних умовах ламінар-боксу вийняти стерильним пінцетом пробіркову рослину картоплі із пробірки.

3. Помістити рослину на стерильну чашку Петрі і гострим стерильним скальпелем розділити на живці. Частина стебла над листком при цьому повинна бути приблизно вдвоє коротшою від частини нижче листка (рис. 1-Б). Необхідно дотримуватись строгої стерильності, і ріжучий інструмент після кожної операції розрізування потрібно дезінфікувати в спирті.

4. Живці перенести в пробірки на поживне середовище MS для мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів. Склад поживного середовища для клонального мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів подано у додатках (табл. 4). При перенесенні живця у пробірки нижню його частину занурюють у поживне середовище. При цьому листок із пазушною стебловою брунькою повинен знаходитися над поверхнею штучного поживного середовища.

5. Обпалити горловину пробірки і ватний корок у полум'ї спиртівки для запобігання попадання в пробірку мікроорганізмів. Закрити пробірку корком.

6. Пробірку з живцем помістити у штатив (пінопластну або деревну палетку), замалювати загальний вигляд живців у пробірках у робочому зошиті, а потім поставити на стелажі світлової кімнати. Живці рекомендується вирощувати за температури +18-25°C, відносної вологості 70%, освітленості 6-10 тис. люкс при 16-годинному світловому періоді.

7. Через 7 і 14 днів провести візуальні спостереження за ростом і розвитком пагонів в умовах *in vitro*. Замалювати послідовні етапи розвитку рослин картоплі з живця.

8. Порівняти інтенсивність стеблоутворення в різних сортів картоплі; зробити відповідні висновки щодо регенеруючої здатності рослин залежно від фенотипічних особливостей сорту.

9. Пробірковий матеріал рекомендується використати для повторного клонального мікророзмноження картоплі живцюванням або для одержання мікробульб у культурі *in vitro*.

#### Контрольні запитання:

1. Як отримують безвірусних садивний матеріал? 2. Яке практичне значення мікроклонального розмноження картоплі? 3. Які фактори впливають на процес мікророзмноження?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 5

### Тема: ВИДІЛЕННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ СУНИЦІ.

**МЕТА:** оволодіти методиками виділення, культивування апікальних меристем та мікроклонального розмноження суниці.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** столони різних сортів суниці; пробірки зі стерильним модифікованим поживним середовищем *MS* для культивування апікальних меристем суниці, стерильні чашки Петрі, стерильний скальпель, стерильна голка, біокулярний мікроскоп МБ-9 або лупа, стерильне предметне скло, 96%-й спирт, стерилізуючі розчини (0,1% сулеми або 0,1 % діациду), марлеві мішечки, колба на 1 л із стерильною водою, стерильні хімічні стакани, спиртівка, сірники.

#### Теоретична частина

Тривале вегетативне розмноження суниці призвело до масового зараження плантацій комплексом вірусних інфекцій, що знижують якість і кількість урожаю.

Виявлено, що суницю вражають понад 50 вірусних та 8 мікоплазмових хвороб. З метою оздоровлення і збільшення коефіцієнта розмноження рослин використовують культуру апікальних меристем.

Технологія мікроклонального розмноження суниці і звільнення її від вірусних інфекцій розроблена досить детально, але окремі етапи методу постійно удосконалюють.

Для збільшення виходу здорових рослин застосовують різні заходи, спрямовані на пригнічення репродукції вірусів: поєднання термотерапії з культурою апікальних меристем, внесення до поживного середовища різних інгібіторів вірусів. Головним фактором, що сприяє звільненню суниці від вірусних інфекцій, є використання експлантів апексів малих розмірів (0,25-0,5 мм).

Протягом 2-3 місяців формуються рослини, які можна висаджувати у субстрат. Не помічено відмінностей у швидкості регенерації експлантів апексів з латеральних чи апікальних бруньок материнської рослини, але тканини молодих пагонів мають більшу регенераційну здатність, ніж тканини старих сформованих рослин. Ізолювати експланти суниці можна протягом усього періоду вегетації, але помічено, що на початку активного росту столонів при дозріванні урожаю регенераційна здатність апексів і швидкість росту рослин-регенерантів знижується. Крім того, морфогенна активність значною мірою залежить від сортових особливостей материнської рослини. До того ж у різних кліматичних умовах один і той же сорт може мати різну регенераційну здатність.

При культивуванні апікальних меристем суниці використовують поживне середовище з високим вмістом *кінетину* (0,5-1,0 мг/л). У результаті під дією високої концентрації *кінетину* проходить пригнічення апікального домінування верхівкової меристеми і активація пазушних меристем. Приблизно через 2 тижні після поміщення на поживне середовище ізолюваної верхівкової суниці, яка складається з меристематичного купола і 1-2 листових примордіїв, основи листочків, що розгортаються, починають біліти. Згодом з пазух показуються пучки листків, які належать брунькам, що закладалися і проростали в пазухах. У пазухах цих нових листків знову закладаються бруньки і знову проростають. Через 1-2 місяці експланти перетворюються в конгломерат великої кількості різновікових і рівновеликих бруньок з розгорнутими листками. Утворені бруньки легко відокремлюються одна від одної і кожна, будучи пересадженою на свіже поживне середовище, продовжує формувати нові пазушні бруньки, збільшуючи тим самим число точок росту, але не утворюючи коренів.

## ХІД РОБОТИ

1. Ретельно промити столони суниці щіточкою в мильній воді і сполоснути чистою водою – спочатку водопровідною, а потім дистильованою.

2. Виділити скальпелем пазушні бруньки суниці, які розташовані біля основи листків. Цю операцію можна проводити поза ламінаром. В нестерильних умовах на бруньках слід також детально відпрацювати процес вичленення апікальної меристеми суниці. Всю подальшу роботу необхідно поводити тільки в ламінарі.

3. Зібрати бруньки в марлевий мішечок і занурити його для стерилізації в 0,1 %-й розчин сулеми на 6-10 хв.

4. Вийняти мішечок за нитку із стерилізуючого розчину і 5-6 разів промити в стерильній дистильованій воді. Для цього достатньо мати дві склянки, в кожену з яких налити на 1/4 об'єму стерильної води. Послідовно занурити мішечок з бруньками, прополіскуючи його у воді протягом декількох хвилин. Потім воду з другої склянки злити в першу, а в іншу налити стерильної води з колби і знову прополіскувати в ній мішечок з бруньками. Процедуру повторити декілька разів.

5. Деконтаміновані бруньки перенести з мішечка в стерильну чашку Петрі.

6. Для виділення меристем бруньку суниці помістити на стерильне предметне скло і розглянути під біокулярним мікроскопом (лупою) при 10-разовому збільшенні.

7. З допомогою стерильної препарувальної голки і стерильного скальпеля звільнити бруньку від численних листкових лусочок.

8. Притримуючи бруньку стерильною голкою, вичленити стерильним скальпелем (стерильним лезом) меристематичний купол з 1-2 листковими примордіями.

9. Виділену меристему перенести скальпелем у пробірку з поживним середовищем MS, модифікованим для культивування апікальних меристем суниці (додаток, табл. 5). Горловину пробірки після її відкривання і перед посадкою меристеми слід обпалити на спиртівці.

10. Обпалити на спиртівці ватний корок, повторно обпалити горловину пробірки і закрити її корком.

11. Помістити пробірки з апікальними меристемами суниці у світлову кімнату при температурі +25<sup>o</sup>C.

12. Через 4 тижні розглянути і замальовати конгломерат бруньок, який утворився в результаті росту апікальної меристеми суниці на поживному середовищі. Відмітити кількість утворених бруньок і порівняти за цією ознакою різні сорти суниці великоплідної.

13. Конгломерати бруньок використати для наступної лабораторної роботи з індукції коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці.

### Контрольні запитання:

1. За яких умов використовують метод культивування апікальних меристем суниці?
2. Які характерні особливості поживних середовищ для культивування апікальних меристем суниці?
3. Що таке меристема? Її функції та походження.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 6

### Тема: ІНДУКЦІЯ КОРЕНЕУТВОРЕННЯ ПРИ МІКРОКЛОНАЛЬНОМУ РОЗМНОЖЕННІ СУНИЦІ

**МЕТА:** оволодіти методом індукції коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** пробірки з конгломератом бруньок суниці на поживному середовищі, пробірки зі стерильним поживним середовищем, стерильний пінцет, стерильний скальпель, стерильна чашка Петрі, стакан зі стерильною водою, 96 %-й етиловий спирт, спиртівка, сірники.

#### Теоретична частина

При культивуванні апікальних меристем суниці на поживному середовищі, яке містить фітогормони класу *цитокинінів* (6-БАП, кінетин та ін.), у результаті активації пазушних меристем з однієї меристеми утворюється багато стеблових бруньок, точки росту витягуються, розгортаються нові листки. Однак укорінення утворених бруньок на поживному середовищі з переважанням *цитокинінів* не проходить. Для вкорінення бруньок, які утворилися при мікроклональному розмноженні суниці, необхідно їх пересадити на нове поживне середовище з підвищеним вмістом *ауксинів*.

**Пересадка в субстрат:** рослини до 2 см з 3-4 листками і коренем пересаджують у субстрат з торфу і піску (3:1) або торфу, піску і дернового ґрунту (1:1:1), попередньо простерилізованого протягом 1 год. при 1,5–2,0 атм. Для забезпечення підвищеної вологості рослини накривають плівкою або витримують в умовах штучного туману. Після утворення 1–2 нових листків рослини висаджують у ґрунт. За 40–50 діб формується стандартна розсада суниці. Для запобігання розвитку грибних і бактеріальних хвороб слід раз на тиждень обробляти рослини 0,3%-м фундазолом.

#### ХІД РОБОТИ

1. Для виконання лабораторної роботи використати культуру апікальних меристем (через 3-4 тижні після початку культивування).
2. У стерильних умовах (у ламінарі) вийняти корок з пробірки, де культивується апікальна меристема суниці, обпалити на спиртівці горловину пробірки і стерильним пінцетом добути конгломерат бруньок.
3. Звільнити основу конгломерату від залишків агаризованого поживного середовища, промити в стерильній воді і перенести в стерильну чашку Петрі.
4. Роз'єднати за допомогою стерильного скальпеля конгломерат на окремі бруньки.
5. Кожну бруньку за допомогою стерильного пінцета перенести в окрему пробірку з поживним середовищем для вкорінення суниці (*додаток, табл. 6*).
6. Обпалити шийку пробірки і корок, закрити пробірку корком.
7. Обгорнути целофаном корки пробірок і помістити в світлову кімнату з освітленістю *10 тис. люкс*, температурою *26<sup>0</sup>С* і вологістю *60 %*.
8. Через тиждень розглянути і замалювати пробірки, відзначити початок коренеутворення. Порівняти за цією ознакою різні сорти суниці; зробити відповідні висновки.
9. Через місяць (після пересадки бруньок на середовище для вкорінення) провести наступне спостереження і виявити рослини, які можна використати для пересадки в нестерильні умови.
10. Пробіркові рослини суниці, які відзначаються добрим розвитком і добре розвинутою кореневою системою, пересадити в ящики або горшки, наповнені сумішшю торфу і піску (співвідношення 3:1).

11. Для кращого вкорінення і приживання пробіркових рослин суниці в ґрунті, накрити їх ковпаком з поліетиленової плівки.

Контрольні запитання:

1. Назвіть основні складові живильних середовищ, які використовують для індукції коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці. 2. Який фітогормон додають для вкорінення бруньок? 3. При яких умовах проводять культивування суниці?

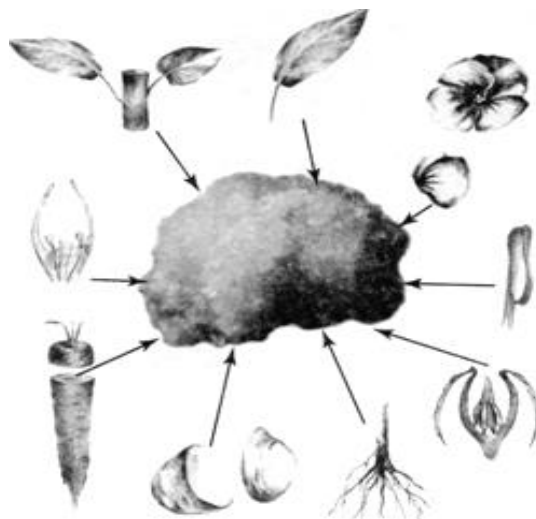
## Розділ 2.2. КАЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН

В основі культивування рослинних клітин лежить властивість тотипотентності, завдяки якій соматичні клітини рослини здатні повністю реалізовувати спадкову інформацію, тобто забезпечити розвиток всієї рослини, оскільки на відміну від тваринної, рослинна клітина менш вимоглива до умов культивування. У відповідь на поранення паренхімні клітини, поміщені на поживне середовище, яке містить фітогормони, дедиференціюються, переходять до поділу і утворюють калус (недиференційовану тканину).

Калус – це неорганізована маса тканини, що складається з дедиференційованих клітин. Утворення і ріст калусу контролюються фітогормонами групи ауксинів і цитокинінів.

Процесу утворення калусу передуює дедиференціація тканин експланту, в результаті якої втрачається структура, характерна для перебігу специфічних функцій в рослині, і повернення до стану клітин, що діляться. Якщо експлант є фрагментом органу, то він в своєму складі має епідермальні клітини, клітини камбію, судинної системи, серцевину і первинну паренхіму. Переважно діляться клітини камбію та серцевинної паренхіми.

Різне походження тканин калусних клітин є однією з причин гетерогенності калусної тканини, оскільки деякі функціональні особливості початкових клітин передаються у ряді клітинних поколінь як стійкі модифікації (рис. 3).



**Рисунок. 3 Типи клітин і тканин з яких можна отримати калус.**

В біотехнології виділяють два типи культивованих рослинних калусних клітин: нормальні і пухлинні. Нормальні клітини в культурі можуть існувати у вигляді суспензії, на рідкому поживному середовищі, і на поверхні твердого поживного середовища, у

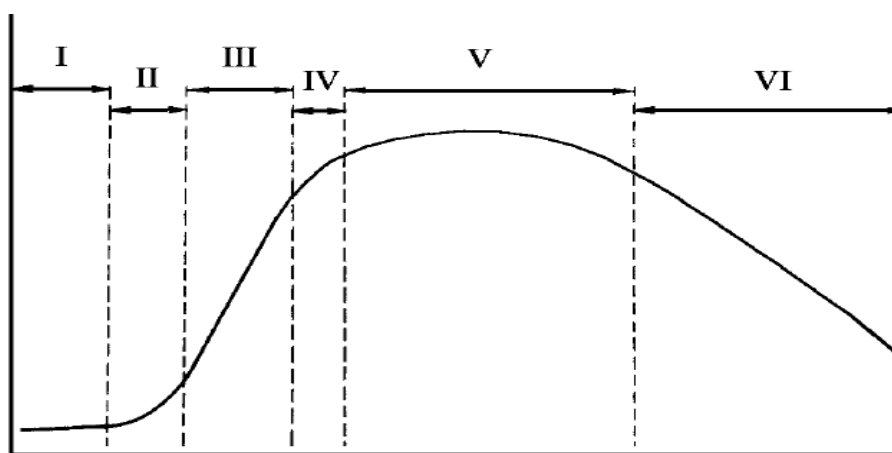
вигляді калусу. Пухлинні клітини морфологічно мало відрізняються від калусних. Фізіологічною відмінністю є їх гормонезалежність. Завдяки цій властивості вони діляться і ростуть на поживних середовищах без фітогормонів та позбавлені здатності започаткувати нормально організовані структури (коріння, пагони) в процесі органогенезу, іноді утворюють тератоми (потворні органоподібні структури), подальший розвиток яких неможливий.

Залежно від походження і умов вирощування калусні тканини бувають:

- рихлі, сильно обводнені, що легко розпадаються на окремі клітини;
- середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;
- щільні, із зонами зредукованого камбію і судин.

У циклі вирощування калусу після низки поділів проходять звичайний для рослинної клітини онтогенез. Рослинні клітини вступають у фазу росту шляхом розтягування, потім диференціюються як зрілі калусні клітини і, нарешті, деградують. Крива росту калусних тканин має S-подібну форму (рис. 4) і характеризується наступними фазами:

- 1) латентна (лаг) фаза – видимий ріст інокулянту не спостерігається.
- 2) експоненціальна фаза – характеризується ростом максимальної швидкості, мітотичною активністю, а також переважаючою кількістю дрібних клітин меристематичного типу.
- 3) фаза лінійного росту – монотонний ріст.
- 4) фаза уповільненого росту – пов'язана із субстратним лімітуванням та інгібуванням продуктами обміну. Характеризується незбалансованим ростом популяції.
- 5) стаціонарна фаза – характеризується низькою швидкістю деградації клітин, що врівноважується діленням клітин, високими біосинтетичними та біотрансформуючими потенціями життєздатних диференційованих клітин.
- 6) фаза деградації клітин із граничною швидкістю росту, що набирає негативних значень.



**Рисунок 4. Фази кривої росту популяцій рослинних клітин (логарифм кількості життєздатних клітин):**

I – лаг-фаза; II – експоненціальна фаза; III – фаза лінійного росту;  
IV – фаза уповільненого росту; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання типу.

Суть методу вирощування ізолюваних тканин рослин і отримання калусу полягає в тому, що виділений шматочок тканини (експлант) стерилізують і переносять на штучне поживне середовище, що містить мінеральні солі, органічні речовини, фітогормони. На такому поживному середовищі клітини починають ділитися. Диференційовані клітини зазнають дедиференціації і переходять до ділення, утворюючи первинний калус. Калус,



що утворюється на експлантах через чотири-шість тижнів переносять на свіже поживне середовище (субкультивування).

## **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 7**

### **Тема: ОДЕРЖАННЯ І КУЛЬТИВУВАННЯ КАЛУСУ ІЗ СТЕБЕЛ СТЕРИЛЬНИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ**

**МЕТА:** навчитися одержувати і культивувати калусну тканину з рослин картоплі.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** стерильні рослини картоплі в пробірці (бажано декілька сортів), стерильний пінцет, стерильний скальпель, стерильний матрацик або чашка Петрі, спиртівка, 96%-й спирт у фарфоровому стаканчику, стерильне поживне середовище для одержання і культивування калусу картоплі у конічних колбах або пробірках, ножиці, сірники.

#### *Теоретична частина*

Рослини картоплі можна використати для отримання калусної культури. Для цього листки і сегменти стебла культивують на середовищі *MS* з 2 мг/л пантотенату кальцію і 0,25–0,5 мг/л БАП або 1–2 мг/л 2,4-Д і 0,2 – БАП. Виявлено, що інтенсивність калусоутворення і його морфогенна здатність залежать від генотипу рослини, пори року, експланта та гормонального складу поживного середовища. Так, для багатьох сортів картоплі калус швидше утворюється на експлантах стебла, ніж на листках. Для індукції калусу на листках до середовища додають 3 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л БАП. Для кожного сорту склад поживного середовища підбирають емпірично. На оптимальному середовищі первинний калус утворюється за 3–5 тижнів, його субкультують кожні 4 тижні. Із калусної тканини стебла пагони проліферують уже через 2–4, з тканини листка – через 3–10 пасажів.

Вік пересаженого калусу суттєво впливає на морфогенні процеси різних сортів картоплі. Найбільше рослин-регенерантів отримано від 5–10-ї субкультури калусу, після 13–24-ї пересадки морфогенна активність знижується (залежно від сорту). Здатність калусної тканини до морфогенезу має сезонний характер: найінтенсивніше регенеранти проліферують у березні–квітні і листопаді–грудні. Рослини, отримані з перших 5 пасажів, як правило, за фенотипом ідентичні вихідному сорту.

#### *ХІД РОБОТИ*

1. Ретельно протерти ламінар зсередини спиртом.
2. Пробірку зі стерильною рослиною картоплі протерти спиртом, горловину пробірки обпалити над полум'ям спиртівки.
3. Стерильним пінцетом (його тримати у лівій руці) витягнути стерильну рослину картоплі з пробірки і покласти її на стерильний матрацик (або стерильну чашку Петрі).
4. Підтримуючи рослину пінцетом, вирізати стерильним скальпелем (його тримати в правій руці) ділянки стебла довжиною 8-10 мм, не захоплюючи міжвузля.
5. Надсікти експланти стебла гострим стерильним скальпелем у декількох місцях для появи в дальшому раневого калусу.
6. Нагріти стерильне середовище (додаток, табл. 7) на плитці до розплаву агару, а потім охолодити до 37-40°C (приблизно температура визначається рукою: дно колби повинне бути теплим).
7. Відкрити колбу із середовищем, обпалити її горловину над полум'ям спиртівки.

8. У стерильні чашки Петрі, де попередньо розміщують розгорнутий цупкий папір, розлити поживне середовище – по 15-30 мл на кожен чашку (наливається приблизно або відмірюється стерильним мірним циліндром).

9. Чашки тримати відкритими мінімальний час. Після розливу поживного середовища чашки закрити і дати середовищу застигнути (це займе 10-15 хв.).

10. Надсічені експланти стебла картоплі стерильним пінцетом розмістити на поверхні агарового середовища, злегка втискаючи їх пінцетом для посилення контакту з поживним середовищем. В одну чашку поміщають 10-20 експлантів. Зробити посадку експлантів різних сортів картоплі.

11. Закрити чашку Петрі і ретельно заклеїти її целофаном у два шари. Целофан слід натягувати рівномірно, щоб уникнути розривів при його всиханні.

12. Поставити чашки Петрі в термостат-кондиціонер без освітлення при температурі 22-25<sup>0</sup>С і вологості 70%. Через 3 тижні розглянути і замалювати утворені калуси. Прослідкувати за особливістю калусоутворення у різних сортів картоплі; зробити відповідні висновки.

#### Контрольні запитання:

1. Що лежить в основі культивування рослинних клітин?
2. Що таке калусна тканина?
3. Назвіть типи культивованих рослинних калусних клітин та охарактеризуйте їх.
4. Назвіть основні фази розвитку калусу.

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 8**

#### **Тема: ПАСАЖУВАННЯ КАЛУСНОЇ ТКАНИНИ НА СВІЖЕ ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ**

**МЕТА:** оволодіти методом пасажування тканин на свіже поживне середовище.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** культура калусної тканини картоплі, пробірки зі стерильним агаризованим середовищем для культивування калусу, стерильний пінцет, стерильний скальпель, стерильні чашки Петрі, 96%-й спирт у фарфоровому стаканчику, спиртівка, сірники.

#### *Теоретична частина*

Для того щоб зберегти здатність до поділу і подальшого росту, шматочок калусної тканини необхідно періодично переносити на свіже поживне середовище. Цей прийом підтримування клітинних поділів носить назву *пасажування тканин*. Періодичність пасажування у різних культур різна. Наприклад, пасажування (пересадка) калусу у картоплі проводиться (залежно від інтенсивності росту) через 3-6 тижнів. Переважно цикл виращування калусу у цієї культури складає 4 тижні.

Пасажувати тканину можна необмежене число разів. Однак при багаторазовому його повторенні можливе «звикання», яке виражається в набутті автономності щодо гормонів і втраті або значному послабленні здатності калусних клітин до регенерації цілої рослини.

#### *ХІД РОБОТИ*

1. Взяти пробірки або чашки Петрі, в яких утворилися калусні тканини, і перенести в ламінар.
2. Підготувати ламінар для роботи в асептичних умовах, внутрішні стінки протерти спиртом.
3. Стерильним скальпелем відділити від калусу старі некротизовані ділянки і шматочки прилиплового агаризованого середовища.

4. Стерильним скальпелем калусну тканину розділити на рівні частини у вигляді невеликих кубиків.
5. В ліву руку взяти пробірку зі свіжим поживним середовищем (*додаток, табл. 8*), правою – вийняти з неї пробку, обпаливши горловину на спиртівці.
6. Вільними пальцями лівої руки припідняти кришку чашки Петрі, а правою рукою за допомогою стерильного пінцета, перенести кубики калусної тканини в пробірку зі свіжим поживним середовищем, злегка втискаючи їх пінцетом в агар для кращого контакту із середовищем.
7. Після цього обпалити горловину пробірки і закрити ватним корком.
8. Верхню частину пробірок обгорнути целофаном; на пробірці поставити дату пасажування.
9. Пробірки помістити в термостат з температурою  $+ 25^{\circ}\text{C}$  і вологістю  $60\%$  на 3-4 тижні.
11. Через 3-4 тижні провести спостереження за ростом калусу і замальовати пробірки з калусною тканиною; зробити відповідні висновки.

Контрольні запитання:

1. Що таке пасажування тканин? 2. З якою метою його проводять пасажування тканин? 3. Як часто можна проводити пасажування?

### **ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9**

*Тема:* ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОГО КАЛУСУ З ЛИСТОВИХ ЕКСПЛАНТІВ ІНТАКТНОЇ РОСЛИНИ

*МЕТА:* засвоїти методи стерилізації та посадки листового матеріалу на живильне середовище, отримати калусні тканини і встановити ефективність процесу для цього типу експлантів.

*МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:* об'єкти – листя кімнатних рослин (небажано використовувати рослини з сильно опушеними листами, оскільки цей фактор значно ускладнює процес стерилізації; розчини білизни різної концентрації, колба зі стерильною дистильованою водою, 70% етанол, чашки Петрі зі стерильною живильним середовищем для індукції калусогенезу, стерильні чашки Петрі з фільтрувальної папером, пінцети, скальпелі, спиртівка, ламінарний бокс.

*Теоретична частина*

Експланти листя більшості видів в умовах *in vitro* здатні до утворення калусу в раневій зоні. Культуру клітин листка використовують також для розмноження деяких видів рослин. Для культивування листя більшості рослин, як правило, використовують середовище Мурасіге-Скуга, Уайта, Ейлера, Гамборга.

### *ХІД РОБОТИ*

1. Листя промити в проточній воді і витримати 1–2 хв. в мильному розчині, промити проточною, а потім дистильованою водою.
2. Простерилізувати 10–20 сек в 70% етанолі, після чого промити в дистильованій воді.
3. Потім листя помістити в стерилізуючий розчин білизни відповідної концентрації на необхідний час, після чого промити стерильною дистильованою водою 3 рази.
4. Для підсушування стерильним пінцетом перенести рослинний матеріал в стерильну чашку Петрі зі стерильним фільтрувальним папером.
5. Стерильним скальпелем розрізати листок на ділянки площею не більше 1 см<sup>2</sup>.
6. На листових експлантах зробити стерильним лезом або скальпелем розрізи уздовж жилок листка – для індукції раневого калусу.

7. Помістити експланти на живильне середовище (перед кожною маніпуляцією інструменти обробляти спиртом і обпалювати в полум'ї спиртівки).

8. Чашки Петрі з експлантами перенести в термостат для індукції калусогенезу при температурі +25° С.

9. Через 4 – 7 днів визначити оптимальні умови стерилізації. Життєздатність культури оцінити через 25 – 30 днів: по периметру або уздовж надрізів життєздатного експланту утворюється калус.

10. Результати оформити у вигляді таблиці. Зробити висновки.

Об'єкт (тип експланта)	Концентрація розчину «Білизни»	Тривалість стерилізації (хв.)	Загальна кількість експлантів, шт.	Кількість асептичних експлантів через 7 днів		Кількість експлантів, які утворили калус	
				штук	%	штук	%
	1:4	10					
		15					
		30					
	1:3	10					
		15					
		30					
	1:2	10					
		15					
		30					
	1:1	10					
		15					
		30					

Контрольні запитання:

- 1.Що лежить в основі утворення кулусу органів?
2. Яка будова калусної тканини?

**ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №10**

*Тема:* Отримання калусу з пиляків вишні і яблуні

*МЕТА:* освоїти метод отримання культури пиляків - андрогенезу.

*МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:* ламінар-бокс, бутони вишні і яблуні, пробірки з середовищем для культивування пиляків, препарувальні голки, пінцети, флакон з 96% спиртом, 6% розчин хлораміну, вата, фольга.

*Теоретична частина*

*Гаплоїди отримують двома способами.*

Перший спосіб класичний – віддалена гібридизація, коли в зиготі віддаленого гібрида хромосоми одного з видів елімінують.

Другий спосіб заснований на методиках культивування in vitro, де з незапліднених статевих клітин із зредукованим набором хромосом можна регенерувати цілі рослини. Зазвичай вони стерильні, оскільки у них порушено формування чоловічих і жіночих гамет. Проте при культивуванні in vitro, може відбутися спонтанне подвоєння хромосом, або його можна викликати штучно, наприклад, обробивши колхацином клітини або рослини. Дигаплоїди фертильні і цілком життєздатні.

Гаплоїди і дигаплоїди мають ряд переваг в селекційній роботі:

- гаплоїдні рослини мають один набір хромосом, характерний для гамет, що дає селекціонерам можливість спостерігати мутації відразу ж в ході огляду гаплоїдних рослин;

- якщо гаплоїдні клітини піддати поліплоїдизації за допомогою колхіцину, то виникнуть дигаплоїди, що характеризуються абсолютною гомозиготністю. Схрещування гомозиготних ліній дає, як правило, високопродуктивне потомство. З іншого боку, в даний час картоплю не розмножують насінням із-за строкатості потомства, а створення за допомогою гаплоїдів гомозиготних ліній усуне цей недолік;

- гомозиготні рослини використовуються селекціонерами і в інших цілях: кількісний генетичний аналіз, вивчення взаємодії генів, вивчення генетичної мінливості, визначення груп зчеплення, встановлення числа генів, що діють на кількісні ознаки, визначення локалізації полігенів і так далі

- гаплоїдні рослини позбавлені летальних або сублетальних мутацій, ведучих до загибелі або ослаблення потомства.

Гаплоїди вищих рослин можна отримати з експлантів, узятих на будь-якій стадії розвитку гаметофіта після редуційного ділення клітин спорогенної тканини пильовика.

*Найбільш поширені наступні методи індукції гаплоїдів:*

- індукований андрогенез в культурі пильовиків і пилку;

- селективна елімінація хромосом в гібридному зародку. Цей метод найчастіше використовується в селекції злакові;

- псевдогамія - розвиток гаплоїдного зародка після запліднення чужорідним пилком без запліднення яйцеклітини або ж розвиток ізольованої сім'ябруньки (гіногенез).

### ХІД РОБОТИ

1. Бутони простерилізувати в 6% розчині хлораміну 10 хвилин, для цього помістити бутони в марлевий мішечок з 20 штук в кожен і опустити в склянку з стерилізуючим розчином, потім ретельно промити бутони стерильною дистильованою водою (5-6 разів).

2. Перенести бутони на стерильну поверхню столу ламінар-боксу, обережно відокремити пилкові мішки від тичинкових ниток.

3. Стерильною препарувальною голкою перенести пиляки на поверхню живильного середовища в пробірки по 5-10 пиляків в кожную.

4. Закрити пробірки і перенести в термостат з температурою 26 ° С і вологістю 70%. Культивувати 2-4 тижні.

Результати ефективності калусогенезу оформити у вигляді таблиці.

Об'єкт, № пробірки	Загальна кількість пиляків	Кількість пиляків, які утворили калус	
		штук	%

Зробити висновки.

Контрольні запитання: 1. Охарактеризуйте будову пиляків. 2. Що таке андрогенез? 3. Яке поживне середовище використовується для культури пиляків?

## Розділ 2.3. КУЛЬТУРИ СУСПЕНЗІЙ

*Клітинна суспензія* – це окремі клітини або клітинні агрегати, які вирощують у рідкому поживному середовищі в умовах постійної аерації. Вирощування клітинних суспензій у рідкому середовищі має низку переваг над вирощуванням калусних тканин поверхневим методом. Тут простіше впливати на метаболізм і ріст клітинних популяцій екзогенними факторами; вони зручніші для біохімічних і молекулярно-біологічних експериментів.

Суспензійні культури рослинних тканин широко використовують для отримання традиційних для рослин сполук вторинного синтезу: алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, полісахаридів, ефірних олій, антиканцерогенів тощо.

### ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 11

#### Тема: ОТРИМАННЯ КЛІТИННОЇ СУСПЕНЗІЇ З КАЛУСНОЇ ТКАНИНИ

*МЕТА:* оволодіти методикою отримання калусної тканини.

*МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:* калусна культура, колби Ерленмейєра на 250 мл з рідким (без агару) середовищем для калусу (100мл середовища на колбу), стерильні чашки Петрі, фольга, пінцети, скальпелі, спирт, спиртівка, ламінар-бокс, шейкер, стерильні лійки з нейлоновими фільтрами.

#### Теоретична частина

Основним способом отримання суспензійних культур є занурення шматочка калусу в рідке середовище, яке переміщується. Для ініціації суспензійної культури потрібно 2-3 г калусної тканини на 60-100 мл рідкого поживного середовища. Первинну суспензію отримують на шейкері (вібраторі), який має швидкість перемішування 100-120 об./хв.

Утворення первинної суспензії рослинних клітин є результатом таких важливих процесів: розпад калусу тканини на клітини та клітинні агрегати; відділення клітин з поверхні калусу; активне ділення та ріст клітин, що утворилися в результаті проходження попередніх двох процесів та їх подальший розпад на більш дрібні агрегати та окремі клітини. Послідовність даних процесів є типовою для росту стабілізованої культури вищих рослин. Критерієм в даному випадку виступає кількісний показник клітин, а також їх сира та суха маси.

Суспензійну культуру можна отримати з фрагмента органа, однак це досить трудомісткий шлях, який потребує більше часу: клітини експланта мають утворити первинний калус, який розпадається на окремі клітини.

Оптимальною для отримання високодиспергованої суспензійної культури є пухка обводнена калусна тканина, вирощена на середовищі 2,4-Д, без іонів  $\text{Ca}^{2+}$ .

Для вирощування клітинних суспензій використовують в основному ті ж поживні середовища, що й для калусних культур. Але є низка середовищ, призначених безпосередньо для вирощування суспензійних культур.

Первинну суспензію перед субкультивуванням фільтрують через один-два шари марлі, нейлонові або металеві ситечка, щоб позбутися великих, щільних грудок калусної тканини, залишків експланта або дуже великих агрегатів. Фільтрування рекомендується і в декількох наступних субкультивуваннях до набуття клітинною суспензією бажаних ознак. Як правило, тривалість пасажу при культивуванні клітинних суспензій становить 14-18 днів. Густина популяцій за цей проміжок часу досягає  $10^5 - 5 \times 10^6$  клітин на 1 мл.

Ріст суспензійних культур можна оцінити за одним або кількома параметрами: 1) об'єм осаджених клітин (ООК); 2) число клітин; 3) сира і суха маса; 4) вміст білка і ДНК; 5) життєздатність клітин.

Для глибинного культивування рослинних клітин використовують закриті системи і періодичному або проточному режимах – способи культивування розроблені в мікробіології.

### ХІД РОБОТИ

1. Перенести шматочки калусної тканини в стерильну чашку Петрі.
2. Стерильним пінцетом подрібнити калус на фрагменти.
3. Фрагменти калусної тканини (2-3 г /100 мл) помістити у колби Ерленмейєра з рідким поживним середовищем для культивування калусу (додаток, табл. 8).
4. Колби з рослинним матеріалом культивувати у темряві на шейкері (вібраторі) при 120 об./хв.
5. Через 10-14 днів середовище з клітинною суспензією профільтрувати через нейлон.
6. Фільтрат розділити на три порції, які розлити у стерильні колби Ерленмейєра.
7. До клітинної суспензії додати свіже середовище, довести об'єм до 100 мл.
8. Колби із суспензійною культурою помістити на шейкер.
9. Субкультивування клітинної суспензії проводити кожні 14-18 днів. Для цього у ламінар-боксі з колби з клітинною суспензією забрати 50-60 мл ( $\approx 2/3$  об'єму) середовища з клітинами і замінити свіжим середовищем того ж складу. Відібране середовище перенести у стерильну колбу Ерленмейєра і свіжим середовищем довести об'єм до 100 мл.

#### Контрольні запитання:

1. Що таке клітинна суспензія?
2. Особливості поживних середовищ для вирощування клітинної суспензії?
3. Яким способом можна отримати суспензійну культуру?
3. Промислове значення клітинних суспензій.
4. Що таке рослинні сполуки вторинного синтезу?

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА 12

### Тема: ПОСІВ СУСПЕНЗІЇ НА ТВЕРДЕ АГАРИЗОВАНЕ СЕРЕДОВИЩЕ

**МЕТА:** оволодіти методикою культивування клітинної суспензії на твердому поживному середовищі з подвійним вмістом агару.

**МАТЕРІАЛИ І УСТАТКУВАННЯ:** суспензія, середовище для висіву суспензії з подвійним вмістом агару (1,2-1,4%), стерильні чашки Петрі, стерильний циліндр.

#### *Теоретична частина*

Перенесення клітин у культуру *in vitro* означає припинення їх існування як одного із структурних елементів цілісного організму, до складу якого входили раніше. При цьому клітина в даних умовах виходить з-під контролю корелятивних факторів, що спрямовують і регулюють діяльність різних органів, тканин і клітин як єдиного цілого. Ці впливи, які за своєю силою перевищують межі норми реакції геному клітин, є стресовими і призводять до кардинальної перебудови функцій і метаболізму клітин, значного підвищення рівня геномної мінливості, зміни напрямку та інтенсивності дії клітинного добору і, як наслідок, до істотних змін в структурі клітинних популяцій. В результаті популяції культивованих клітин відрізняються від вихідних тканин високим рівнем гетерогенності й значними перебудовами геному. Масштабність і глибина перебудов може значно перевищувати навіть міжвидові відмінності, що існують у природі.

В цілому, введення клітин вищих рослин в умовах *in vitro* – процес складний і багатоетапний. Це, по суті, створення нової біологічної системи. Її особливістю є те, що в ній структурні елементи цілісного організму – клітини, що звичайно виконують лише строго визначені функції, стають незалежними організмами, здатними до автономного розвитку. Культивовані клітини вищих рослин є унікальною клоновою популяцією, що не має прямих аналогів у природі, але розвивається й еволюціонує за загальними правилами і законами.

Відсутність класичної комбінативної мінливості дозволяє віднести клітинні популяції до менделівських популяцій. В таких популяціях виникнення, зміна і збереження успадкованого поліморфізму залежить лише від двох чинників – спадкової (некомбінативної) мінливості і добору.

Взаємозв'язок між структурно-елементарними одиницями в клітинних популяціях здійснюється шляхом виділення в середовище та обміну продуктами метаболізму. Існування такого обміну в популяціях культивованих *in vitro* клітин рослин доведене отриманням клонів від окремих клітин і протопластів із використанням ефекту кондиціонування середовищ.

Для проведення клітинної селекції зазвичай застосовують посів дрібноагаризованої суспензії на агаризоване середовище. При цьому одиночні клітини і дрібні агрегати дозволяють отримати клітинні клони, а також досліджувати генетичну і фізіологічну стабільність або мінливість при вирощуванні клонового матеріалу. Окремі клітини також можуть бути ізольовані з суспензії з використанням мікроманіпулятора. Для цього методу суспензія готується різними способами: 1 – 2 мл суспензії відбирають після осідання основної маси клітин; суспензію фільтрують через фільтри з розміром пор, що зменшується (нейлонові або металеві сітки). При цьому використовують багате поживне середовище – середовище Као і Михайлюка. Для створення «годувального шару» використовують суспензію клітин того ж виду рослин, що і поодинокі клітина, або близького виду. Клітинна суспензія береться в ранній експонціальній фазі ростового циклу. Калусна культура, що служить тканиною-«нянькою», також повинна бути в стадії активного росту.

#### ХІД РОБОТИ

1. Суспензію, отриману на попередній лабораторній роботі, наливають в стерильний циліндр і дають їй відстоятися протягом 5 хв.

2. Відбирають піпеткою 5 мл верхньої фракції суспензії (збагаченою одиночними клітинами) і змішують в чистому стерильному циліндрі з 5 мл теплого поживного середовища для росту калусу.

3. Швидко розливають вміст циліндра в чашки Петрі, дають застигнути і закривають целофаном.

4. Через три-п'ять тижнів підраховують колонії діаметром більше 1 мм. Ефективність висіву визначається відношенням кількості колоній, що утворилися, до кількості висіяних клітин, що виражається у відсотках. Зазвичай щільність висіву складає 105 кл/мл. Кількісний показник не повинен бути надто високим, оскільки це є ознакою злиття колоній.

$$\text{Ефективність висіву} = \frac{\text{Кількість новоутворених колоній}}{\text{Кількість висіяних колоній}} \times 100\%$$

Контрольні питання. 1. Які суспензії застосовують для проведення клітинної селекції? 2. Яка кінцева мета клітинної селекції? 3. У чому полягає метод посіву суспензії на тверде середовище?



## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Биотехнология. Принципы и применения: [пер. с англ.] / [под. ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонс]. М.: Мир, 1988. 480 с.
2. Биотехнология: [учеб. пособия. в 8 книгах] / [под. ред. Н.С. Егоров, А.В. Олексин, В.Д. Самуилов]. – М.: выш. шк., 1987. К. 1–8.
3. Біотехнологія : навч. посіб. / О. О. Воронкова та ін. Дніпро : Ліра, 2018. Т. 1. 200 с.
4. Біотехнологія. Навчальний посібник / за ред. Гиль М. І. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476 с.
5. Біотехнологія: Підручник / В. Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.; Під заг. ред. В. Г. Герасименка. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
6. Буценко Л. М., Пирог Т. П. Біотехнологічні методи захисту рослин: підручник – К.: Видавництво Ліра, 2018. – 346 с.
7. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
8. Волова Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0: [электронный ресурс] / Т.Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 183 с.
9. Гаркава К. Г., Косогорова Л. О., Карпов О. В., Ястремська Л. С. Біотехнологія. Вступ до фаху: навч. посіб. К.: НАУ, 2012. 296 с.
10. Грегірчак Н. М., Антонюк М.М., Буценко Л. М.. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: Навч. посіб. К.: НУХТ, 2015. 267 с.
11. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: [учеб. пособие для высш. пед. учеб заведений] / Т.А.Егорова, С.М.Клунова, Е.А.Живухина. — М.: Издательский центр «Академия», 2003. 208 с.
12. Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В., Антіпов І. О. Біотехнологія. Ч. 1. Сільськогосподарська біотехнологія. К.: ЦП «Компринт», 2015. 300 с.
13. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
14. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин: [теорія і практика] / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 2005. – 270с.
15. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології: Лабораторний практикум / За наук. ред. чл.-кор. НАН України, проф. Д. М. Говоруна. К.: Академперіодика, 2010. 232 с.
16. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Коломієць Ю. В. Біоінженерія. К.: ЦП «Компринт», 2015. 550 с.
17. Общая биотехнология: [конспект лекций] / [под. ред. В.А. Блинов]. – Саратов: Саратовский ГАУ, 2003. – Ч.1. – 162 с.
18. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
19. Пляцук Л. Д. Екологічна біотехнологія : принципи створення біотехнологічних виробництв : навч. посіб. / Л. Д. Пляцук. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с.
20. Трофимчук І. М., Плюта Н. В., Логвиненко І. П. Біотехнологія з основами екології. Київ: Кондор, 2019. 304 с.
21. Харчова біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. Ф. Кігель. К.: Вид. Ліра-К, 2016. 426 с.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авксентьева О. А., Петренко В. А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro* – учебно-методическое пособие. – Х. : ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. 60 с.
2. Волова Т.Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. 252 с.
3. Кушнір Г. П., Сарнавська В. В. Мікроклональне розмноження рослин. К.: Наукова думка, 2005. 272 с.
4. Лобова О. В., Пилипчук О. О. Сільськогосподарська біотехнологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія». Київ, 2014. 20 с.
5. Общая биотехнология: [конспект лекций] / [под. ред. В.А. Блинов]. Саратов: Саратовский ГАУ, 2003. Ч.1. 162 с.

## ДОДАТКИ

**Таблиця 1**

Поживне середовище *Мурасіге-Скуга* (MS) для вирощування ізольованих тканин і клітин рослин в умовах *in vitro*

Компоненти середовища	Вміст, мг/л	Компоненти середовища	Вміст, мг/л
<i>Макроелементи</i>		CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
KNO <sub>3</sub>	1900	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	<i>Вітаміни</i>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Мезоінозит	100
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	Нікотинова кислота	0,5
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440	Піридоксин-HCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8	Тіамін-HCl	0,1
Na <sub>2</sub> ЕДТА	37,3	Гліцин	2,0
<i>Мікроелементи</i>		Гідролізат казеїну	1000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	<i>Регулятори росту</i>	
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3	ІОК	2,0
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	Кінетин	0,2
KJ	0,83	<i>Джерело вуглеводів</i>	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25	Сахароза	30000

pH-5,6-5,8

**Таблиця 2**

Модифіковане поживне середовище *Мурасіге-Скуга* для культивування апікальних меристем картоплі

Компоненти поживного середовища, мг/л			
Мінеральні елементи	MS*	Гіберелова к-та	
Сахароза	20000	Нікотинова к-та	2
Глюкоза	20000	Фолієва к-та	0,5
Гідролізат казеїну	1000	Кінетин	0,5
Мезоінозит	100	Пантотенат Са	10
Тіамін	1	Рибофлавін	0,5
Піридоксин	1	Біотин	1
Аденін	40	Активоване вугілля	10000
Вітамін В <sub>12</sub>	0,015	Агар-агар	7000

pH – 5,7 – 5,8

\* За прописом *Мурасіге-Скуга*

Таблиця 3

Основні методи стерилізації органів рослин при введенні їх у культуру *in vitro*

Тканина	Метод			
	предстерилізація	стерилізація	постстерилізація	посадка на агар і одержання калусу
Насіння	Занурити матеріал в абсолютний етанол на 10 с або в розчин NaOCl (1-1,5% активного хлору) на 15 хв. Промити в дистильованій воді (вимочувати протягом ночі в ди-стильованій воді для ізолювання корінця та інших органів )	Відібрати насіння з інтактними насіннєвими оболонками. Занурити NaOCl (1-1,4% активного хлору) на 20 хв. Іншим стерилізуючими агентами можуть бути 10% (маса до об'єму) гіпохлорит кальцію або 1% (маса до об'єму) бромована вода. Бажано використати 0,05% детергент (наприклад, типол), особливо для насіння з шорсткою поверхнею	Промити 3 рази в дистильованій воді	1. Дуже дрібне насіння для індукції калусу або пророщування може бути посаджене на поверхню агаризованого середовища. 2. Насіння може бути пророщене на змоченому дистильованою водою стерильному фільтрувальному папері або на середовищі без фітогормонів. Це дає добрий стерильний корінь, пагін або листок для одержання калусу. 3. У більш крупного насіння можна відсікнути кінчики зародкового корінця або бруньки і безпосередньо перенести їх на середовище для індукції калусу.
Сегменти стебла або кореня	Відмити дочиста під струменем води. Занурити на 10 с в абсолютний спирт.	Занурити в NaOCl (1-1,4% активного хлору) на 20 хв. Відрізати кінці (де клітини вбиті) і відрізати стерильним скальпелем	Промити 3 рази в дистильованій воді. Висушити між листками стерильного паперу	Посадити вертикально в агаризоване середовище для індукції калусу.
Запасаючі органи (бульби, коренеплоди)	Відмити дочиста під струменем води.		Промити 3 рази в дистильованій воді	Стерильним скальпелем зняти шкірку. Ізолювати дрібні диски тканин з допомогою коркобура або скальпеля. Для індукції калусу помістити їх на поверхню агаризованого середовища лицьовою стороною вниз

Таблиця 4

Модифіковане поживне середовище *Мурасіге-Скуга* для мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів

Компоненти поживного середовища, мг/л			
Мінеральні елементи	MS*	Нікотинова к-та	2,0
Сахароза	30000	Кінетин	0,5
Гіберелова к-та	2,0	Пантотенат Са	10,0
Аденін	40	Активоване вугілля	10000
Тіамін	1	Агар-агар	7000
Піридоксин	1		

pH – 5,8

\* За прописом *Мурасіге-Скуга*

Таблиця 5

Модифіковане поживне середовище *Мурасіге-Скуга* для культивування апікальних меристем суниці

Компоненти поживного середовища, мг/л			
Мінеральні елементи	MS*	Нікотинова к-та	0,5
Хелат заліза	5,0	6-БАП	0,50
Аскорбінова к-та	1,0	Глюкоза	20000
Тіамін	0,5	Агар-агар	7000
Піридоксин	0,5		

pH – 5,8

\* За прописом *Мурасіге-Скуга*

Таблиця 6

Поживне середовище для коренеутворення при мікроклональному розмноженні суниці великоплідної

Компоненти поживного середовища, мг/л			
Макросолі	за Уайтом	Піридоксин	0,5
Мікросолі	MS*	Нікотинова к-та	0,5
Цитрат заліза	3,5	ІОК	0,5
Аскорбінова к-та	1,0	Сахароза	20000
Тіамін	0,5	Агар-агар	7000

pH – 5,6 – 5,8

\* За прописом *Мурасіге-Скуга*

Таблиця 7

## Поживне середовище для культивування калусу із стебла картоплі

Компоненти поживного середовища, мг/л			
Мінеральні елементи	MS	Гліцин	1,0
Сахароза	20000	Нікотинова кислота	5,0
Глюкоза	20000	Фолієва кислота	0,5
Гідролізат казеїну	1000	Зеатин	0,05
Мезоінозит	100	Кінетин	0,2
Тіамін	0,5	2,4-Д	3,0
Піридоксин	0,5	Агар	7000
Аденін	1,0		

pH – 5,8

\* За прописом *Мурасіге-Скуга*

Таблиця 8

## Склад поживних середовищ для культивування калусної тканини картоплі, мг/л

Компонент	Призначення середовища		
	Для одержання рихлого калусу		Для тривалого пасажування калусних тканин
	за прописом А.А. Кучка (1982)	за прописом Л.М. Хромової (1984)	
Макроелементи	За прописом <i>Мурасіге-Скуга</i>		
Мікроелементи	-		
Fe-хелат	-		
Вітамін В <sub>1</sub>	2,0	0,5	1,0
Вітамін В <sub>6</sub>	0,8	0,5	-
Гідролізат казеїну	-	1000	500
Мезоінозит	20	200	100
Аденін	-	1,0	-
Гліцин	-	1,0	-
Нікотинова кислота	-	5,0	-
Фолієва кислота	-	0,5	-
БАП	-	-	0,2
Кінетин	-	0,2	-
2,4-Д	2,0	3,0	1,0
НОК	-	-	2,0
Сахароза	20000	20000	30000
Глюкоза	-	20000	-
Агар	0,7%	0,7%	0,7%

pH – 5,7-5,8

Навчально-методичне видання

**Валентина Андрєва  
Тетяна Бортнік  
Юлія Рибак  
Марія Шепелюк**

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт

Друкується в авторській редакції

Надруковано на власному обладнанні  
Тираж 50 шт.