

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ  
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ  
**«БІОТЕХНОЛОГІЯ КУЛЬТУР РОСЛИН І ТВАРИН»**  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ  
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401 – «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біотехнологія культур рослин і тварин» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладачі: д. б. н., проф. В. В. Никифоров,  
старш. викл. О. О. Никифорова

Рецензент к. б. н., О. А. Сақун

Кафедра біотехнологій та біоінженерії

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №\_\_ від\_\_\_\_\_2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	5
Лабораторна робота № 1 Техніка культивування ізольованих клітин і тканин рослин на штучних живильних середовищах в умовах <i>in vitro</i> .....	5
Лабораторна робота № 2 Приготування поживного середовища.....	13
Лабораторна робота № 3 Особливості культивування калюсних культур.....	22
Лабораторна робота № 4 Вивчення техніки вирощування безвірусного матеріалу.....	26
Лабораторна робота № 5 Культивування апікальних меристем картоплі.....	32
Лабораторна робота № 6 Мікроклональне розмноження рослин.....	38
Лабораторна робота № 7 Використання генетичної інженерії на рівні хромосом.....	44
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	48
Список літератури.....	50

## ВСТУП

**Мета курсу** – забезпечити наявність у бакалаврів необхідний рівень знань та навичок з біотехнології рослин, передбачений чинними Державними освітніми стандартами. За вивчення спеціального курсу «Біотехнологія рослин» студенти **повинні**:

– **зрозуміти** механізми біотехнологічних процесів, які використовуються при створенні сортів сільськогосподарських рослин з заданими властивостями;

– **знати** сучасні технології створення та приклади практичного використання трансгенних рослин, стійких проти біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища;

– **уміти** активно використовувати дані літератури для визначення правильного напрямку дослідів з метою збільшення генетичного різноманіття серед значимих для людини представників царства Рослини.

Переплетення наукових знань з практичним, часто промисловим використанням теоретичних набутків. Біотехнології, що застосовуються для представників різних царств організмів, мають певні відмінності, пов'язані з особливостями морфології, фізіології цих організмів, тому вважається за доцільне розглядати як окремі розділи:

- біотехнологію рослин;
- біотехнологію тварин;
- біотехнологію мікроорганізмів.

Дані методичні вказівки забезпечать студентам можливість опанувати потрібні знання та навички в галузі біотехнології рослин.

**Міждисциплінарні зв'язки.** Дисциплінами, що забезпечують курс «Біотехнологія рослин», є ботаніка, морфологія та анатомія рослин, цитологія, генетика, хімія, молекулярна біологія. Під час вивчення спецкурсу відбувається систематизація та закріплення знань. Знання, які отримують студенти після проходження спецкурсу, є необхідною складовою професійних знань та вмінь для роботи в науково-дослідних лабораторіях.

## ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

### Лабораторна робота № 1

**Тема.** Техніка культивування ізольованих клітин і тканин рослин на штучних живильних середовищах в умовах *in vitro*

**Мета:** оволодіти технікою простих і диференційованих методів культивування ізольованих клітин і тканин рослин на штучних живильних середовищах в умовах *in vitro*

**Матеріали та обладнання:** чашки Петрі (3 шт., одна з фільтрувальним папером), стакани хімічні на 300–500 мл (4 шт.), колба на 1 л з дистильованою водою, пробірки з поживним середовищем М-С без гормонів і з гормонами (2,4 Д – 2,0 мг/л, кінетин – 0,2 мг/л), скальпелі, пінцети, голки, марлеві мішечки (4 шт.), 1 % розчин бікарбонату натрію, крафт-папір, шпагат, ножиці, папір фільтрувальний або інший для матрациків, пральний порошок, хромпик, автоклав, сушильні шафи, фарфорові стакани (2 шт.), спиртівка, целофан, сірники.

**Навчальні елементи:** ламінар-бокс, стерилізація, бідистилят, автоклав, експлант, мікроклонування.

### Короткі теоретичні відомості

**1. Методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізольованих клітин і тканин рослин**

**Пояснення.** *Всі досліді необхідно проводити у стерильних приміщеннях – боксу і ламінар-боксах.* Стерилізують бокс, інструменти, посуд, рослинний матеріал, поживні середовища, ватні корки та всі інші матеріали, необхідні для роботи (табл. 1.1).

**Стерилізація посуду.** Весь посуд, що використовується для приготування, зберігання поживних середовищ і вирощування рослинного матеріалу, піддається старанному миттю.

Найбільш поширеним і надійним методом очистки і обеззараження скляного посуду є обробка його концентрованою сірчаною кислотою з

біхроматом калію на протязі 4–6 годин з наступним промиванням теплою проточною водою впродовж 5 хвилин та двохразовим обполіскуванням дистильованою водою і один раз – бідистиліатом.

Можна застосовувати і таку схему миття: попереднє замочування у розчині 0,3 % перекису водню, потім миття розчином прального порошку з наступним обполіскуванням проточною водою, дистиліатом і бідистиліатом, як вказувалось вище. Після висихання посуд прожарюють в сухожаровій шафі за температури + 160° С протягом 2 год. (з моменту встановлення потрібної температури). При такому нагріванні гинуть не тільки бактерії, але й їх спори.

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

Ще більш строгої стерилізації можна добитися 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 автоклавуванні градуйованих піпеток верхню частину їх загортають ватою і кожну загортають у папір окремо. Автоклавують під тиском 2 атм. протягом 25–30 хв.

**Стерилізація ламінар-боксу.** Ламінар-бокси призначені для культури ізольованих клітин, тканин і деяких інших робіт, які вимагають 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 розміщують спиртівку, сірники, фарфоровий стакан з 96 % спиртом і стакан із стерильною водою. Розміщують також стерильний посуд та інструменти, необхідні для роботи. При вичлененні апікальної меристеми (картоплі, великоплідної суниці) у ламінарі розміщують бінокулярну лупу.

Перед початком роботи необхідно ретельно вимити руки з милом і протерти їх спиртом, одягти стерильний халат, зав'язати волосся стерильною

марлевою косинкою або одягти стерильну шапочку. Розпочинати роботу слід з ретельного протирання внутрішньої поверхні ламінару, спиртівки, пробірок з поживним середовищем 70 % спиртом.

Основною умовою успішного культивування ізолюваних культур є стерильність поживного середовища, посуду, матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу, приміщення для ізоляції і пересадки. Як показала практика, неохайність при проведенні експериментів в культурі *in vitro*, навіть при хорошому забезпеченні робочого місця, зводить до нуля всі зусилля. Саме тому чистота значно важливіша, ніж унікальне спеціальне обладнання.

В зв'язку з цим роботи з мікроклонування проводять в асептичних умовах – в операційних кімнатах чи ламінар-боксах.

На першому етапі операційну кімнату очищають від бруду і пилу миттям водою з будь-яким миючим засобом. На другому етапі проводять її стерилізацію ультрафіолетовим опромінюванням на протязі 1,5–2 годин.

#### ***Стерилізацію рук проводять за допомогою 96° етилового спирту.***

В ламінар-боксі перед роботою інструменти ще раз стерилізують, опускаючи в стакан з 96° етиловим спиртом і обпалюючи кожен із них у полум'ї спиртівки. Після цього їх кладуть на стерильну чашку Петрі і використовують тільки для однієї маніпуляції перед повторним використанням інструментів стерилізацію в полум'ї спиртівки повторюють.

Перед відкриванням колби чи пробірки з поживним середовищем їх обтирають ватою, змоченою в спирті, горловину обпалюють над полум'ям спиртівки.

Проводячи посадку експлантів, колбу треба тримати під кутом поблизу полум'я спиртівки. Після посадки ковпачок із фольги обпалюють і швидко закривають ним колбу чи пробірку.

Розрізання рослин зручно проводити на стерильних салфетках із фільтрувального паперу.

**Стерилізація інструментів.** Попередня стерилізація інструментів (скальпелів, пінцетів, голок і т.д.) полягає в нагріванні сухим жаром у

сушильній шафі протягом 2 год. при 140° С. Шприци, ножиці, пробочні свердла зручніше кип'ятити.

***Металічні предмети не можна автоклаувати: під дією пари вони вкриваються іржею і затуплюються.***

Безпосередньо перед роботою і в її процесі інструменти ще раз стерилізують в ламінарі, помішуючи їх у фарфоровий стакан з 96 % етиловим спиртом і обпалюючи в полум'ї спиртівки. Після стерилізації обпалюванням кожний інструмент помішають між листками попередньо простерилізованого паперу, складеного в пачку. ***Стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції.*** Перед повторним вживанням його слід знову простерилізувати спиртом і обпалити. Дуже тонкі інструменти (голки, кусочки бритвочок) можуть втрачати свої властивості при обпалюванні, тому їх стерилізують, занурюючи в спирт.

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

**Стерилізація рослинного матеріалу.** Для стерилізації насіння; верхівкових меристем, кусочків тканини, виділених з різних частин рослини; застосовують наступні розчини: 0,1 % сулеми (двохлориста ртуть), 0,1 % діациду, 13–20 % пергідролі, 3–6 % хлораміну, 10 % гіпохлориту натрію або кальцію.

Діацид готують, розчинюючи окремо 330 мг етанолмеркурхлориду і 660 мг ацетилпіридинію хлориду в гарячій воді (приблизно 300 мл), потім їх змішують і доводять об'єм рідини до 1 л, додають декілька крапель детергенту твін-80; зберігають у щільно закритій колбі в темноті.

Перед стерилізацією тканину рослини попередньо очищують: Коренеплоди, бульби, товсті стебла рослин ретельно миють щіточкою з милом у теплій проточній воді, знімають шкірку (у коренів і коренеплодів), кору (у листків), промивають дистильованою водою і опускають на декілька секунд (насіння – на 1–2 хв.) в 70 % етиловий спирт. Обробка тканин етанолом



підвищує ефект основного стерилізуючого розчину. Потім рослинні об'єкти багаторазово прополіскують у стерильній воді.

Пергідроль рекомендується використовувати для квасолі, соняшника (з очищеною шкіркою), сулему – для томатів, гарбузів та ін. Тривалість стерилізації різних об'єктів подана у табл. 1.2

Після обробки рослинних об'єктів стерилізуючими розчинами (згідно з прийнятими експозиціями), їх залишки видаляються прополіскуванням у стерильній воді. Найлегше відмивається пергідроль. Після сулему і діациду воду міняють 5–6 разів.

Насіння помідорів, яблуні, гарбузів, бобів, тютюну до часу дозрівання знаходиться в м'ясистих, дерев'янистих або кістянкоподібних покривах. Тому здорові, з непошкодженою поверхнею плоди цих культур достатньо ретельно промити мильною водою, потім декілька разів спиртом, після чого в строго асептичних умовах їх розрізують. Стерильним пінцетом виймають насіння і поміщують його в стерильні чашки Петрі для пророщування (на фільтрувальному папері, ваті).

**Стерилізація поживних середовищ.** Розлиті в пробірки поживні середовища закривають ватними корками, загортають у целофан і автоклавують за температури 120° С і тиску 1 атм протягом 20 хв.

Середовище, яке не містить термолабільних речовин, стерилізується автоклавуванням при тиску 1 атм за об'єму середовища 25–50 мл – протягом 20 хв., 1–2 л середовища – протягом 30–40 хв. Для стерилізації розчинів з термолабільними речовинами (вітаміни, антибіотики, аміно-кислоти рослинні екстракти, абсцизова кислота), які руйнуються під час автоклавування, використовують бактеріальні фільтри. У цьому випадку стерилізацію проводять у стерильному боксі

Невеликі об'єми середовища можна стерилізувати, використовуючи побутову скороварку. Термостійкий посуд із середовищем ставлять на решітку, розташовану на дні каструлі і покриту тканиною. Час стерилізації 15–20 хв., після чого скороварка повинна помалу остигнути до нормального тиску. Потім

в умовах стерильного боксу не остуджене середовище розливають у культуральний посуд.

*Зберігати готові середовища рекомендують при 10° С.* При кімнатній температурі інфекція на середовищі з'являється через 5–10 днів, тому, якщо немає впевненості у стерильності приготованого середовища, окремий культуральний посуд з середовищем повинен підлягати контролю.

**Холодна стерилізація.** Органічні рідини, які не витримують нагрівання, звільнюються від бактерій пропусканням через стерильні дрібнопористі бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

### **Хід роботи**

1. Простерилізувати інструменти, посуд і поживні середовища, які необхідні для проведення робіт з вирощування стерильних паростків і одержання калусних тканин.

2. Загорнути в щільний папір і простерилізувати сухим жаром у сушильній шафі протягом 2 год. при температурі + 160° 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 поміщенням у сушильну шафу інструменти загорнути в щільний папір.

4. Простерилізувати в автоклаві паперові матрацики і дистильовану воду в колбі. Матрацики 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. Автоклавувати 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 автоклавувати при тиску 1 тм протягом 20 хв. Одночасно в автоклаві слід простерилізувати марлеві мішечки для рослинного матеріалу. Перед поміщенням в автоклав мішечки загорнути в целофан або обгортковий папір.

Таблиця 1. 1 – Методи стерилізації під час проведення робіт в умовах *in vitro*

Прилади і об'єкт	Тривалість	Метод стерилізації	Примітка
Ламінар-бокс	2год.	Бактеріальними фільтрами Бактерицидними УФ лампами 70 % етиловим спиртом	Нагнітання повітря Опромінення Протирання поверхні
Посуд	– – – 2год. 25–30 хв.	Детергентами Хромпіком Дистильованою водою Сухим жаром – 160° С Вологим жаром – 2 атм	Миття Ополіскування Сушильна шафа Автоклав
Інструменти	2 год. 1 год. – –	Сухим жаром – 140 °С Кип'ятінням 96 % етиловим спиртом (ріжучі, колючі) 96 % етиловим спиртом	Сушильна шафа Уводі Протирання  Обпалювання в полум'ї
Матеріали	25–30 хв.	Вологим жаром – 2 атм (вата, марля, ватні корки, паперові матрацики, халати фільтрувальний папір)	Автоклав
Рослинний матеріал	Залежно від виду рослинного об'єкта і розчину	0,1 % сулемою 0,1% диацидом. 13–20 % перекисом водню 3–6 % хлораміном 19 % гіпохлоритом Na, Ca Стерильна вода	Прополіскування декілька разів
Поживне середовище	20хв.	Вологим жаром – 120°С , 1 атм	Автоклав
Холодна стерилізація	–	Стерильні дрібнопористі бактеріальні фільтри, з Ø пор 0,45 мкм. Звільнення від бактерій	Органічні сполуки, які не витримують нагрівання (ферменти)

Таблиця 1.2 – Стерилізація різних видів вихідного рослинного матеріалу

Об'єкти	Тривалість стерилізації, хв.			
	Діацид 0,1 %	Сулема 0,1 %	Гіпохлорити Са, 10 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 13–20 %
Насіння сухе	15–20	10–15	15–20	12–15
Насіння набухле	6–10	6–8	10–15	6–8
Тканини м'ясистих коренів, бульб	20–30	15–25	15–20	–
Тканини стебла	20–40	20–25	20–25	–
Листки	1–3	0,5–3	3–6	3–5
Апекси	1–10	0,5–7	3–15	2–7

### Завдання до теми

1. Описати методи стерилізації під час проведення робіт в умовах *in vitro*.
2. Перелічити різні види стерилізації вихідного рослинного матеріалу.
3. Провести стерилізацію інструментів, поживних середовищ і рослинного матеріалу.

### Контрольні питання

1. Які є методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізольованих клітин і тканин рослин?
2. Як проводиться стерилізація посуду?
3. Як проводиться стерилізація інструментів?
4. Як проводиться стерилізація матеріалів?
5. Як проводиться стерилізація поживних середовищ?
6. За допомогою чого забезпечується стерильність?
7. Що таке холодна стерилізація?

**Література:** [1, с. 13–15; 2, с. 24; 3, с. 12–15; 5, с. 14–17; 6, с. 36–38; 7, с. 45–47; 9, с. 19–22].

## Лабораторна робота № 2

### Тема. Приготування поживного середовища

**Мета:** оволодіти технікою приготування поживних середовищ для клітинних і тканинних культур.

**Матеріали та обладнання:** стакани хімічні на 1 л (4 шт.), колби з притертими корками для зберігання маточних розчинів (на 1 л – 3 шт., на 100 мл – 1 шт.), пляшечки з-під пеніциліну (10 шт.), мірні піпетки на 10, 5 і 1 мл, вага технічна, вага електронна торзійна або аналітична, електроплитка, набір хімічних реактивів, сахароза, агар-агар, ватні корки, бокс для стерильних робіт, пінцети, розчин стерилізатору («Білизна»), насіння, стерильні: фільтрувальний папір, дистильована вода, лабораторний посуд (чашки Петрі, стакани хімічні), поживні середовища; 70 % розчин етанолу.

**Навчальні елементи:** макроелементи, мікроелементи, фітогормони, ауксин, цитокінін, гіберелова кислота, агар-агар, мікросолі, макросолі.

### Короткі теоретичні відомості

Поживні середовища для культивування ізольованих клітин і тканин повинні містити всі необхідні рослинам **макроелементи**: азот, фосфор, калій, сірку, магній, залізо; **мікроелементи**: бор, цинк, мідь, кобальт, марганець, йод, молібден, а також вітаміни, вуглеводи, фітогормони. Деякі поживні середовища містять гідролізат казеїну, певні амінокислоти. Крім того, до складу поживних середовищ входить ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) або її натрієва сіль, які поліпшують доступність заліза для клітин у широких межах рН.

**Вуглеводи** є не замінними компонентами поживних середовищ для культивування ізольованих клітин і тканин, тому що в більшості випадків останні не здатні до автотрофного живлення. Тому, частіше як джерело вуглеводів використовують сахарозу або глюкозу в концентраціях 20–40 г/л.

Поліцукри, як правило, не використовують як джерело вуглецевого живлення, але, оскільки деякі тканини, наприклад пухлинні, містять активні гідролітичні ферменти (амілаза та ін.), вони можуть рости на середовищах з розчинним крохмалем.

**Фітогормони (регулятори росту)** необхідні для дедиференціювання клітин та індукції клітинних поділів. Тому для одержання калюсних тканин до складу поживних середовищ повинні обов'язково входити **ауксини**, які викликають клітинне дедиференціювання і **цитокиніни**, які індуюють поділ дедиференційованих клітин. Для індукції стеблового морфогенезу вміст ауксинів може бути знижений або вони можуть бути повністю виключені. На середовищах без гормонів ростуть пухлинні і «звиклі» тканини. Автономність стосовно двох гормонів або одного з них пов'язана зі здатністю цих клітин продукувати гормони.

Як джерело **ауксинів** у поживних середовищах використовують 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д), індолілоцтову кислоту (ІОК), а – нафтилоцтову кислоту (НОК). Найчастіше застосовують 2,4 Д, тому що ІОК майже в 30 разів менш активна, ніж 2,4 Д. Для індукції калюсу переважно необхідні високі концентрації ауксинів (частіше це 2,4-Д), при наступних пересадках (пасажуванні) їх зменшують.

Як джерело **цитокинінів** у штучних поживних середовищах використовують кінетин, 6-бензиламінопурин (6-БАП), зеатин (0,001–10,0 мг/л). 6-БАП і зеатин порівняно з кінетином активніші щодо підтримки росту ізолюваних тканин та індукції органогенезу. До складу деяких поживних середовищ входить аденін.

Крім ауксинів і цитокинінів, окремі поживні середовища містять **гіберелову кислоту (ГКз)**. Присутність гіберелової кислоти в середовищі не є обов'язковою, але в деяких випадках вона стимулює ріст ізолюваної тканини.

Для індукції первинного калюсу і рідше для підтримання його росту до поживного середовища іноді додають рослинні екстракти або соки. Найбільшу здатність активізувати ріст має кокосове молоко – рідкий ендосперм кокосового горіха.

Для приготування твердих поживних середовищ використовують **агар-агар**. Це полісахарид, який одержують з морських водоростей. Агар-агар потрібно попередньо добре промити від різних домішок. Найменшу кількість

небажаних домішок містить бактеріальний агар зарубіжного виробництва «Vasto-Agar» (фірма США). Такий агар можна використовувати для приготування: поживних середовищ без попереднього промивання. Переважно для одержання твердого поживного середовища до нього додають 0,3–0,7 % агару.

**З метою економії часу розчини макросолей, мікросолей, вітамінів і фітогормонів готують концентрованими, що дозволяє багаторазово їх використовувати.** Концентрація розчинів макросолей повинна бути більшою в 10–20 разів, мікросолей – 100–1000 разів, вітамінів – у 1000 разів. Концентровані (маточні) розчини зберігають у холодильнику, причому вітаміни потрібно зберігати при мінусовій температурі (у морозильній камері).

Для культивування клітин, тканин і органів тих чи інших рослин використовують поживні середовища різного складу. Найбільш широко використовуються середовища Мурасиге-Скуга (М-С), Уайта, Гамборга (В<sub>5</sub>) Склад цих середовищ подано у табл. 2.3–2.6).

Таблиця 2.1 – Поживне середовище *Мурасиге-Скуга* (М-С) для вирощування ізолюваних 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> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
KNO <sub>3</sub>	1900	CaCl <sub>2</sub> · 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> ·7H <sub>2</sub> O	370	Нікотинова кислота	0,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	Піридоксин - HCl	0,5
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	Тіамін-HCl	0,1
Na <sub>2</sub> EDTA	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> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	ІОК	2
ZnSO <sub>4</sub> · 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> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	Сахароза	30000

pH – 5,6–5,8

Таблиця 2.2 – Склад поживного середовища **Уайта** для клітинних і тканинних культур

Компоненти середовища	Вміст, мг/л	Компоненти середовища	Вміст, мг/л
<i>Макроелементи</i>		CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,02
KNO <sub>3</sub>	80	ZnSO <sub>4</sub>	1,5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,0025
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,5	KJ	0,75
MgSO <sub>4</sub>	360	<i>Вітаміни</i>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	200	Піридоксин – HCl	0,1
KCl	65	Тіамін-HCl	0,1
<i>Мікроелементи</i>		Нікотинова кислота	0,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	Гліцин	3,0
MnSO <sub>4</sub>	4,5	<i>Джерело вуглеводів</i>	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,5	Сахароза	20000

pH – 5,6–5,8

Таблиця 2.3 – Склад поживного середовища **Гамбурга і Евеленга (B<sub>5</sub>)**

Компоненти середовища	Вміст, мг/л	Компоненти середовища	Вміст, мг/л
<i>Макроелементи</i>		CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,0
KNO <sub>3</sub>	2500	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	KJ	0,75
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250	<i>Вітаміни</i>	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150	Мезоінозит	100
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	Нікотинова кислота	1,0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	28,0	Піридоксин - HCl	1,0
<i>Мікроелементи</i>		Тіамін – HCl	10,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	<i>Джерело вуглеводів</i>	
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10,6	Сахароза	20000
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025		

pH – 5,5



Таблиця 2.4 –Модифіковане поживне середовище *Мурасиге-Скуга (М-С)* для мікророзмноження картоплі живцюванням пагонів

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

### **Вирощування стерильних проростків**

Стерильні проростки вирощують з метою одержання експлантів для введення в калюсну культуру. Існує два можливих шляхи використання стерильних проростків:

1) для одержання експлантів із диференційованих тканин, які при перенесенні на поживне середовище, що містить фітогормони, дедиференціюються і в результаті інтенсивної проліферації утворюють калюсну тканину;

2) для одержання первинного калюсу безпосередньо на проростках, який може бути ізольований і перенесений в стерильних умовах на поживне середовище, що містить фітогормони, з метою подальшого культивування.

### **Хід роботи**

Приготувати поживне середовище *Мурасиге-Скуга (М-С)*, яке буде використовуватися для виконання наступних лабораторних робіт. Склад поживного середовища наведений у (табл. 2.1, 2.4).

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 *Мурасиге-Скуга*, а також кількість маточного розчину, яку необхідно взяти для приготування робочого поживного середовища, наведено у табл. 2.5.

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

1. Виготовити згідно з прописом розчин  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Кожну сіль розчинити в окремому хімічному стакані при нагріванні (крім  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), а потім злити разом і об'єм довести до 1л. Розчин  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  вливають останнім без нагрівання, причому в охолоджену суміш, що попереджує випадання осаду.

2. Виготовити згідно з прописом розчин  $\text{CaCl}_2$ .

3. Виготовити згідно з прописом розчин хелату заліза (розчин  $\text{FeSO}_4$  і  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , який потрібний для утворення хелату заліза, слід нагріти до кипіння).

4. Виготовити згідно з прописом розчин мікроелементів.

5. Виготовити згідно з прописом розчин мікроелементів.

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

7. 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 Мурасиге-Скуга. Зберігають розчин у пляшечках-флакончиках з-під пеніциліну в замороженому стані.

Виготовити розчини 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 0,5 N NaOH або KOH, абсцизову кислоту (АБК) – у 70 % етанолі. Потім розчини підігривають (крім АБК) і заливають водою до об'єму 100 мл (1 мл містить 1 мг гормону). У холодильнику їх можна зберігати за температури + 4° С, але не більше одного місяця.

На основі маточних розчинів готують поживне середовище М-С, яке буде використовуватись на наступних заняттях для одержання і культивування

калюсних тканин, культивування, апікальних меристем картоплі, суниці і т.д.

Таблиця 2.5 – Розрахунки для приготування маточних розчинів поживного середовища **Мурасиге-Скуга (М-С)**

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1л середовища, мл
<b>Макросолі, г. на 1 л маточного розчину</b>			
KNO <sub>3</sub>	38	4° С	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°С	5
CaCl <sub>2</sub> безводний	8,8		
<b>Fe-хелат, мг на 100 мл маточного розчину</b>			
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	557	4° С	5
Na <sub>2</sub> ЕДТА · 2H <sub>2</sub> O	745		
<b>Мікросолі, мг на 100 мл маточного розчину</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	4° С	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		
<b>Органічні компоненти, мг на 10 мл маточного розчину</b>			
Мезоінозит	1000	-20° С	по 1 мл
Нікотинова к-та	5		
Піридоксин HCl	5		
Тіамін HCl	5		
Гліцин	20		
Сахароза	–	кімнатна	30г/л
Агар	–	кімнатна	7г/л

## **II. Послідовність приготування робочих розчинів (робочого поживного середовища) 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 (0,1 N KOH, NaOH) або кислоти (0,1 N HCl).

7. У другий хімічний стакан налити 300 мл дистильованої води. У ній розчинити 7 грамів 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.

## **III. Вирощування стерильних проростків томатів і баклажанів**

1. Готують розчин стерилізатору. 1 частина «Білизни» і 2 частини стерильної дистильованої води.

2. Відбирають здорові, однакові насінини, ретельно промивають їх в мильному розчині, потім ополіскують водопровідною водою і дистильованою водою. Насіння поміщають в марлевий мішок.

3. Роботу проводять в ламінар-боксі. Насіння занурюють в 70 % розчин етанолу. Потім у склянку із стерилізатором («Білизна») занурюють насіння і залишають на 15–20 хвилин. Насіння тричі по 10 хвилин промивають стерильною дистильованою водою, обсушують на фільтрувальному папері і розміщують в чашки Петрі на поживне середовище.

Склад поживного середовища для пророщування проростків (мг/л):

<i>Макросолі по МС</i>	<i>50 мл</i>
<i>Мікросолі по МС</i>	<i>0,5мл</i>
<i>Fe – халат</i>	<i>5 мл</i>
<i>Вітаміни по М-С</i>	<i>0,5 мл</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20 г</i>
<i>Агар- агар</i>	<i>7-8 г</i>
<i>pH – 5,6–5,8</i>	

4. Чашки Петрі забивають парафіном і ставлять до термостату для пророщування насіння з отримання стерильних проростків (температура +23–25° С, абсолютна темрява). Через 3–4 доби перевіряють чистоту посіву. Показники заносять в таблицю 2.6

Таблиця 2.6 – Результати ефективності стерилізації насіння

Насіння	Концентрація розчину «Білизни»	Тривалість стерилізації (хв.)	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння через 7 діб		Схожість насіння		Ефективність стерилізації (%)
				штук	%	штук	%	

### Завдання до теми

1. Ознайомитися з потребами рослин у живильних речовинах.
2. Ознайомитися з класифікацією та вимогами до живильних середовищ.
3. Приготувати живильні середовища для культивування рослин і розлити їх у пробірки й чашки Петрі.
4. Замалювати способи розливу агаризованого живильного середовища у пробірки і чашки Петрі.

## Контрольні питання

1. Які поживні середовища використовують для культивування клітин, тканин і органів тих чи інших рослин ?
  2. Які речовини необхідні для дедиференціювання клітин та індукції клітинних поділів?
  3. Скільки існує шляхів використання стерильних проростків? Які?
- Література:** [3, с. 48–51; 4, с. 7–11; 5, с. 32–41; 6, с. 66–67; 7, с. 58–60; 8, с. 32–34; 10, с. 12; с. 21–23].

## Лабораторна робота № 3

### Тема. Особливості культивування калюсних культур.

**Мета:** оволодіти технікою культивування калюсної тканини із сої та картоплі.

**Матеріали та обладнання:** ламінар-бокс, чашки Петрі, інструменти (пінцети, скальпелі), стерильні проростки сої, флакони з калюсогенним поживним середовищем, стерильні рослини картоплі в пробірці, спирт етиловий 96°, фарфорові склянки.

**Навчальні елементи:** колюс, експлант, ауксин, цитокінін, мікробульби, раневий калюс, ламінар-бокс.

### Короткі теоретичні відомості

#### 1. Одержання і культивування калюсної тканини із сої

**Калюсні тканини** – це дедиференційовані клітини, в які перетворюються спеціалізовані і меристематичні клітини при їх культивуванні на специфічних поживних середовищах *in vitro*.

Калюсна тканина має вигляд аморфної маси тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Клітини колюсу мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК. Деякі клітини здатні накопичувати крохмаль, і речовини вторинного метаболізму. Колір тканин може бути білим, жовтим, зеленуватим, червонуватим, що залежить від виду рослини, типу експланту та умов культивування.

Для індукування калюсної тканини стерильні листки, черешки, сегменти стебла нарізають і поміщають на поживне середовище.

Калюсну тканину можна індукувати із будь якого органу тканини рослини (успіх залежить від виду рослини та тканини). При цьому клітини рослин, які знаходяться на крайній стадії диференціації, під дією індукторів клітинного розмноження – ауксинів та цитокінінів, переходять в дедиференційований стан і (відновлюють меристематичну активність).

Перехід спеціалізованих клітин у стан неорганізованого росту пов'язаний (із синтезом білку в клітинах, збільшенням вмісту РНК, зникненням хлоропластів і хромопластів. При оптимально підбраному середовищі сегменти утворюють калюс через 3–8 тижнів.

Калюсну тканину можна одержати із різних частин як нестерильної рослини, так і з проростків або рослин, вирощених *in vitro*. В останньому випадку техніка одержання калюсу значно простіша так, як матеріал не потребує попередньої стерилізації.

Утворення і ріст калюсу контролюється фітогормонами групи ауксинів і цитокінінів. Диференційовані клітини спеціалізованих тканин під дією ауксинів дедиференціюються, а під впливом цитокінінів переходять до інтенсивного ділення, утворюючи калюсну тканину.

## **2. Одержання і культивування калюсу із стерильних проростків картоплі.**

У відповідь на поранення паренхімні клітини, які перенесені на поживне середовище, що містить фітогормони, дедиференціюються, переходять до ділення і утворюють недиференційовану тканину – калюс.

Калюс може бути одержаний із різних органів рослини, зокрема, у картоплі – із тканин стебла, листків, мікробульб, пиляків.

В залежності від умов культивування і походження калюсні тканини бувають рихлими, крихкими, компактними, середньої щільності добре вираженими меристематичними осередками.

## Хід роботи

### I. Одержання і культивування калюсної тканини із сої

1. Використовують проростки сої, отримані попередньо.

2. Роботу проводять в ламінар-боксі. Стерильні проростки сої виймають стерильним пінцетом із пробірки і поміщають у стерильну чашку Петрі.

3. Сім'ядолі сої стерильним скальпелем відрізають від проростків і розрізають на сегменти.

4. Експланти сім'ядолі поміщають на калюсогенне поживне середовище.

Склад поживного середовища для вирощування калюсної тканини із сім'ядолей сої (мг/л)

<i>Макросолі по Міллеру</i>	<i>100</i>
<i>Мікросолі по Міллеру</i>	<i>1</i>
<i>Вітаміни по Уайту</i>	<i>1</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5</i>
<i>Гліцин</i>	<i>2</i>
<i>Кінетин</i>	<i>0,5</i>
<i>ІОК</i>	<i>2</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7</i>

pH – 5,6–5,8

5. Флакони з сім'ядолями сої поміщають в термостат (+25° С, абсолютна темрява) для отримання калюсної тканини, яка в подальшому буде використовуватись як тест-система на цитокініни.

### II. Одержання і культивування калюсу із стерильних проростків картоплі.

1. Пробірку із стерильною рослиною протирають спиртом обпалюють над полум'ям спиртівки.

2. Пінцетом виймають стерильну рослину із пробірки і поміщають в стерильну чашку Петрі.

3. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізають її на експланти: стебло (довжиною 5–10 мм), листки. На експлантат роблять додаткові надрізи для появи в подальшому раневого калюсу.



4. Експланти поміщають у флакони з калюсогенним поживним середовищем.

Склад поживного середовища для культивування калюсної , тканини картоплі (мг/л)

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Вітаміни МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Фолієва кислота</i>	<i>0,5 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5 мл</i>
<i>Мезоінозит</i>	<i>200 мг</i>
<i>Гідролізат казеїну</i>	<i>1 г</i>
<i>Аденін</i>	<i>1 мг</i>
<i>Гліцин</i>	<i>1 мг</i>
<i>Кінетин</i>	<i>0,2 мг</i>
<i>2,4-Д</i>	<i>3мг</i>
<i>Глюкоза</i>	<i>20г</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20г</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7г</i>

pH – 5,8

5. Флакони з рослинним матеріалом поміщають у темнову культуральну кімнату при температурі 22–25° С і вологості 70 %.

6. Через 14 днів проводять візуальне визначення частоти калюсоутворення на експлантах. Результати заносять у таблицю 3.1

Таблиця 3.1.– Визначення частоти калюсоутворення на експлантах

№ п/п	Тип експланта	Загальна кількість експлантів	Кількість експлантів, що утворили калюс		Індекс росту
			Штук	%	

### Завдання до теми

1. Отримати калюсну тканину з бобових культур (на прикладі сої *Glycine max* з сім'ядолі).

2. Одержати калюсну культуру з тканини стерильних проростків

картоплі.

3. Провести визначення збільшення ваги калюсних культур тканин, кількості клітин на одиницю ваги тканини.

### **Контрольні питання**

1. Назвіть характерні особливості де диференціювання клітин у процесі калюсоутворення *in vivo*.

2. Яка природа геномних змін, що спостерігається в клітинах первинного калюсу?

3. Які зміни ДНК відбуваються під час де диференціювання рослинних клітин?

4. Що вам відомо про структурну мінливість хромосом, яка виявляється в процесі калюсоутворення та які її механізми?

5. Назвіть головні чинники, що зумовлюють мінливість хромосом у клітинах первинного калюсу.

6. Як впливають генотип вихідної рослини та умови вирощування експланта на рівень та спектр геномної мінливості *in vivo*?

7. Що вам відомо про причинити механізми геномної мінливості в процесі дедиференціювання та калюсоутворення?

8. Що лежить в основі геномних реорганізацій при калюсоутворенні *in vivo*?

9. Які чинники індукують геномні реорганізації в процесі дедиференціювання *in vivo*?

**Література:** [3, с. 143–145; 6, с. 122–123; 9, с. 103–105; 11, с. 86–87].

### **Лабораторна робота № 4**

**Тема.** Вивчення техніки вирощування безвірусного матеріалу

**Мета:** оволодіти технікою клонального мікророзмноження суниці; набуття навичок виділення апікальної меристеми часнику.

**Матеріали та обладнання:** рослини часнику із суцвіттям; біноккулярна лупа або мікроскоп біологічний порівняльний; стерилізовані скальпелі,

препарувальні голки, бритвочки, затиснуті в тримачі; пробірки із стерильним поживним середовищем для культивування часнику; спиртівка; сірники; 96 % спирт у фарфоровому стаканчику; столони різних сортів суниці; пробірки зі стерильним модифікованим поживним середовищем М-С для культивування апікальних меристем суниці, стерильні чашки Петрі, стерильне предметне скло, стерилізуючі розчини (0,1 % сулеми або 0,1 % діациду), марлеві мішечки, колба на 1 л із стерильною водою, стерильні хімічні стакани (4 шт.)

**Навчальні елементи:** експлант, клон, кінетин, примордії.

### **Короткі теоретичні відомості**

#### **1. Техніка вирощування безвірусного матеріалу**

Способом *in vitro* розмножують рослини одержані з верхівкової меристеми, або здорові рослини, які відібрані з частково уражених сортів, без ризику їх повторного зараження.

Як експлант при цьому використовують суцвіття або денце цибулини, тобто такі тканини, які містять меристематичні зони.

При використанні суцвіття спостерігається високий вихід рослин-регенерантів в озимого часнику (ярий часник суцвітть не формує однак цей експлант пов'язаний із сезонністю і доступний обмежений період).

У часнику в основі квіток закладаються повітряні цибулини, які є органами його вегетативного розмноження. У культурі вони легко формують рослини при поміщенні на штучне поживне середовище відповідною рецептури, а також при створенні відповідних температурних умов, та освітлення.

#### **2. Клональне мікророзмноження суниці.**

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 ізольованої верхівкової меристеми суниці, яка складається з меристематичного купола і 1–

2 листкових 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. Для коренеутворення бруньки потрібно пересадити на поживне середовище, яке містить *ауксин*.

### Хід роботи

#### **I. Виділення апікальної меристеми часнику і його культивування.**

1. Для одержання регенерантів суцвіття стерилізують. З допомогою скальпеля відділяють від стрілки і звільняють від обгортки; частину бутонів зрізують.

2. Квітколоже поділяють на частини розміром приблизно 5 мм x 5 мм і висаджують їх на штучне поживне середовище. З одного суцвіття можна одержати більше 70 рослин.

3. Денце зубка як експлант зручне тим, що його можна вводити в культуру тканини в будь-який час року.

4. Денце цибулинок, які одержані в пробірці, також можна використовувати для розмноження в культурі *in vitro*.

5. Якщо цибулину, що досягла розміру 0,5–1,0 см, поділити на дві або чотири частини і порушити при цьому центральний конус наростання, то в пазухах лусок на середовищі, що сприяє пагоноутворенню, будуть формуватися регенеранти.

Таким чином можна розмножувати рослини, обминаючи висаджування їх у ґрунт. Особливо це важливо для матеріалу, який звільнений від вірусної інфекції, оскільки при цьому виключається можливість повторного його зараження. Одна така цибулина має здатність регенерувати 3–9 рослин.

6. У часнику в пазухах соковитої луски зубка і зачаткових листків немає готових закладених пагонів. Щоб у денці часнику активізувати латеральну меристему, слід будь-яким способом порушити апікальне домінування.

7. Перед введенням у культуру денця часнику зубок звільняють від соковитої луски, основу його зачищають і верхню частину листків, які залишилися, зрізують. Потім денце (навіть при незначному його розмірі) розрізують вздовж по вертикалі, щоб зруйнувати центральну меристему. З висадженого цілого денця часнику росте один центральний пагін, а регенеранти не формуються. Шляхом простого, прийому – **травмування центральної точки росту** - можна отримати до 16–20 пагонів з одного денця.

8. Для одержання регенерантів часнику в склад поживного середовища (крім мінеральних солей і сахарози) додають вітаміни і стимулятори росту (БАП – 1 мг/л і НОК – 2 мг/л). Одержані пагони-регенеранти пересаджують на свіже поживне середовище такого ж складу, але додають індолілмасляну кислоту в кількості 0,5 мг/л, а БАП і НОК виключають.

9. Пагони відділяють групами, захоплюючи тканину, на якій вони регенеровані, щоб не пошкодити конус наростання пагона; який знаходиться при самій її основі. Після підростання пагони розділяють і по одному пересаджують у нові пробірки на свіже поживне середовище.

10. Протягом 3–4 місяців відбувається вкорінення і підрощування рослин регенерантів

11. Після періоду підрощування слід оглянути рослини-регенеранти, здатність схематично їх замалювати і зробити відповідні висновки, порівнюючи регенеруючу різних сортів часнику між собою в умовах *in vitro*.

## **II. Виділення апікальної меристеми суниці і культивування її.**

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. Поза ламінаром на нестерильних бруньках слід також детально відпрацювати

операцію вичленення апікальної меристеми суниці. Всю подальшу роботу необхідно поводити тільки в ламінарі.

3. Зібрати бруньки в марлевий мішечок і занурити його для стерилізації бруньок в 0,1 % 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 два стакани, в кожний з яких налити на 1/4 об'єму стерильної води. Послідовно занурити в стакани мішечок з бруньками, прополіскуючи його у воді протягом декількох хвилин. Потім воду з другого стакана злити в перший, а в другий налити стерильної води з колби і знову прополіскувати в ній мішечок з бруньками. Процедуру повторити декілька разів.

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

6. Для вичленення меристем бруньку суниці помістити на стерильне предметне скло і розглянути під бінокулярним 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 (стерильною бритвочкою) меристематичний купол з 1–2 листковими примордіями. Для вправного видалення меристеми потрібні відповідні навички, тому дану технологію слід спочатку добре освоїти на нестерильних бруньках суниці.

9. Вичленену меристему перенести скальпелем у пробірку з поживним середовищем М-С, модифікованим для культивування апікальних меристем суниці. Горловину пробірки після її відкриття 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° С.

12. Через 4 тижні розглянути і замалювати 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.

### **Завдання до теми**

1. Одержати безвірусний матеріал, ознайомитись з технікою його вирощування.

2. Провести виділення апікальної меристеми часнику і його культивування.

3. Отримати апікальну меристему суниці і ознайомитись з методами культивування її.

### **Контрольні питання**

1. У чому полягають особливості статевого розмноження рослин?

2. Що таке несумісність рослин і які існують типи несумісності?

3. Що лежить в основі несумісності та які її причини?

4. Для чого використовується метод культури зародків?

5. Що є причиною загибелі зародків у разі віддаленої гібридизації?

6. Що замінює ендосперм під час культивування незрілих зародків *in vitro*?

7. Які компоненти живильного середовища, потрібні в процесі культивування зрілих та ранніх зародків?

8. Чому метод ембріокультури ефективний у селекції ранньостиглих плодкових культур?

9. Які практичні завдання можна вирішити за допомогою методу ембріокультури?

10. За яких умов використовується метод культивування насінневих зачатків?

11. Як проявляється несумісність за віддаленої гібридизації?

12. Які основні технологічні заходи одержання безвірусного садивного матеріалу?

13. Як отримують безвірусний садивний матеріал?

**Література:** [1, с. 76–78; 2, с. 23; 4, с. 56–58; 6, с. 162–164; 11; с. 92–101].

### **Лабораторна робота № 5**

**Тема. Культивування апікальних меристем картоплі.**

**Мета:** набуття навичок виділення меристеми картоплі; оволодіти технікою розмноження пробіркових рослин картоплі.

**Матеріали та обладнання:** бульби картоплі різних сортів; біноклярна лупа або мікроскоп біологічний порівняльний; стерилізовані скальпелі, препарувальні голки, бритвочки, затиснуті в держачки; пробірки із стерильним поживним середовищем для культивування апікальних меристем картоплі; спиртівка; сірники; 96 % спирт у фарфоровому стаканчику; пробіркові рослини різних сортів картоплі; пробірки з модифікованим стерильним поживним середовищем для живцювання пагонів картоплі; пінцети, чашки Петрі.

**Навчальні елементи:** клональне мікророзмноження, пазушні меристеми, апікальна меристема, термотерапія, хіміотерапія.

### **Короткі теоретичні відомості**

**1. Виділення меристеми картоплі і використання живильних середовищ для її культивування.**

Під *клональним мікророзмноженням* рослин розуміють безстатеве розмноження на штучних поживних середовищах в умовах *in vitro*. Цей метод має такі переваги над звичайними способами вегетативного розмноження рослин:

– 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° С), що дає можливість створювати банк цінних форм.

***Існує декілька способів клонального мікророзмноження рослин:***

а) пригнічення апікального домінування та активація пазушних меристем з допомогою ***цитокинінів***, доданих до поживного середовища;

б) живцювання пагонів (в основі цього методу також лежить активація пазушних меристем, але за рахунок видалення апекса-конуса наростання з одним-двома примордіальними листочками);

в) стимуляція утворення адвентивних пагонів і регенерація рослин з калюсу.

Клональне мікророзмноження досить широко застосовується для багатьох культур, і особливо картоплі. У картоплярстві значного поширення набув метод апікальних меристем.

***Апікальна меристема*** – це конус верхівкових клітин, які найбільш активно діляться; являє зону клітин висотою 0,1 мм (100 мікрометрів) і шириною 0,25 мм. Культура ізольованих апікальних меристем використовується як для одержання вільного від вірусів посадкового матеріалу картоплі, так і для мікроклонального розмноження. Метод заснований на тому, що у напрямі до верхівки вміст вірусів зменшується. Апікальна меристема переважно цілком вільна від вірусів.

Оскільки власне апікальну меристему буває важко вичленити без пошкодження, часто її відділяють з 1–2 листовими примордіями (апекси

висотою 100–250 мкм). Для підвищення ефективності оздоровлення картоплі застосовують поєднання методу верхівкової меристеми з *термотерапією* і *хіміотерапією*.

Метод *термотерапії* заснований на тепловій обробці бульб картоплі, яка викликає інактивацію вірусів, а *хіміотерапії* – на обробці спеціальними хімічними речовинами, які є інгібіторами розвитку вірусів.

Вирощені з апікальних меристем безвірусні рослини картоплі можуть бути розмножені і висаджені в теплиці для одержання безвірусних бульб (*міні-бульб*). Для прискореного розмноження оздоровленого матеріалу використовують-також бульби, які утворилися на безвірусних рослинах в умовах *in vitro* (*мікро бульби*).

## **2. Розмноження пробіркових рослин картоплі.**

Одержані з апікальних меристем на штучному поживному середовищі безвірусні рослини картоплі повинні бути розмножені. Одним із найпоширеніших способів розмноження картоплі є живцювання стерильних рослин у пробірковій культурі. 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 *Мурасиге-Скуга*.

Розмноження живцями засноване на пригніченні апікального домінування і активації пазушних меристем при видаленні верхівки пагона. З пазушної бруньки живця при помещенні 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 шляхом за допомогою живцювання від однієї рослини можна одержати 3–5 тис. рослин, а за 7 міс. 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 горщечки з фунтовою сумішшю, яка складається з торфокришки, дернової землі і піску у співвідношенні 3:1:1. Отвір у зволоженому в горщечку ґрунті роблять тупим кінцем пробірки незадовго до пересаджування. На 3 день рослини підживлюють **розчином Кнопа і мікроелементів за Мурасиге-Скугом**:

5 мл маточного розчину мікроелементів у концентрації 1х100 розводять в 1 л води. Через 7–10 днів після доброго приживлення рослин їх пересаджують на постійне місце в теплиці для одержання безвірусних бульб (**міні-бульб**), які в подальшому використовуються для посадки в полі.

### **Хід роботи**

#### **I. Культивування апікальних меристем картоплі**

1. Наперед підготувати (на першому лабораторному занятті) і простерилізувати в автоклаві при тиску 1 атм. протягом 20 хв. модифіковане поживне середовище М-С для культивування апікальних меристем картоплі.

2. У декількох сортів картоплі проростити в темноті бульби (у термостаті при температурі 20–22° С) на нестерильних паростках під мікроскопом (бінокулярною 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 бактерицидними лампами.

4. Протерти спиртом робоче місце – стіл, бінокулярну 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 етильовані паростки, опустити в хімічний стакан і залити 0,1 % розчином **діациду** на 3–5 хв. (або 1–6 % розчином **гіпохлориту** кальцію-чи натрію, або 0,1 % 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 росток на предметний столик бінокулярного мікроскопа (лупи) і з допомогою препарувальної голки під мікроскопом з верхівки паростка видалити відкривні листочки, послідовно оголюючи бічні і верхівкові меристеми з примордіальними листочками.

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

11. Вичленити можна як верхівкову, так і бокові меристеми. Кожну операцію проводити окремим простерилізованим інструментом.

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

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

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

15. Через 3–4 тижні послідовно провести спостереження за розвитком рослин з меристем пагонів і замалювати етапи цього процесу.

16. Порівняти, як іде розвиток рослин з меристем різних сортів картоплі; зробити відповідні висновки.

## **II. Розмноження пробіркових рослин картоплі**

1. Бульби картоплі зберігають при температурі 4–6° С, потім пророщують в темряві при температурі 20–22° С.

2. Проростки картоплі стерилізують в розчині «Білизни» (концентрація 1:3) протягом 15 хв. Потім проростки промивають тричі в стерильній

дистильовані воді по 10 хв. в кожній порції води.

3. Простерилізовані проростки поміщають у стерильну чашку Петрі і додають декілька крапель стерильної води для попередження їх підсихання.

4. Перед вичлененням з верхівки проростків видаляють покривні листочки, послідовно звільняючи бокові і верхівкові меристеми з примордіальними листками. Цю операцію проводять з допомогою препарованої голки під бінокулярним мікроскопом.

5. Після вичленення меристему на кінчику голки переносять на поверхню поживного середовища Мореля в пробірки.

6. Закривають пробірку пробкою над полум'ям горілки і ставлять в штатив. Штатив з пробірками переносять в світлову кімнату і культивують при температурі 25–28° С.

Склад поживного середовища для культивування апікальних меристем картоплі (мг/л):

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Вітаміни Уайта</i>	<i>1 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5 мл</i>
<i>Кінетин</i>	<i>0,25 мг</i>
<i>ІОК</i>	<i>1 мг</i>
<i>Аденін</i>	<i>0,25 мг</i>
<i>Аскорбінова кислота</i>	<i>3 мг</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20 мг</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7 г</i>

pH – 5,6–5,8

7. Одержані через 2 тижні пробірочні рослини картоплі виймають в ламінар-боксі і поміщають у чашку Петрі.

8. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізають стебло на частини, кожна з яких включає відрізок пагону з листком і пазушною брунькою. Частина пагону над брунькою при цьому становить 2–3 мм, а під нею – 5–7 мм.

9. Живці висаджують на модифіковане середовище Мурасіге-Скуга в

пробірки.

10. Культивують при температурі 25–26° С, освітленні 2–3 клк, 16-годинному фотоперіоді, відносній вологості повітря 70–75 %.

Склад поживного середовища для одержання пагонів (мг/л):

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Вітаміни МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5 мл</i>
<i>Кінетин</i>	<i>0,25 мг</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20 мг</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7г</i>

pH – 5,6–5,8

#### **Завдання до теми**

1. Провести культивування апікальних меристем картоплі.
2. Ознайомитись з методами розмноження пробіркових рослин картоплі.

#### **Контрольні питання**

1. Що таке клональне мікророзмноження?
2. Які переваги є в методі клонального мікророзмноження?
3. Що таке пазушні меристеми?
4. Що таке апікальна меристема?
5. Що таке термотерапія?
6. Що таке хіміотерапія?

**Література:** [3, с. 303–304; 4, с. 53–55; 5, с. 178–180; 6, с. 116–117; 7; с. 143–145; 9, с. 76–78, 11, с. 255–257].

### **Лабораторна робота № 6**

#### **Тема. Мікроклональне розмноження рослин**

**Мета:** оволодіти технікою мікроклонального розмноження цукрових буряків; набуття навичок отримання мікробульб картоплі, та укорінення полуниці.

**Матеріали та обладнання:** асептичні рослини картоплі, стерильне середовище у пробірках, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спиртівка

пробірки з конгломератом бруньок полуниці, картоплі із стерильним поживним середовищем, пінцети, скальпелі, стерильні чашки Петрі, колби мірні (0,05–5 л), стакани хімічні (0,05–1 л), циліндри мірні (0,1–2 л), піпетки Мора (1–10 мл), піпетки градуйовані (1–10 мл), мікропіпетки градуйовані (0,1–0,5 мл), лійки, скляні палички різних розмірів, фільтри Зейтца (металеві) з прокладками із мембранних фільтрів «Синпор» чи мембранні фільтри фільтрувальний папір, вата, марля, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби та пробірки, колби Ерленмєєра (50–250 мл), високі і низькі різного розміру, пробірки біологічні, ножиці.

**Навчальні елементи:** мікроклональне розмноження, коренеутворення, мікробульби.

### **Короткі теоретичні відомості**

#### **1. Отримання мікробульб картоплі, та укорінення полуниці**

При культивуванні апікальних меристем полуниці, картоплі на поживному середовищі, яке містить цитокинін (6-БАП), результаті активації пазушних меристем із однієї верхівкової меристеми утворюється багато стеблових бруньок, точки росту витягуються, розкриваються нові листки. Але укорінення утворених бруньок на цьому середовищі не відбувається.

Для укорінення одержаних при мікроклональному розмноженні суниці бруньок, картоплі їх необхідно пересадити на нове поживне середовище, яке містить ауксини.

#### **2. Ознайомлення з мікроклональним розмноженням цукрових буряків**

Для введення в стерильну культуру відбираються пазушні бруньки коренеплодів та висадків, які не пошкоджені хворобами та шкідниками. Найкраще брати матеріал з 9 до 10 години ранку. Вичлененні бруньки чи зрізані квітконосні пагони розміщують у змочений водою фільтрувальний папір і загортають в целофан або пергамент, які запобігають його висиханню.

Через 2–4 години необхідно приступити до їх стерилізації і посадки на поживне середовище для розмноження. Триваліше збереження матеріалу без

стерилізації (навіть в холодильнику) веде до збільшення інфікованості, що знижує його приживлюваність в культурі.

Використання бутонів, черешків та листових пластинок цукрових буряків є додатковим ефективним резервом отримання бруньок при мікроклональному розмноженні. Краще використовувати молоді бутони, оскільки у них регенерація вегетативних пагонів на 70 % вища.

В залежності від поставленої задачі в якості вихідного матеріалу можуть використовуватись: апікальні та латеральні меристеми, бутони, насіння, черешки і листові пластинки, зародки, насінневі зачатки, пиляки.

Як показали дослідження, найлегше укорінюються пагони, довжина яких перевищує 7 мм. На середовищі для розмноження отримують укорочені пагони. Для їх подовження в останньому пасажі перед укоріненням в поживне середовище додають гіберелову кислоту або знижують концентрацію БАП. Останній спосіб більш ефективний, бо отримані таким чином пагони краще укорінюються.

Через два тижні після висадки формується добра коренева система і рослини готові для перенесення в перліт, а потім – в поле.

### **Хід роботи**

#### **I. Укорінення та одержання мікробульб картоплі**

1. Пробірку з рослиною протирають спиртом і обпалюють горло у полум'ї спиртівки.

2. Стерильним пінцетом виймають рослину із пробірки, в які вона росла, і поміщають її у стерильну чашку Петрі.

3. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізають стебло на сегменти довжиною приблизно 10 мм: частина над брунькою становить 2–3 мм, а під нею – 5–7 мм. Обрізають листки.

4. Пінцетом переносять кожний сегмент у пробірку з поживним середовищем.

5. Культивують при температурі 25–26° С, освітленні 2–3 клк, 16-годинному фотоперіоді, відносній вологості повітря 70–75 %.



### Середовище для укорінення картоплі (мг/л)

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Тіамін</i>	<i>1 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5мл</i>
<i>Піридоксин</i>	<i>0,5 мл</i>
<i>ІМК</i>	<i>0,1 мг</i>
<i>Сахароза</i>	<i>5 г</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7 г</i>
рН – 5,6–5,8	

### Середовище для одержання мікробульб картоплі (мг/л)

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Тіамін</i>	<i>1 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5мл</i>
<i>Піридоксин</i>	<i>0,5 мл</i>
<i>ІМК</i>	<i>0,1 мг</i>
<i>Сахароза</i>	<i>5 г</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7 г</i>
рН – 6–5,8	

## **II. Індукція коренеутворення полуниці**

1. Для роботи використовують культуру апікальних меристем суниці, одержані через 3–4 тижні після початку культивування.

2. В ламінар-боксі виймають пробку із пробірки, обпалюють над спиртівкою горло пробірки і стерильним пінцетом виймають із пробірки конгломерат бруньок суниці.

3. Переносять їх у стерильну чашку Петрі.

4. Конгломерат за допомогою скальпеля розділяють на окремі бруньки і кожну із них переносять в пробірки з поживним середовищем для укорінення.

5. Пробірки з рослинним матеріалом поміщають, в світлову термальну з освітленням 10 клк, температурою 26° С і вологістю 60 %.

6. Через тиждень відмічають початок коренеутворення.

Склад поживного середовище для утворення кореневої системи при мікроклональному розмноженні суниці (мг/л)

<i>Макро МС</i>	<i>100 мл</i>
<i>Мікро МС</i>	<i>1 мл</i>
<i>Вітаміни Уайта</i>	<i>1 мл</i>
<i>Fe-хелат</i>	<i>5мл</i>
<i>Аскорбінова кислота</i>	<i>1 мг</i>
<i>ІОК</i>	<i>0,5 мг</i>
<i>Сахароза</i>	<i>20 г</i>
<i>Агар-агар</i>	<i>7 г</i>

рН – 5,6–5,8

### **III. Мікроклональне розмноження цукрових буряків**

1. Бутони стерилізують 0,04 % розчином сулеми на протязі 40–60 хвилин, потім промивають чотири рази стерильною водою, відсікають кінець зрізу і висаджують. Культивують у тих же умовах, що й бруньки та меристеми.

2. Через 2–3 тижні на базальній частині бутона з'являються 1–2 пагони, їх відділяють і переносять на нове поживне середовище для розмноження, а потім – для укорінення.

3. Отримані рослини з добре розвиненою кореневою системою і розеткою листя виймають із пробірки і висаджують в ящики чи стелажі з поживним субстратом в приміщеннях з контрольованими параметрами мікроклімату для акліматизації і отримання розсади.

4. Як субстрат можна використовувати суміш перліту і піску, до якої перед посадкою рослин вносять необхідні елементи живлення. Суміш готується таким чином: на об'єм з 3 відер перліту і 1 відра піску вносять у діючій речовині – 1–2 г азоту, 2 г фосфору і 2 г калію, що в фізичних туках складатиме відповідно 4,34 г 46 % карбаміду, 10 г 20 % суперфосфату та 5 г 40 % калійної солі. Добрива вносять в твердому стані і старанно перемішують із субстратом.

Для дорощування цукрових буряків також можна використовувати легку, з доброю повітряною проникністю і водоутримуючою здатністю суміш, що

складається з 1 частин ґрунту, 1 частини торфу і 1 частини перегною.

Для підвищення приживання рослин на таку суміш зверху насипають шар перліту товщиною 1,5–2 см. Висота поживного субстрату повинна бути не менш 7–8 см, площа живлення рослин 5x5 см. До верхнього краю ємкості від поверхні субстрату повинен бути вільний простір в 7 см. Субстрат поливають із розрахунку 50 % НВ.

5. Перед посадкою відбраковують непридатні до садіння рослини (без кореня, інфіковані, з пошкодженою точкою росту). Для кращого приживання залишають 4–5 центральних листків, інші обрізають.

6. Посадку рослин проводять вручну. В субстраті роблять невелике заглиблення, розміщують в ньому вертикально коріння і старанно ущільнюють субстрат навколо рослини, поливають водою і накривають плівкою чи склом.

7. Через 7–10 днів, коли рослини приживуться і почнуть рости, необхідно провести їх закалювання. Спочатку знімають плівку (або скло) на 10–15 хвилин, потім час закалювання доводять до 1–2 годин. Через 3–4 дні плівку можна зняти зовсім. Температура в приміщенні повинна бути 20–25° С, вологість 70–80 %, освітлення 16 клк, тривалість світлового періоду 10 годин. Для освітлення можна використовувати лампи ДРІ, ДРЛФ.

8. Через 30–50 днів розсада цукрових буряків придатна для пересадки в поле. В цей час рослини повинні мати висоту 10–15 см і 6–10 справжніх листочків. Приживлюваність розсади в ґрунті досягає близько 100 %. Рослини-регенеранти на початковому періоді росту можуть мати незначні морфологічні зміни листового апарату, але до кінця вегетації вони набувають вигляду, що є характерним для рослин-донорів.

#### **Завдання до теми**

1. Провести укорінення та одержання мікробульб картоплі.
2. Ознайомитись із коренеутворенням полуниці.
3. Описати способи мікроклонального розмноження цукрових буряків.

#### **Контрольні питання**

1. Що таке мікроклональне розмноження?

2. Опишіть основні способи мікроклонального розмноження.
  3. Які переваги мікроклонального розмноження порівняно з традиційним?
  4. Які основні особливості морфогенезу експланта за мікроклонального розмноження?
  5. Які фактори впливають на процес мікророзмноження?
  6. На які типи поділяють отримані рослини-регенеранти?
  7. Які переваги і недоліки термотерапії під час культивування меристем?
  8. Які основні технологічні заходи одержання безвірусного садивного матеріалу?
  9. Які основи маркетингу ринку рослин, одержаних методами мікроклонального розмноження?
  10. Як отримують безвірусний садивний матеріал?
  11. Яке практичне значення мікроклонального розмноження?
- Література:** [1, с. 143–145; 2, с. 17; 6, с. 188–190; 12, с. 132–137].

## **Лабораторна робота № 7**

**Тема.** Використання генетичної інженерії на рівні хромосом

**Мета:** оволодіти технікою простих і диференційованих методів отримання поліплоїдів.

**Матеріали та обладнання:** пробірки, колби, хімічні стакани, розчин колхіцину.

**Навчальні елементи:** поліпоїд, колхіцин, тетраплоїдні форми.

### **Короткі теоретичні відомості**

#### **1. Використання генетичної інженерії на рівні хромосом**

Рослину з кратним збільшенням кількості хромосом порівняно з вихідною (гаплоїдом) називають *поліплоїдом*.

Для штучного індукування поліплоїдів використовуються різноманітні фактори: дія температури, іонізуючі випромінювання, пошкодження тканин, застосування хімічних речовин – аценафтену, ауранції, фенілуретану, гамексану та ін.

Нині найширше використовують алкалоїд колхіцин, оскільки він забезпечує утворення великої кількості поліплоїдних форм у всіх сільськогосподарських рослин. Колхіцин виділений з рослин *Colchicum autumnale* (пізньоцвіт осінній), які ростуть у Білорусі, Криму, на Кавказі.

### Хід роботи

#### I. Методи та порядок отримання поліплоїдів

1. Розчином колхіцину діють або на сухе, що наклюнулося, або проросле насіння, чи на точки росту верхньої меристеми у рослин більш пізнього віку. Найчастіше використовують колхіцин (концентрація від 0,01 до 0,2 %).

При використанні водних розчинів спочатку готують маточний 1–2 % розчин. Експозиція обробки від 3 год до 3 діб (чим більша концентрація, тим менша експозиція). Після насіння підставляють під струмінь водопровідної води для відмивання від розчину. Обробка сухого насіння застосовують для жита, вівса, томатів, капусти, цукрових буряків.

2. При роботі з паростками проводять – *повне занурення проростків* у водний розчин колхіцину або поміщення їх на фільтрувальний папір, змочений розчином колхіцину. Використовують 0,01–0,2 % розчини при експозиції 3–12 год і більше. При роботі з житом добрі результати дає витримування в 0,2 % розчині колхіцину протягом 16–24 год. Посудину ставлять під струмінь водопровідної води на 2–3 год для відмивання, потім ставлять на добу в розчин Кнопа, після чого проростки з потовщеним гіпокотилем, що є ознакою поліплоїдних форм, висаджують в ящики.

Ефективним прийомом обробки точок росту молодих сіянців є *крапельний метод*, його застосовують для обробки сходів цукрових буряків у фазі «вилочки». Через кожні 2–3 год у денний час піпеткою наносять на проростки краплю 0,2 % розчину колхіцину. Обробка триває протягом 12–20 діб. Приблизно через місяць після закінчення обробки рослини з ознаками тетраплоїдів висаджують у полі. Через кожні 2–3 год у денний час піпеткою наносять на проростки краплю 0,2 % розчину колхіцину. Обробка триває протягом 12–20 діб. Приблизно через місяць після закінчення обробки рослини

з ознаками тетраплоїдів висаджують у полі.

3. Розчин колхіцину добре всмоктується коренями, тому цей метод ефективний для злаків. Насіння висівають за звичайних умов і рослинам дають можливість розкущитися, потім кущ ділять на окремі пагони, які розсаджують, і коли вони приживуться, в них відмивають корені, занурюючи їх поперемінно на 12 год то в слабкий розчин колхіцину, то в проточну воду.

5. Використовують розчин колхіцину 1–2 %. Водні розчини колхіцину застосовують з використанням різних прийомів обробки: повним зануренням пагонів, обприскуванням або нанесенням крапель з використанням тампонів, методом ін'єкції.

Для обробки *зануренням* на пагоні роблять невеликий розріз на віддалі 1–2 см нижче верхівкової точки росту і верхівку пагона занурюють у посудину з розчином колхіцину. На віддалі 4–5 см від обробленої частини всі бруньки видаляють.

**II. Обробка краплями** розчину застосовується на верхівкових точках росту молодих пагонів і на пазушних бруньках, які спонукають до розвитку зрізуванням верхівки пагонів. Краплі наносять багаторазово протягом кількох днів (іноді з перервою 1–3 доби).

6. Позитивні результати дає обробка органів дорослих рослин *методом ін'єкції*. Цей метод ефективний для індукування поліплоїдії у висадках капусти, дерев'янистих і плодових рослин. Для попереднього виділення поліплоїдів необхідно розділити молоді колхіциновані рослини на дві групи.

*Одна група* – незмінні або малозмінні рослини, подібні до контрольних, а *друга* – змінні рослини з ознаками, характерними для химер поліплоїдного типу. У змінених рослин спостерігаються округлі потовщення листя з інтенсивнішим забарвленням, тверді на дотик химерні форми. Росли другої групи, серед яких можуть бути як тетраплоїдні форми, так і химери тетраплоїдного типу, потрібно зберегти для подальшої роботи.

### Завдання до теми

1. Описати методи отримання поліплоїдів.

2. Представити схематично порядок отримання поліплоїдів.

### **Контрольні питання**

1. Які проблеми практичного сільськогосподарського виробництва вирішуються за допомогою методів генної інженерії?

2. Яка роль ендонуклеаз рестрикції?

3. Що зумовлює комплементарність основ фрагментів ДНК?

4. Яка особливість будови гена?

5. Що таке сателітні послідовності ДНК та яке їх значення?

6. У чому полягають подібність та відмінність між ядерними та позаядерними генами?

7. Які функції мобільних генетичних елементів у рослині та яке їх значення для ДНК-технологій?

8. Які особливості експресії генів рослин?

9. Що таке екзони? Інтрони?

10. Що лежить в основі процесу дозрівання інформаційної РНК?

11. Які функції промотору?

12. Яка роль термінаторів?

13. Які функції ферменту зворотної транскриптази?

14. Чи є в генах-копіях інтрони та регуляторні елементи?

15. Які основні вектори перенесення генетичної інформації рослин?

16. Що таке транспозони і як вони переміщуються по геному?

17. Що впливає на пряме перенесення генів?

18. Які закономірності успадковування трансгенів?

19. Які напрями генно-інженерних досліджень найважливіші для рослинництва?

20. Як методами ДНК-технологій може бути поліпшена якість рослинної продукції?

21. Як отримують трансгенні форми рослин, стійкі проти біотичних та абіотичних стресових чинників?

**Література:** [5, с. 316–318; 7, с. 202–203; 9, с. 174–178; 12, с. 202–205].

## **КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ**

Контроль знань і умінь студентів (поточний і підсумковий) з дисципліни здійснюють згідно з кредитно-модульною системою організації навчального процесу. Рейтинг студента із засвоєння дисципліни визначається за 100 бальною шкалою. Він складається з рейтингу з навчальної роботи, для оцінювання якої призначається 70 балів, і рейтингу з атестації (заліку) – 30 балів.

На лабораторних заняттях кожен студент з кожної теми виконує індивідуальні завдання. Рівень знань оцінюється:

### **«Відмінно»**

Студент дає вичерпні, обґрунтовані, теоретично і практично вірні відповіді не менш ніж на 90 % запитань, рішення задач та лабораторні справи вірні, демонструє знання підручників, посібників, інструкцій, проводить узагальнення і висновки, акуратно оформляє завдання, був присутній на лекціях, має конспект лекцій чи реферати з основних тем курсу.

### **«Добре»**

Студент володіє знаннями матеріалу, але допускає незначні помилки у формуванні термінів, категорій і розрахунків, проте за допомогою викладача швидко орієнтується і знаходить правильні відповіді, був присутній на лекціях, має конспект лекцій чи реферати з основних тем курсу.

### **«Задовільно»**

Студент дає правильну відповідь не менше ніж на 60 % питань, або на всі запитання дає недостатньо обґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки, які виправляє за допомогою викладача. При цьому враховується наявність конспекту за темою завдань та самостійність;

### **«Незадовільно з можливістю повторного складання»**

Студент дає правильну відповідь не менше ніж на 35% питань, або на всі запитання дає необґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки. Має неповний конспект лекцій.



### **Підсумкова (загальна оцінка) курсу навчальної дисципліни.**

Є сумою рейтингових оцінок (балів), одержаних за окремі оцінювані форми навчальної діяльності: поточне та підсумкове тестування рівня засвоєності теоретичного матеріалу під час аудиторних занять та самостійної роботи (модульний контроль); оцінка (бали) за виконання лабораторних досліджень.

Підсумкова оцінка виставляється після повного вивчення навчальної дисципліни, яка виводиться як сума проміжних оцінок за змістовні модулі.

Остаточна оцінка рівня знань складається з рейтингу з навчальної роботи, для оцінювання якої призначається 70 балів, і рейтингу з атестації (заліку) – 30 балів.

<b>Сума балів за всі види навчальної діяльності</b>	<b>Оцінка ECTS</b>	<b>Оцінка за національною шкалою для заліку</b>
90–100	A	відмінно
82–89	B	добре
74–81	C	
64–73	D	задовільно
60–63	E	
35–59	FX	незадовільно з можливістю повторного складання
0–34	F	незадовільно з обов'язковим повторним вивченням дисципліни

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

### Основна

1. Глеба Ю. Ю. Клеточная инженерия растений. / Ю. Ю. Глеба, К. М. Сытник. – Киев : Наукова думка, 1984. – 159 с.
2. Завірюха П. Д. Сільськогосподарська біотехнологія: клітинна та генетична інженерія рослин. Короткий термінологічний словник / П. Д. Завірюха – Львів, 2008. – 32 с.
3. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев : Наукова думка, 1980 – 488 с.
4. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. Москва : Наука, 1983. – 97 с.
5. Муромцев Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко и др – Москва : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
6. Мельничук М. Д. Основы біотехнології рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, Б. О. Левенко. – Підручник. – Київ, 2000. – 248 с.
7. Рудишин С. Д. Основы біотехнології рослин / С. Д. Рудишин – Вінниця, 1998. – 224 с.

### Додаткова

8. Ананасов А. Биотехнология в растениеводстве: Пер. с англ. / А. Ананасов – Новосибирск, 1993. – 241 с.
9. Биотехнология: введение в науку будущего / Автор-укладач В. В. Россихин. – Харків : Колорит, 2005. – 288 с.
10. Блюм Я. Современные биотехнологии – вызов времени / Я. Блюм, Н. Борлоуг, Л. Суржик, Ю. Сиволап. – Киев : РА NOVA, 2002. – 102 с.
11. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин: генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – Київ, 2005. – 724 с.
12. Кушнір Г. П. Мікроклональне розмноження рослин / Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацька – Київ : Наукова думка, 2005. – 281 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни  
«Біотехнологія культур рослин і тварин» для студентів денної форми навчання  
за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладачі: д. б. н., проф. В. В. Никифоров,  
старш. викл. О. О. Никифорова

Відповідальний за випуск заст. зав. кафедри к.х.н., доц. Т. Ф. Козловська

Підп. до др. \_\_\_\_\_ 2017 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.  
Ум. друк. арк. \_\_\_\_\_. Наклад \_\_\_\_\_ прим. Зам. № \_\_\_\_\_. Безкоштовно.

Видавничий відділ  
Кременчуцького національного університету  
імені Михайла Остроградського  
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600