

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,  
стандартизації та біотехнології  
Кафедра біотехнології та біоінженерії

## **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН**

Методичні рекомендації

до виконання лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського)  
рівня вищої освіти ОП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162  
Біотехнології та біоінженерія денної форми здобуття вищої освіти

**Миколаїв**

**2025**

УДК 606:633/635

О-75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 26 листопада 2025 р., протокол № 3.

Укладачі:

Гиль М. І. – доктор с.-г. наук, професор, академік НАНВО України.

Посухін В. О – асистент кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

Крамаренко О.С. – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету;

Власенко К.М. – доктор філософії зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, доцент кафедри біотехнології та безпеки життєдіяльності Українського державного університету науки і технологій.

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Лабораторна робота № 1 «Організація і техніка культивування клітин та тканин в умовах <i>in vitro</i> »                                        | 4  |
| Лабораторна робота № 2 «Методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізолюваних клітин і тканин рослин»                            | 7  |
| Лабораторна робота № 3 «Приготування живильних середовищ для культивування ізолюваних клітин та тканин рослин»                                 | 11 |
| Лабораторна робота № 4 «Вирощування стерильних паростків сільськогосподарських культур»                                                        | 16 |
| Лабораторна робота № 5 «Отримання і культивування калусної тканини рослин»                                                                     | 17 |
| Лабораторна робота № 6 «Субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з різним складом гормонів»                              | 19 |
| Лабораторна робота № 7 «Зняття ростових характеристик калусної культури. Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини»             | 21 |
| Лабораторна робота № 8 «Клональне мікророзмноження рослин. Ізолювання експланту, введення й ініціація його розвитку в умовах <i>in vitro</i> » | 25 |
| Лабораторна робота № 9 «Культура ізолюваних зародків рослин <i>in vitro</i> »                                                                  | 28 |
| Лабораторна робота № 10 «Клональне мікророзмноження рослин»                                                                                    | 30 |
| Лабораторна робота № 11 «Аналіз генетично модифікованого матеріалу методами експрес-діагностики»                                               | 32 |
| Лабораторна робота № 12 «Принципи та застосування ПЛР»                                                                                         | 34 |
| СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ                                                                                                               | 38 |

## **Лабораторна робота № 1 «Організація і техніка культивування клітин та тканин в умовах *in vitro*»**

План:

1. Правила техніки безпеки в біотехнологічній лабораторії.
2. Приміщення та обладнання.
3. Посуд, інструменти, матеріали. Умови стерильності.

### **1. Правила техніки безпеки в біотехнологічній лабораторії.**

Під час роботи у біотехнологічній лабораторії слід суворо дотримуватись вимог, викладених в інструкції з техніки безпеки. У разі, якщо здобувач вищої освіти не ознайомлений із зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача. Здобувач вищої освіти несе персональну відповідальність за власну безпеку під час перебування у лабораторії, що підтверджує підписом у журналі з техніки безпеки під час проведення інструктажу.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі здобувачі вищої освіти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку.

Кожен студент працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок. Особисті речі повинні зберігатися в спеціально відведеному місці.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими.

#### **У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.**

Під час виконання лабораторної роботи здобувачам вищої освіти заборонено пересуватися по лабораторії без зайвої потреби. Всі рухи повинні бути спокійними та виваженими. До роботи не допускаються здобувачі вищої освіти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри, не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

**Працюючи з відкритим полум'ям** (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника. Забороняється запалювати запальничкою та іншою запаленою спиртівкою (газовим пальником); гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а

газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. Запалену спиртівку заборонено пересувати з місця на місце. По закінченню роботи з газовими пальниками необхідно перевірити, що вихід газу перекрито. У разі випадкового займання ватно-марлевого корка необхідно терміново загасити його, закривши доступ повітря.

**Роботу у ламінарному боксі** дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри). Категорично забороняється заходити у бокс за увімкненої бактерицидної лампи. Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

У лабораторії необхідно дотримуватися правил безпеки під час роботи з **хімічними речовинами**. За необхідності (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У процесі розведення концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. У разі потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти. Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися вимог **електробезпеки**. Забороняється використовувати несправне електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками. Після закінчення роботи здобувач вищої освіти повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікуючим розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

## 2. Приміщення та обладнання.

Біотехнологічна лабораторія є спеціалізованим блоком приміщень, обладнаних відповідно до робіт, які в них проводяться на кожному з етапів введення та культивування рослинних експлантів (табл. 1).

Таблиця 1

### Будова та обладнання біотехнологічної лабораторії

| Приміщення                      | Обладнання                                          |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Кімната для миття посуду</i> | мийниці з гарячою та холодною водою;<br>дистилятор; |

|                                                     |                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                     | бідистилятор;<br>шафи для зберігання посуду;<br>витяжна шафа для роботи з кислотами.                                                                         |
| <b>Приміщення для стерилізації (автоклавна)</b>     | автоклав;<br>сушильна шафа;<br>шафи для зберігання стерильних матеріалів.                                                                                    |
| <b>Кімната для приготування живильних середовищ</b> | лабораторні столи;<br>шафи для зберігання реактивів і посуду;<br>ваги;<br>іонометр;<br>магнітні мішалки;<br>електроплитки;<br>холодильник.                   |
| <b>Операційна кімната (бокс)</b>                    | ламінар-бокс;<br>бактерицидні лампи;<br>шафи для зберігання стерильних матеріалів.                                                                           |
| <b>Культуральна кімната</b>                         | стелажі зі скляними полками і лампами;<br>кондиціонер;<br>зволожувач повітря;<br>качалки для вирощування суспензій;<br>реле часу;<br>термометр та гігрометр. |
| <b>Кліматичні камери</b>                            | стелажі з лампами;<br>система клімат-контролю.                                                                                                               |
| <b>Лабораторне приміщення</b>                       | обладнання для біологічних досліджень.                                                                                                                       |

### 3. Посуд, інструменти, матеріали. Умови стерильності.

Всі роботи в операційній кімнаті проводяться в спеціальному одязі (халат, косинка або чепець, ватно-марлева пов'язка, бахили). Одяг повинен бути стерильним, тому його попередньо автоклавують.

Перед роботою руки ретельно миють з милом у теплій воді. У боксі під час роботи руки періодично стерилізують 70%-ним етанолом. У процесі роботи зі стерильними культурами неприпустимо відкривати двері операційної кімнати.

#### Контрольні питання:

1. Назвіть основні правила техніки безпеки при роботі в біотехнологічній лабораторії.

2. Охарактеризуйте обладнання біотехнологічної лабораторії.
3. Яким чином проводяться роботи в операційній кімнаті?

## **Лабораторна робота № 2 «Методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізолюваних клітин і тканин рослин»**

### План:

1. Правила стерилізації посуду, інструментів, матеріалів.
2. Речовини для стерилізації рослинного матеріалу.
3. Умови стерильності операційної кімнати (боксу).

### **1. Правила стерилізації посуду, інструментів, матеріалів.**

Однією з головних умов успішного проведення біотехнологічних робіт є дотримання умов стерильності на всіх етапах роботи в біотехнологічній лабораторії: за підготовки обладнання та інструментів, підготовки рослинного матеріалу, операційної кімнати і ламінар-боксів та у процесі приготування живильних середовищ.

**Стерилізація посуду.** Перед стерилізацією мірний та хімічний посуд необхідно ретельно вимити.

*Миття посуду* проводиться поетапно:

- 1) замочити посуд у теплій воді, видалити агар;
- 2) промити посуд у теплій воді;
- 3) обробити хромовою сумішшю. Для приготування хромової суміші 9,2 г розтертого на порошок кристалічного біхромату калію  $K_2Cr_2O_7$  поміщають в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти, обережно помішуючи скляною паличкою. Виконуючи дану процедуру, необхідно суворо дотримуватися правил техніки безпеки при роботі з концентрованими кислотами! У процесі миття посуд беруть металевими щипцями й обережно обполіскують у хромовій суміші.
- 4) промити посуд послідовно у водопровідній і дистильованій воді;
- 5) висушити посуд.

*Стерилізація посуду і матеріалів.* Культуральні посудини (колби, пробірки, чашки Петрі та ін.) перед заповненням їх живильними середовищами стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Тривалість стерилізації становить 2 години за температури 150–170 °С. Після цього посуд і матеріали стерилізують вологим жаром під тиском 2 атм. протягом 25-30 хвилин. Стерилізацію під тиском проводять у горизонтальних автоклавах типу ГК-100.

**Стерилізація інструментів.** Попередню стерилізацію інструментів проводять нагріванням сухим жаром. Не допускається стерилізувати металеві

інструменти в автоклаві, тому що під дією пари вони швидко іржавіють і тупляться. Безпосередньо перед роботою та у процесі введення тканин на живильні середовища (перед кожною операцією) їх стерилізують етиловим спиртом з наступним обпалюванням у полум'ї спиртівки.

## 2. Речовини для стерилізації рослинного матеріалу.

**Стерилізація рослинного матеріалу.** Стерилізацію рослинного матеріалу необхідно проводити у зв'язку з наявністю на його поверхні епіфітної мікрофлори. Рослинні об'єкти перед стерилізацією миють у мильному розчині, потім ретельно відмивають проточною водою, очищають від зайвих тканин: із коренеплодів і коренів знімають шкірку, із пагонів – кору, із бруньок – покривні луски.

Рослинні експланти стерилізують етиловим спиртом, розчинами речовин, що містять активний хлор (хлораміном, гіпохлоритом кальцію і натрію), сулемою, бромною водою, перекисом водню, нітратом срібла, діацидом, антибіотиками.

*Етиловий спирт* часто застосовують для попередньої стерилізації, протираючи ним поверхню матеріалу або занурюючи матеріал на кілька секунд в абсолютний спирт. Іноді такої стерилізації досить, її використовують при роботі із плодами, насіннями, пагонами, зав'язями.

*Гіпохлорит кальцію (хлорне ванно)* використовуються у вигляді 5–7 % розчину для обробки бруньок, зав'язей, квіток, насіння, пагонів протягом 5–8 хвилин.

*Гіпохлорит натрію* використовуються у вигляді 0,5–5,0 % розчину для обробки будь-яких експлантів протягом 1–20 хвилин. Ця речовина є клітинною отрутою, тому час стерилізації і концентрацію підбирають експериментально. Наприклад: для ізольованих зародків використовують 2–3 % розчин протягом 10–15 хвилин, а для сухого насіння - 3–5 % розчин протягом 1 години. Залишки гіпохлорита натрію спочатку видаляють 0,01 н HCl, а потім 8 разів промивають автоклавованою дистильованою водою.

*Хлорамін* застосовують у концентрації 1–6 %. Пиляки й молоді зародки обробляють протягом 1–3 хвилин, сухе насіння - 30–60 хвилин, потім промивають стерильною дистильованою водою 2–3 рази.

*Сулема* – токсична речовина й вимагає особливої старанності як за зберігання, так і за підбору концентрації для окремих об'єктів. Для стерилізації зародків використовують 0,1 % розчин протягом 1–3 хвилин, для корене- і бульбоплодів - до 10–20 хвилин.

*Розчини, що містять активний хлор, використовуються один раз і готують їх безпосередньо перед роботою.*

*Діацид* використовується в 0,2 % розчині для стерилізації коренеплодів, насіння, апікальних меристем, ізольованих зародків, пиляків. Діацид готують, розчиняючи окремо 330 мг етанолмеркурхлориду й 660 мг цетилпіридинію хлориду в гарячій воді (330 мл), потім їх змішують і доводять об'єм рідини до 1 л, додають декілька крапель детергенту твін-80; зберігають у щільно закритій колбі в темряві.

*Антибіотики* застосовують для стерилізації рослинного матеріалу, інфікованого бактеріями (тканини корончатогаллових пухлин). Найчастіше застосовують стрептоміцин і тетраміцин у концентрації 10-80 мг/л, ампіцилін 200–400 мг/л, левоміцитин, каноміцин та інші.

Оскільки речовини, що використовуються для стерилізації, негативно впливають не тільки на мікроорганізми, а й на рослинні клітини, вид речовини, її концентрацію, експозицію обробки підбирають експериментально залежно від виду рослини, її фізіологічного стану та місця вирощування, типу експланта та інших факторів (табл. 2).

Таблиця 2

**Стерилізація вихідного рослинного матеріалу  
(за Р.Г. Бутенко)**

| Тип експланта       | Час стерилізації, хв |              |                       |
|---------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
|                     | діацид               | сулема 0,1 % | перекис водню 10-12 % |
| Насіння сухе        | 15-20                | 10-15        | 12-15                 |
| Насіння набубнявіле | 6-10                 | 6-8          | 6-8                   |
| Тканини стебла      | 20-40                | 20-25        | -                     |
| Листки              | 1-3                  | 0,5-3        | 3-5                   |
| Апекси              | 1-10                 | 0,5-7        | 2-7                   |

**3. Умови стерильності операційної кімнати (боксу).**

Операційну кімнату слід утримувати в ідеальному порядку, тому в ній регулярно проводять вологе прибирання зі стерилізуючими речовинами.

Перед роботою операційна кімната або ламінар-бокс опромінюється ультрафіолетом упродовж 2-х годин. Під час стерилізації не можна перебувати в цьому приміщенні, а приступати до роботи можна не раніше ніж через 30-45 хв після закінчення стерилізації. Не можна допускати потрапляння ультрафіолетового світла в очі; слід одягати спеціальні захисні окуляри.

**Контрольні питання:**

1. Які правила миття та стерилізації посуду?
2. Як стерилізують матеріали для роботи з культурою тканин рослин?

3. Які інструменти використовуються для операцій з рослинними експлантами? Правила їх стерилізації.
4. Яка методика стерилізації операційної кімнати біотехнологічної лабораторії?
5. Які речовини застосовують для стерилізації рослинного матеріалу?
6. Від яких чинників залежить концентрація речовин та експозиція стерилізації рослинного матеріалу?

### Лабораторна робота № 3 «Приготування живильних середовищ для культивування ізолюваних клітин та тканин рослин»

План:

1. Основні компоненти живильних середовищ для культивування рослинних експлантів.
2. Гормони рослин. Роль гормонів в регулюванні морфогенезу в культурі *in vitro*.
3. Основні прописи живильних середовищ. Послідовність приготування живильного середовища.

#### 1. Основні компоненти живильних середовищ для культивування рослинних експлантів.

Хімічний склад живильних середовищ для культивування рослинних тканин визначається їх біохімічними і фізіологічними потребами. Усі компоненти живильних середовищ можна поділити на 8 груп (рис. 1).



Рис. 1. Компонентний склад живильних середовищ для культивування тканин рослин

*Азот, фосфор, сірка* входять до складу органічних сполук: білків, жирів, нуклеїнових кислот.

*Залізо, цинк, марганець, молібден, кобальт* у сполученні з порфіринами утворюють макромолекули пігментів фотосинтезу (хлорофілу), окислювально-відновних ферментів (каталази, пероксидази, поліфенолоксидази).

*Іони  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ,  $H^+$*  необхідні для регуляції кислотності середовища й підтримки фізіологічних градієнтів клітин (тургору, осмотичного тиску, полярності).

*Вуглеводи* у живильні середовища додають як джерело вуглецю для біологічних макромолекул, а також за культивування гетеротрофних тканин (калусів і суспензій). Звичайно це дисахариди (сахароза), моносахариди (гексози: глюкоза, фруктоза; пентози: ксилоза й інші). Полісахариди в живильних середовищах практично не використовуються. Тільки деякі типи тканин (пухлинні), що містять гідролітичні ферменти, вирощують на середовищах із крохмалем, рафінозою, целобіозою.

*Вітаміни* використовують для стимулювання біохімічних реакцій у клітинах.

*Тіамін ( $B_1$ )* входить до складу піруватдекарбоксилази, бере участь у перетвореннях вуглеводів. Тіамінпірофосфат входить до складу ферментів окисного декарбоксилювання кетокислот (піровиноградної і кетоглутарової), є коферментом транскетолази.

*Піридоксин ( $B_6$ )* у вигляді фосфорнокислого ефіру входить до складу ферментів декарбоксилювання і переамінування амінокислот.

*Нікотинова кислота (PP)* у вигляді амідів входить до складу дегідрогеназ НАД і НАДФ, що каталізують донорно-акцепторний ланцюг  $H^+$  (відбирання  $H^+$  від молекул органічних речовин).

Як біологічні добавки для індукції первинного калусу іноді використовуються *рослинні екстракти* (10–15 % від загального об'єму середовища): кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), витяжки з незрілих зернівок кукурудзи (краще в період молочної стиглості), що містять цитокініни – кінетин, зеатин і NN-дифенілсечовину.

У культурі *in vitro* застосовують рідкі й агаризовані (тверді) живильні середовища. Рідкі середовища використовуються для культивування суспензій, калусів, ізольованих органів і тканин, рослин-регенерантів. При цьому для підтримки експлантів у пробірці із середовищем поміщають спеціальні містки-підтримки з фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів. Агаризовані середовища готують на основі агар-агару – полісахариду з морських водоростей, що утворює із водою гель при pH 5,6–

6,0. Іноді як ущільнювач використовують поліакриламідні гелі (біогелі). Для культивування різних типів тканин розроблено живильні середовища.

## 2. Гормони рослин. Роль гормонів в регулюванні морфогенезу в культурі *in vitro*.

*Фітогормони* регулюють ріст та розвиток рослин. Вони поділяються на стимулятори та інгібітори. У біотехнологічних дослідженнях частіше використовують стимулятори: ауксини, цитокініни, гібереліни.

*Ауксини*: ІОК – індоліл-3-оцтова кислота, ІМК – індоліл-3-масляна кислота, НОК –  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота. Стимулюють процеси росту й розтягнення клітин, сприяють формуванню калусної тканини, утворенню коренів.

*Цитокініни*: кінетин – 6-фурфуриламінопурин, зеатин, NN-дифенілсечовина, 6-БАП – 6-бензиламінопурин. Регулюють процеси поділу клітин, їхньої диференціації; сприяють утворенню пагонів у калусній тканині.

*Гібереліни*: гіберелова кислота (ГК<sub>3</sub>); ГК<sub>1</sub>, ГК<sub>2</sub> та інші. Стимулюють ріст і витягування стебла за рахунок розтягнення клітин. Викликають партенокарпію, зміну статі, сприяють виходу насіння зі стану спокою.

*Абсцизова кислота і етилен* є інгібіторами росту. Сприяють дозріванню плодів, соматичних ембріоїдів, викликають стан спокою бруньок і насіння, опадання квітів, плодів.

## 3. Основні прописи живильних середовищ. Послідовність приготування живильного середовища.

1. Приготувати маточні розчини для живильного середовища Мурасиге і Скуга.

1.1. Приготувати маточні розчини макро – та мікросолей за таблицею 1, зважуючи і розчиняючи окремо кожну наважку в новій порції бідистильованої води. Після приготування розчинів змішати всі макросолі і довести об'єм бідистильованою водою до 1 л; аналогічно змішати всі мікросолі та довести об'єм бідистильованою водою до 100 мл.

Таблиця 1

### Склад маточних розчинів макро- та мікросолей для живильного середовища Мурасиге і Скуга

| <i>Макросолі МС</i> – 1 л розчину солей;<br>по 100 мл розчину солей у 1 л<br>середовища |         | <i>Мікросолі МС</i> – 100 мл розчину<br>солей; по 1 мл розчину солей у 1 л<br>середовища |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Реактив                                                                                 | Вага, г | Реактив                                                                                  | Вага, мг |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                                                         | 16,5    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                                           | 620      |
| KNO <sub>3</sub>                                                                        | 19,0    | MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                                                     | 2,33     |
| CaCl <sub>2</sub>                                                                       | 3,3     | ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                                                     | 860      |

|                                      |     |                                                     |     |
|--------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------|-----|
| MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O | 4,2 | KI                                                  | 83  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1,7 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O | 25  |
| -                                    | -   | CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O                | 2,5 |
| -                                    | -   | CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O                | 2,5 |

1.2. Приготувати розчин Fe-хелат: на 100 мл розчину беруть FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 557 мг; Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O (натрієва сіль етилендіамін-тетраоцтової кислоти або трилон Б) – 745 мг. Наважки розчинити окремо у бідистиляті, злити і довести до кипіння.

1.3. Приготувати розчини фітогормонів 2,4-Д і кінетину в концентрації 1 мг/мл.

Розчини фітогормонів готують таким чином:

- *ауксини*: 2,4-Д, ІОК, ІМК, НОК – розчиняють 100 мг речовини в 0,5-2,0 мл етанолу, підігрівують, додають води до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);
- *цитокиніни*: кінетин, зеатин, БАП – розчиняють 100 мг речовини в 2 мл 0,5н НСІ, підігрівують, доводять водою до 100 мл;
- *гібереліни*: ГК<sub>3</sub> – розчиняють у воді;
- *абсцизини*: АБК – розчиняють у 3 мл 70 % етанолу, доводять водою до потрібного об'єму.

1.4. Приготувати розчини вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> і РР у концентрації 1 мг/мл.

Розчини вітамінів: тіамін НСІ (В<sub>1</sub>), піридоксин (В<sub>6</sub>), нікотинову кислоту (РР), аскорбінову кислоту (С), фолієву кислоту (В<sub>9</sub>), біотин (Н), параамінбензойну кислоту, Са – пантотенат, ціанкобаламін (В<sub>12</sub>), рибофлавін (В<sub>2</sub>) – розчиняють в бідистильованій воді (концентрація 1мг/мл, або 0,1 мг/мл).

Маточні розчини зберігають у посудинах із притертими пробками в холодильній камері за температури 0...+4°С не більше двох місяців. Розчини вітамінів, ферментів, рослинних екстрактів зберігають за температури -20°С. Розчини фітогормонів бажано готувати безпосередньо перед приготуванням живильного середовища.

*2. Приготувати та простерилізувати середовище Мурасиге і Скуга.*

1. Колбу об'ємом 1 л помістити на магнітний змішувач, налити 250 – 300 мл бідистиляту і додати макросолей МС – 100 мл; мікросолей МС – 1 мл; Fe-хелату – 5 мл; В<sub>1</sub> – 1 мг; В<sub>6</sub> – 1 мг; РР – 0,5 мг; мезо-інозиту – 100 мг (розчин 1).
2. Зважити сахарозу – 30 г (3 %), розчинити у окремій порції бідистильованої води і додати до розчину 1.
3. Довести рН до 5,6 – 5,8 за допомогою 1н КОН або 1н НСІ.

4. Наважку агару (7 г) помістити в термостійкий стакан і залити холодною бідистильованою водою (300 – 400 мл), залишити на 20 хв для набубнявіння, потім нагріти, постійно помішуючи до повного розчинення агару. За приготування рідкого середовища агар не додається.
5. Додати розчинений агар до розчину 1 і довести до потрібного об'єму бідистильованою водою. Розчин підігріти.
6. Розлити тепле живильне середовище у колби або пробірки і закрити ватними пробками або фольгою.
7. Простерилізувати середовище в автоклаві за тиску 0,8 – 1,0 атм (температура 115 – 120 °C) 20 – 25 хв.
8. Після стерилізації живильне середовище охолодити за кімнатної температури. Перед використанням його витримують протягом 3-5 днів, щоб переконатися у відсутності інфекції.

#### **Контрольні питання:**

1. Які макросолі та мікросолі входять до складу живильних середовищ? Які фізіологічні функції окремих макроелементів та мікроелементів у рослинному організмі?
2. Які вуглеводи використовуються в живильних середовищах? Їх значення.
3. Які фізіологічні функції вітамінів у рослинній клітині?
4. Як класифікують фітогормони? В чому полягає регулююча функція окремих груп фітогормонів?
5. З якою метою до складу живильних середовищ вводять рослинні екстракти?
6. В чому полягає відмінність у приготуванні рідких та твердих живильних середовищ?
7. Вкажіть назви живильних середовищ, що найбільш широко використовуються для культивування тканин рослин.
8. Яка методика приготування маточних розчинів для живильного середовища?
9. Особливості приготування маточних розчинів фітогормонів.
10. Методика приготування та стерилізації живильного середовища.

## **Лабораторна робота № 4 «Вирощування стерильних паростків сільськогосподарських культур»**

План:

1. Стерилізація насіння.
2. Методичні прийоми вирощування стерильних паростків рослин.

### **1. Стерилізація насіння.**

1. Підготувати рослинний матеріал. Відібрати 10 здорових, однакових за розмірами насінин дводольних і однодольних культур. Промити насіння у мильному розчині, потім водопровідною і дистильованою водою.
2. Провести стерилізацію рослинного матеріалу за схемою:
  - 1) 96 %-ний етанол – 1-2 хв;
  - 2) промити стерильною дистильованою водою;
  - 3) 0,1 %-ний розчин сулеми – 15 хв;
  - 4) промити стерильною дистильованою водою – 5-6 разів.
3. Розкласти стерильне насіння по 10 штук за допомогою стерильного пінцету у чашки Петрі, дно яких застелене вологою ватою.
4. Пророщувати насіння у термостаті за температури +25 С.
5. Аналіз результатів. Провести лабораторне дослідження після появи проростків. Визначити схожість, біометричні параметри проростків.

### **2. Методичні прийоми вирощування стерильних паростків рослин.**

Стерильні проростки вирощують з метою одержання експлантів для введення в калусну або пухлинну культуру. Стерильні проростки можуть бути використані у двох напрямках:

- 1) як джерело одержання експлантів з диференційованих тканин, які при перенесенні на живильне середовище з наявністю у ньому фітогормонів дедиференціюються і в результаті інтенсивної проліферації утворюють калусну тканину;
- 2) для одержання первинного калусу безпосередньо на паростках, який може бути ізольований і перенесений у стерильних умовах на живильне середовище, що містить фітогормони з метою подальшого культивування.

### **Контрольні питання:**

1. Назвіть напрями використання культури стерильних проростків в біотехнології.
2. Як проводити стерилізацію насіння для одержання стерильних проростків?

## Лабораторна робота № 5 «Отримання і культивування калусної тканини рослин»

План:

1. Стерилізація рослинного матеріалу.
2. Методичні прийоми введення в культуру *in vitro*.
3. Особливості культивування рослинних тканин в умовах *in vitro*.

### 1. Стерилізація рослинного матеріалу.

*Калус* – тканина, що виникла в результаті дедиференціювання й проліферації клітин тканин і органів рослин.

Для рослини *in vivo* калус – це група клітин, що виникає при травмах і захищає місця поранення (ранева паренхіма). У ньому накопичуються живильні речовини для регенерації анатомічних структур або втраченого органу. В біотехнології культура калусної тканини використовується для цитологічних досліджень, одержання біологічно активних речовин, соматональних варіантів, клітинної селекції, мутагенезу *in vitro*, регенерації рослин шляхом органогенезу або соматичного ембріогенезу.

Диференційовані клітини поєднуються у рослині в тканини й відрізняються за морфологічною будовою та функціями. На живильних середовищах з великим змістом ауксинів клітини експланта дедиференціюються і переходять до проліферації, втрачають колишні функції і морфологію. У клітині, що готується до поділу, стимулюється синтез усіх форм РНК, починається реплікація ДНК, зникають специфічні тканинні білки-антигени, синтезуються нові, специфічні для калусних клітин. Змінюється активність структурних генів і білкового апарату клітин. Дедиференціація спеціалізованих клітин починається зі збагачення їхніми елементами цитоплазми: мікротрубочками, мембранами ЕПС і комплексу Гольджі, рибосомами. Зникають хлоропласти і хромопласти, продукти їхньої діяльності; може утворюватися багато ядер або збільшитися число хромосом; укрупнюються вакуолі.

Калус, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що не мають точно визначеної структури. Культури калусів можуть бути отримані з різних органів рослин – коренів, пагонів, листків, суцвіть. Ефективність одержання калусної тканини залежить від правильного підбору типу експланта, способу стерилізації, складу живильного середовища, умов культивування.

### Стерилізація рослинного матеріалу

1. Підготувати рослинний матеріал. Пагони дослідної рослини витримати в мильному розчині 20 хв, потім промити проточною водою 8 разів,

нарізати на сегменти довжиною 3-5 мм. Нарізані пагони загорнути в марлю.

2. Провести стерилізацію рослинного матеріалу за схемою:

- 1) 70 %-ний етанол – 40 секунд;
- 2) промити стерильною дистильованою водою;
- 3) 50 %-ний розчин препарату «Брадофен» – 12 хв;
- 4) промити стерильною дистильованою водою – 3 рази по 5 хв.

3. Стерильний рослинний матеріал покласти в стерильну чашку Петрі.

4. Підготувати робоче місце – ламінарний бокс або стіл в операційній кімнаті. Робочу поверхню обробити етанолом. Інструменти помістити в посуд з 96 %-ним етанолом. Запалити спиртівку.

## **2. Методичні прийоми введення в культуру *in vitro*.**

Краї пробірки та інструменти обпалити в полум'ї спиртівки. Від рослинного матеріалу за допомогою скальпеля відрізати сегмент розміром 0,5 × 0,5 см і помістити його на поверхню живильного середовища, злегка вдавлюючи. Обпалити краї пробірки та закрити її ватно-марлевою пробкою.

## **3. Особливості культивування рослинних тканин в умовах *in vitro*.**

Пробірки з експлантами розмістити в культуральній кімнаті за температури 25-28 °С, відносної вологості повітря 60-70 % і 16-годинного фотоперіоду.

Провести лабораторне дослідження експлантів через 2 тижні. Вибракувати інфіковані експланти. Виявити ознаки калусогенезу. Дослідження проводити через 7-10 днів.

### **Контрольні питання:**

1. Що називається *калусом*? Які функції виконує калусна тканина у рослин в умовах *in vivo*?
2. Назвіть напрями використання культури калусної тканини в біотехнології.
3. Які структурні та функціональні зміни характерні для клітин, переходять до дефінденціяції і проліферації?
4. Від яких факторів залежить ефективність одержання калусної тканини?
5. В чому суть методики введення експлантів у культуру *in vitro*?

## **Лабораторна робота № 6 «Субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з різним складом гормонів»**

### План:

1. Методичні прийоми субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з підвищеною концентрацією цитокінінів.
2. Індукція гомогенезу в калусній тканині.

### **1. Методичні прийоми субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з підвищеною концентрацією цитокінінів.**

*Субкультивування* (пасажування) – перенесення трансплантата на свіже живильне середовище.

У процесі культивування калуса на живильному середовищі відбувається його поступове виснаження й висихання. Тому для підтримки росту калуса в умовах *in vitro* протягом тривалого часу необхідно періодично переносити частину калуса на свіже живильне середовище.

1. *Підготувати робоче місце – ламінарний бокс або стіл в операційній кімнаті.* Робочу поверхню обробити етанолом. Інструменти помістити в посуд з 96 %-ним етанолом. Запалити спиртівку.
2. *Провести візуальний аналіз калусної тканини.* За наявності інфекції калусні тканини не використовуються для субкультивування. Також непридатними для субкультивування є калуси, що мають значні некротичні (мертві) ділянки. Оптимальними для переносу на свіже живильне середовище є калуси без ознак некрозу або з незначними некротичними ділянками.
3. *Провести субкультивування калусу.*

3.1. Якщо калус без некротичних ділянок і має розмір  $0,5 \times 0,5$  см, то з пробірки він одразу переноситься на свіже живильне середовище в нову культуральну посудину.

Якщо калус має невеликі некротичні ділянки, то їх слід видалити. Для цього необхідно дістати калус із пробірки та помістити в стерильну чашку Петрі, де за допомогою скальпеля видалити некротичні ділянки. Після цього помістити калус на поверхню живильного середовища, злегка вдавлюючи. Обпалити краї пробірки та закрити її ватно-марлевою пробкою.

Якщо калус має великі розміри і тисне на стінки пробірки, його необхідно розділити на частини розміром  $0,5 \times 0,5$  см, а потім кожен частину помістити в окрему пробірку на свіже живильне середовище.

4. *Культивування калусу.* Пробірки з калусами розмістити в культуральній кімнаті при температурі 25-28 °С, відносній вологості повітря 60-70 %, освітленості 2-3 тис. лк і 16-годинного фотоперіоду.
5. *Провести візуальні дослідження калусу* в процесі культивування за такими параметрами: загальний стан калусу, характер його росту, колір, консистенція, поява на його поверхні новоутворень.

## **2. Індукція гемогенезу в калусній тканині.**

Для регулювання морфогенезу в калусній культурі застосовують живильні середовища з різним складом гормонів, дотримуючись таких положень:

- високі концентрації ауксинів і низькі цитокінінів (або без цитокінінів) стимулюють калусогенез;
- високі концентрації цитокінінів і низькі ауксинів (або без ауксинів) стимулюють гемогенез;
- низькі концентрації ауксинів стимулюють ризогенез.

Калус субкультивують на стаціонарній фазі росту кожні 4–6 тижнів. Маса трансплантату становить 60–100 мг на 20–40 мл середовища.

### **Контрольні питання:**

1. Які причини необхідності субкультивування калусної тканини?
2. Які принципи застосування гормонів у складі живильних середовищ для регулювання морфогенезу в калусній тканині?
3. У чому полягає суть методики субкультивування калусу?

## **Лабораторна робота № 7 «Зняття ростових характеристик калусної культури. Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини»**

План:

1. Візуальний аналіз калусних культур.
2. Визначення ростового індексу калусу.
3. Підрахунок кількості клітин методом Брауна.
4. Методика приготування давленого препарату калусної тканини.  
Цитологічний аналіз давленого препарату.

### **1. Візуальний аналіз калусних культур.**

У циклі вирощування калусні клітини після ряду поділів проходять звичайний онтогенез: ростуть розтягненням, диференціюються й деградують. Ріст калусу відповідає закономірностям S-подібної кривої. Ростовий цикл починається з посадки експланта на середовище (початок культивування), а завершується в момент припинення мітозів (стаціонарна фаза).

У лаг-фазі (латентній фазі) клітини не діляться, не збільшуються в розмірі, мають низьку метаболічну активність. В експоненціальній фазі (фазі логарифмічного росту) клітини активно діляться мітозом. У ранній експоненті збільшується кількість мітохондрій (синтезується АТФ), рибосом, усіх видів РНК, синтезуються білки, активізується метаболізм, інтенсивно поглинається кисень. Пізня експонента або фаза латентного росту характеризується зниженням питомої швидкості росту, уповільненням клітинних поділів, збільшенням середнього розміру клітин за рахунок розтягнення. У стаціонарній фазі розмір клітин продовжує збільшуватися, а їхній поділ припиняється. У пізній стаціонарній фазі (фаза деградації) за рахунок виснаження середовища клітини старіють і відмирають. Тривалість ростового циклу калусних клітин становить 21–28 днів.

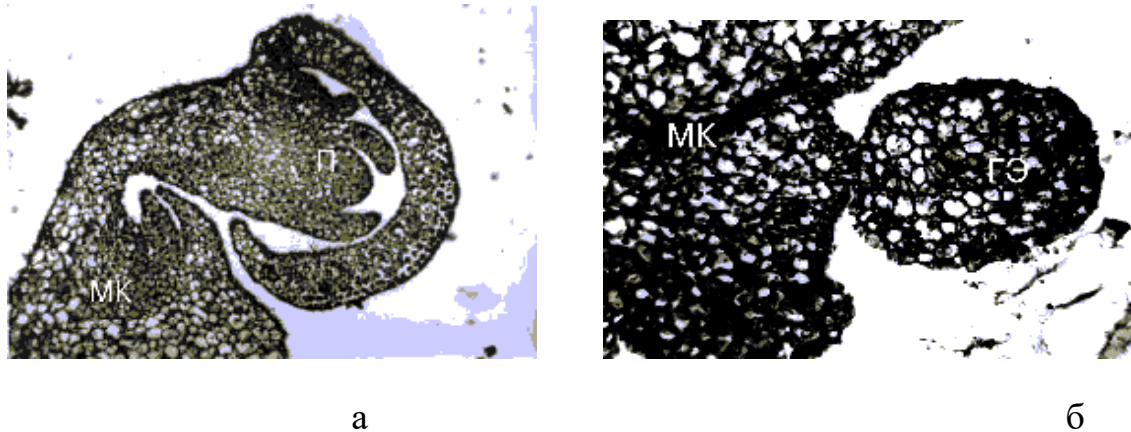
Калусна тканина, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що не має точно визначеної анатомічної структури. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним. Залежно від походження й умов вирощування калусні тканини бувають:

- пухкі, значно обводнені, що легко розпадаються на окремі клітини;
- середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;
- щільні, із зонами камбію й судин.

Калусна тканина характеризується трьома типами клітин: дрібними, середніми й великими. За субкультивування тканини на середовище, що

містить індуктори органогенезу, дрібні клітини діляться й формують меристематичні осередки. Поділ клітин меристематичного осередку приводить до гомогенезу або ризогенезу.

Калуси з високим морфогенетичним потенціалом звичайно матові, компактні, структуровані, мають зелені хлорофіловмісні ділянки, що є зонами морфогенезу. Морфогенез у калусній культурі може йти шляхом органогенезу (рис. 1а), або соматичного ембріогенезу (рис. 1б).



**Рис. 1. Морфогенез у калусній культурі пшениці:**

а - формування бруньки; б - формування ембріюда; МК - морфогенний калус, П - брунька, ГЕ - глобулярний ембріюд

У культурі також трапляються пухкі калуси, що не здатні до морфогенезу. Такі неморфогенні калуси можуть бути переведені в суспензійну культуру для одержання вторинних метаболітів.

*Таблиця 1*

**Візуальний аналіз калусних культур різних видів рослин**

| Номер зразка | Колір калусу | Консистенція калусу | Наявність новоутворень | Наявність некротичних ділянок |
|--------------|--------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|
| Вид рослин   |              |                     |                        |                               |
|              |              |                     |                        |                               |

**2. Визначення ростового індексу калусу.**

Зважують по 5 калусів одного виду рослин через 1-2-3-4 тижні культивування, результати зважування заносять до [таблиці 2](#).

*Таблиця 2*

**Ріст калусної тканини (вид рослини) в умовах *in vitro***

| Номер зразка | Маса калусу, мг |                |                |                   |
|--------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|
|              | перший тиждень  | другий тиждень | третій тиждень | четвертий тиждень |
|              |                 |                |                |                   |

Визначають середні показники для кожного тижня і будують графік росту калусу.

*Визначення ростового індексу калусу.* Ростовий індекс розраховується за формулою:

$$I = W_t - W_0 / W_0,$$

де  $W_0$  – початкова маса калусу;  $W_t$  – маса калусу через час культивування  $t$ .

Використовуючи дані таблиці 2, розраховують ростовий індекс калусу для кожного зразка з першого по третій тиждень. Обробляють результати методом описової статистики (Лакін, 1980). Визначають середнє арифметичне ( $M$ ) за формулою

$$M = \frac{\sum x}{n},$$

де  $x$  – варіант досліджуваної сукупності,  $n$  – об'єм сукупності.

Визначають середнє квадратичне відхилення ( $S$ ) за формулою

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2}{n - 1}},$$

Таким же чином можна проводити врахування результатів за сухою масою.

### **3. Підрахунок кількості клітин методом Брауна.**

Підрахунок клітин дозволяє визначити чи проходить збільшення маси тканини за рахунок поділу клітин або їх росту розтягненням. Це дає можливість також розрахувати середню масу клітини. Для підрахунку кількості клітин використовують метод Брауна (Brown, Rickless, 1949), за якого тканину мацерують до окремих клітин у хромовій кислоті. Або фіксований матеріал поміщають у бюкси з 1N HCl і витримують 40-50 хвилин при 60 °C у термостаті. Підрахунок клітин ведеться в камері Фукса-Розенталя.

### **4. Методика приготування давленого препарату калусної тканини.**

#### **Цитологічний аналіз давленого препарату.**

##### *Приготування давленого препарату калусної тканини.*

Поміщають на предметне скло невеликий (не більше 2-3 мм) шматочок калусу і акуратно роздавлюють його плоскою поверхнею скальпеля. Піпеткою наносять на нього 1-2 краплі ацетокарміну чи іншого вітального барвника. За необхідності предметне скло підігрівають на полум'ї спиртівки, не доводячи до кипіння. Відкладають на 5 хвилин для фарбування. Після цього наносять

одну краплю гліцерину і накривають калюс покривним склом, на яке покладають шматочок фільтрувального паперу, злегка надавивши на нього для розпластання клітин.

*Проведення цитологічного аналізу давленого препарату калусної тканини.*

Поміщають готовий препарат під мікроскоп і роздивляються при малому збільшенні. Звертають увагу на наявність клітин різної форми і розмірів. Виділяють основні групи клітин за розміром і формою. Розглядають окремі типи клітин при великому збільшенні (об'єктив 40×). Звертають увагу на характер розміщення цитоплазми і ядра, наявність вакуолей. Проводять підрахунок клітин різної форми в 5 полях зору мікроскопа, дані заносять до таблиці 3.

*Таблиця 3*

### **Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини**

| Вид рослини | Типи клітин    |   |                    |   |                       |   |
|-------------|----------------|---|--------------------|---|-----------------------|---|
|             | меристематичні |   | паренхімні округлі |   | паренхімні гігантські |   |
|             | шт.            | % | шт.                | % | шт.                   | % |
|             |                |   |                    |   |                       |   |

Замальовують визначені типи клітин. Роблять висновок щодо наявності в калусній тканині диференційованих клітин та можливості морфогенезу.

### **Контрольні питання:**

1. Які виділяють фази росту калусу? Які ростові процеси відбуваються у кожній фазі?
2. Якого кольору бувають калуси?
3. На які групи за консистенцією поділяються калуси?
4. Як візуально відрізняються морфогенні та неморфогенні калуси?
5. Яка методика приготування і аналізу давленого препарату калусної тканини?

### **Лабораторна робота № 8 «Клональне мікророзмноження рослин. Ізолювання експланту, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*»**

План:

1. Стерилізація рослинного матеріалу.
2. Виділення апікальних меристем.
3. Методика введення апікальних меристем в культуру *in vitro*.

### 1. Стерилізація рослинного матеріалу.

*Клональне мікророзмноження* – масове нестатеве розмноження рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру, з використанням техніки *in vitro*.

Залежно від характеру морфогенетичних процесів у культурі тканин виділяють *типи* клонального мікророзмноження:

- 1) активація розвитку вже існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки стебла);
- 2) індукція виникнення бруньок або ембріодів *de novo*.

Останній тип поділяється на *три методи*:

- a) виникнення організованих структур безпосередньо із спеціалізованих тканин експланту (тканин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листка);
- b) з первинного калусу, утвореного клітинами експланту;
- c) із субкультивованої калусної тканини або клітин суспензійної культури.

З метою збереження генетичної стабільності мериклонів для клонального мікророзмноження найчастіше використовується культура апікальних меристем.

*Культура меристем* – це асептичне вирощування на живильних середовищах ізольованої з апексу або пазушної бруньки пагона апікальної меристеми з одним або двома листовими примордіями.

Культура апікальних меристем використовується для:

- 1) одержання рослин, генетично ідентичних вихідному генотипу;
- 2) одержання рослин, вільних від патогенів;
- 3) зберігання зародкової плазми (кріозбереження).

Морфогенез ізольованих меристем в культурі *in vitro* і подальше мікророзмноження може бути реалізоване *двома шляхами*:

- 1) регенерація пагонів нормальних пропорцій з наступним їх поділом на «однобрунькові» мікроживці, які використовуються як вторинні експланти для повторного циклу розмноження;
- 2) стимуляція розвитку всіх пазушних бруньок і меристематичних бугорків в результаті пригнічення апікального домінування первинного пагону. Регенеранти мають вигляд пучків пагонів, кожен з яких може бути рекультивований з аналогічним результатом.

Процес клонального мікророзмноження складається з *чотирьох основних етапів*:

1-й етап – ізолювання експланту, введення та ініціація його розвитку в умовах *in vitro*;

2-й етап – власне мікророзмноження;

3-й етап – укорінення мікропагонів;

4-й етап – адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

#### *Стерилізація рослинного матеріалу*

Пагони дослідної рослини витримати в мильному розчині 20 хв, потім промити проточною водою 8 разів, нарізати на сегменти довжиною 10-15 мм. Нарізані пагони загорнути в марлю.

Проводять стерилізацію рослинного матеріалу в умовах ламінар-боксу за схемою:

- 1) 70 %-ний етанол – 40 секунд;
- 2) промити стерильною дистильованою водою;
- 3) 50 %-ний розчин препарату «Брадофен» - 12 хв;
- 4) промити стерильною дистильованою водою – 3 рази по 5 хв.

Стерильний рослинний матеріал покласти в стерильну чашку Петрі.

*Обробка рук і робочої поверхні ламінар-боксу 70%-ним етанолом.*

Інструменти поміщають у 96 %-ний етанол і перед кожною операцією обпалювати у полум'ї спиртівки. Для виділення меристем звичайно використовують голкотримач, у якому закріплюють шматочки леза. Можна також використовувати препарувальну голку або очний скальпель.

### **2. Виділення апікальних меристем.**

*Виділення (ізолювання) апікальних меристеми.* Операція проводиться під мікроскопом МБС-10 (збільшення 16×). За допомогою леза голкотримача видаляють з бруньки верхні покривні листочки, послідовно оголюючи меристему з 1-2 листовими примордіями, а потім зрізають меристему біля основи.

### **3. Методика введення апікальних меристем в культуру *in vitro*.**

Ізольовану меристему на кінчику леза переносять в пробірку і розміщують на поверхні живильного середовища. Ватно-марлеву пробку і краї пробірки злегка обпалюють в полум'ї спиртівки й закривають пробірку. Виділяють в такий спосіб кілька меристем різних розмірів – 0,3, 0,5, 0,8 і 1 мм з 1-3 листовими примордіями і поміщають їх на живильні середовища.

*Культивування меристем.* Пробірки з меристемами підписують, установлюють в штатив і переносять для вирощування в культуральну кімнату з температурою +26 °С, відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 2-3 тис. лк із 16-годинним фотоперіодом.

*Аналіз результатів.* Через 2-4 тижні культивування результати замальовують. Роблять біометричний аналіз мікророслин, що регенерували з меристем різних розмірів, заповнивши таблицю 1.

Таблиця 1

**Біометричний аналіз мікророслин (вид, сорт рослин)**

| № пробірки                | Висота рослини,<br>мм | Кількість<br>пагонів, шт. | Наявність калусу |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------------|
| Експланти розміром 0,3 мм |                       |                           |                  |
|                           |                       |                           |                  |

За даними табл. 1 визначають кількість стерильних експлантів (%), приживлюваність меристем, частоту регенерації мікророслин. Роблять висновок про розвиток мікророслин, що регенерували з меристем різного розміру.

**Контрольні питання**

1. Дайте визначення клонального мікророзмноження. Які його переваги над традиційними способами розмноження рослин?
2. Які виділяють типи та методи клонального мікророзмноження? Який тип клонального мікророзмноження найбільше використовується?
3. З якою метою використовується культура апікальних меристем?
4. Як може бути реалізований морфогенез ізольованих меристем у культурі *in vitro*?
5. Які особливості ізолювання та введення апікальних меристем у культуру *in vitro*?

**Лабораторна робота № 9 «Культура ізольованих зародків рослин *in vitro*»**

План:

1. Стерилізація рослинного матеріалу.

2. Виділення зародків із дозрілого та недозрілого насіння.
3. Методика введення зародків у культуру *in vitro*.

### 1. Стерилізація рослинного матеріалу.

*Культура ізольованих зародків* (ембріокультура) – це стерильне вирощування на штучному живильному середовищі дозрілих або недозрілих зиготичних зародків.

Культура дозрілих зародків використовується для вирішення завдань:

- 1) прискореного отримання рослин з насіння, що погано або зовсім не проростає;
- 2) виведення зародка із стану спокою, що починається під час дозрівання насіння на рослині.

Культура недозрілих зародків використовується для вирішення завдань:

- 1) подолання нежиттєздатності зародків (живильне середовище замінює ендосперм);
- 2) селекції ранньостиглих сортів, коли плід досягає раніше, ніж зародок;
- 3) експериментального мутагенезу.

Через 11-20 днів після запилення на торпедоподібній стадії розвитку зародка недозріле насіння відокремлюють від суцвіть і проводять його поверхневу стерилізацію в ламінар-боксі 50 % розчином препарату «Брадофен» протягом 10-12 хв. Потім матеріал промивають у трьох змінах стерильної дистильованої води.

### 2. Виділення зародків із дозрілого та недозрілого насіння.

Робота проводиться у ламінар-боксі. Стерильне недозріле насіння покласти у стерильні чашки Петрі. Потім під мікроскопом МБС-10 з насіння відділити зародок. Для цього уздовж насіння роблять невеликий надріз покривів, розсовують їх препарувальною голкою й ізолюють зародок разом з ендоспермом.

### 3. Методика введення зародків у культуру *in vitro*.

*Експлантація зародків на живильне середовище.* Ізольований зародок на кінчику препарувальної голки переносять на живильне середовище, закривають пробірку пробкою, підписують й поміщають у культуральну кімнату.

*Культивування ізольованих зародків.* Ізольовані зародки культивують за температури  $24 \pm 2$  °C, відносної вологості повітря 60-70 %, освітленості 5-6 тис. лк і 16-годинного фотоперіоду.

*Аналіз результатів.* Після посадки зародків на живильне середовище розвиток проростків починається на 5-7 день культивування з появи невеликого світлого корінця й 1-2 сім'ядольних листків. Проводять

біометричний аналіз рослин на 30-й день культивування, заповнивши таблицю 1.

*Таблиця 1*

**Розвиток рослин (вид рослини) з ізолюваних зародків на  
30-й день культивування**

| № пробірки | Висота<br>проростка, мм | Кількість<br>листіків, шт. | Кількість<br>коренів, шт. |
|------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
|            |                         |                            |                           |

За даними таблиці визначають кількість пророслих зародків (%), роблять висновок щодо готовності проростків до переведення в умови *in vivo*.

**Контрольні питання:**

1. Які завдання вирішуються з допомогою культури дозрілих зародків рослин?
2. З якою метою застосовується культура недозрілих зародків рослин?
3. У чому полягає суть методики ізолювання та культивування зародків рослин?

**Лабораторна робота № 10 «Клональне мікророзмноження рослин»**

План:

1. Власне мікророзмноження.
2. Методика мікроживцювання.

**1. Власне мікророзмноження.**

Клональне мікророзмноження є однією з найбільш широко застосовуваних у рослинництві біотехнологій завдяки таким перевагам перед традиційними методами розмноження рослин:

- 1) високі коефіцієнти розмноження (до  $10^5 - 10^6$  мериклонів за рік);
- 2) скорочення площ у закритому ґрунті, зайнятих під маточними і розмножуваними рослинами;
- 3) можливість цілорічної роботи в лабораторних умовах і планування випуску рослин в необхідні строки;
- 4) можливість одержувати вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються в звичайних умовах;
- 5) можливість одержувати посадковий матеріал, оздоровлений від патогенів;
- 6) можливість депонування рослин за низьких позитивних температур або кріозбереження.

Високий коефіцієнт розмноження досягається завдяки другому етапу – власне мікророзмноження, під час якого здійснюється мікроживцювання пагонів рослин-регенерантів та введення їх на живильні середовища для розмноження. Можна проводити декілька циклів мікророзмноження.

## **2. Методика мікроживцювання.**

*1. Підготувати до роботи ламінар-бокс, інструменти (пінцет, скальпель), пробірки з мікророслинами. Провести живцювання мікророслин та субкультивування на живильне середовище.* Пінцетом витягти мікророслину із пробірки, в якій вона росла і помістити її у стерильну чашку Петрі. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізати стебло на мікроживці довжиною 7-10 мм з однією-двома бруньками так, щоб частина над брунькою становила 2 – 3 мм, а під нею 5 – 7 мм. Пінцетом перенести кожний мікроживець у окрему пробірку і занурити на 2-3 мм у живильне середовище, так щоб брунька була над агаром.

*3. Культивування мікроживців.* Пробірки з мікроживцями підписати, установити в штатив і перенести для вирощування у культуральну кімнату з температурою  $+26^\circ\text{C}$ , відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 2-3 тис. лк із 16-годинним фотоперіодом.

*4. Аналіз результатів.* За 3 – 4 тижні з пазушних бруньок розвиваються мікророслини, які знову можна використати для розмноження живцюванням або укорінення. Зробити біометричний аналіз мікророслин, заповнивши таблицю 1.

*Таблиця 1*

### **Біометричний аналіз мікророслин**

| № пробірки | Кількість пагонів, шт. | Висота пагонів, мм | Коефіцієнт розмноження (кількість вузлів) | Наявність калусу |
|------------|------------------------|--------------------|-------------------------------------------|------------------|
|            |                        |                    |                                           |                  |

За даними таблиці 1 визначити приживлюваність мікропагонів, частоту регенерації мікророслин. Зробити висновок про розвиток мікророслин.

**Контрольні питання:**

1. Які його переваги клонального мікророзмноження над традиційними способами розмноження рослин?
2. Опишіть методику мікроживцювання пагонів рослин-регенерантів.

**Лабораторна робота № 11 «Аналіз генетично модифікованого матеріалу методами експрес-діагностики»**

**План:**

1. Методи імунодіагностики.
2. Молекулярно-генетичні маркери.

## 1. Методи імунодіагностики.

*Генетично модифіковані рослини* – рослини, що містять у своєму геномі чужорідний ген або гени.

Вперше ідею про необхідність ідентифікації генетично модифікованих і біологічно чистих продуктів було висунуто в Конвенції ООН із біологічного різноманіття у грудні 1993 р. Вона була підтримана пізніше, у рамках рішення Картахенського протоколу з біологічної безпеки, що був підписаний більш ніж 130 країнами світового співтовариства у 2000 р. у Монреалі. Були розпочаті роботи з відпрацювання методик повнішої і точнішої ідентифікації генетично модифікованих організмів та вироблених з них продуктів, що потрапляють у канали міжнародної торгівлі. Широковживані дві групи методів аналізу – імунодіагностики та молекулярно-генетичні.

Методи імунодіагностики ґрунтуються на специфічності реакції антиген-антитіло. Утворення антитіл у тварин є основою фізіологічного процесу, названого імунною відповіддю. Спеціалізовані клітини – В- і Т-лімфоцити, що містяться в селезінці, лімфатичних вузлах і крові, розпізнають чужорідні білки (антигени), які потрапили в організм тварини, і відповідають синтезом антитіл, що специфічно реагують з антигенами та інактивують їх. Антигенами можуть бути не лише білки, а й їхні комплекси з іншими речовинами: полісахаридом, ліпідно-вуглеводневими комплексами, органічними речовинами різної будови. Антитілами є білки глобулінової природи, що утворюються в організмі у відповідь на введення речовин, що несуть на собі ознаки чужорідної генетичної інформації (антигенів). Антитіла строго специфічні, тобто вступають в реакцію лише з антигеном, що індукує їх синтез.

## 2. Молекулярно-генетичні маркери.

В основу використання білків як генетичних маркерів покладено виявлення їх генетично-детермінованого поліморфізму (ізоферментних форм) за допомогою електрофорезу. Білкові маркери використовують головним чином у разі вивчення експресії чужорідних генів. Перспективнішим є використання поліморфних послідовностей нуклеотидів у молекулі ДНК. В основу методу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ПДРФ покладено гідроліз тотальної (геномної) ДНК різними ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами), її фракціонування за допомогою електрофорезу і наступна гібридизація з певними ДНК-зондами. Останні є відносно невеликими фрагментами одноланцюгової ДНК (або виділені гени), що використовують для пошуку комплементарних послідовностей серед різноманітних молекул ДНК. З метою детекції гібридних молекул в ДНК-зонди вводять радіоактивні або інші мітки, що дає змогу здійснювати

ідентифікацію у будь-якому організмі. За допомогою ПДРФ-аналізу досліджують організацію і мінливість геному, розпізнають конкретні гени.

На сьогодні використовують кілька технологій виявлення поліморфізму на рівні ДНК: ПДРФ-поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (RELP – restriction fragments length polymorphism) та поліморфізм продуктів ампліфікації за допомогою ПЛР (PCR – polymerase chain reaction).

#### **Контрольні питання:**

1. Які рослини називають генетично модифікованими?
2. Які методи ідентифікації генетично модифікованих організмів найбільш широко використовуються?
3. На чому ґрунтуються методи імунодіагностики?
4. Що покладено в основу молекулярно-генетичних маркерів?
5. Які технології виявлення поліморфізму на рівні ДНК використовують на сьогодні?

### **Лабораторна робота № 12 «Принципи та застосування ПЛР»**

#### **План:**

1. Структура ДНК та її елементів.
2. Суть методу ПЛР.
3. Особливості ампліфікації ДНК у першому, другому, третьому й наступному циклах ПЛР.

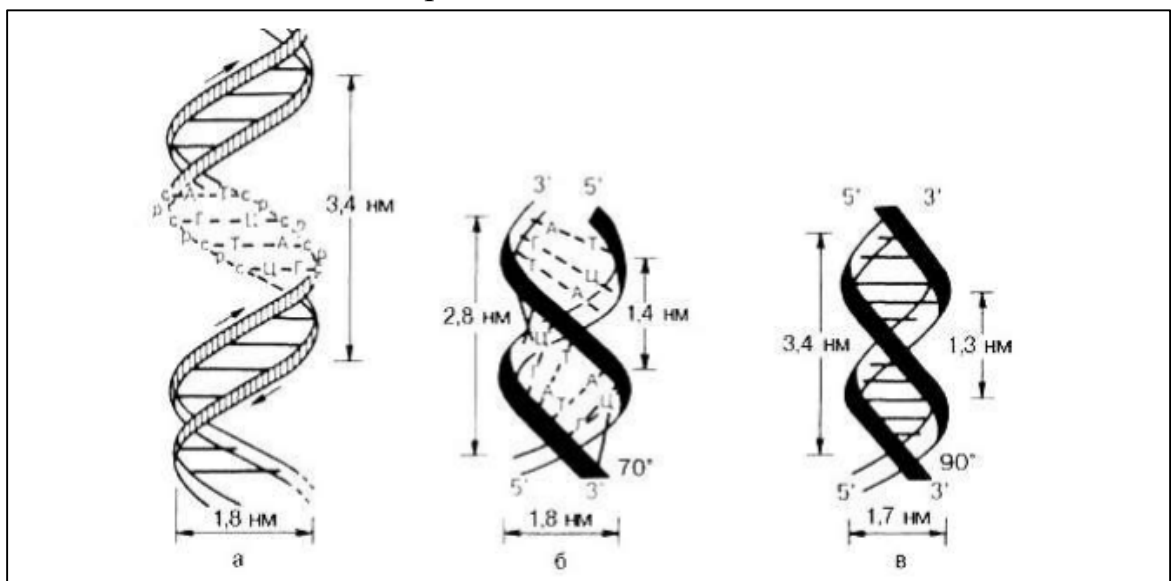
4. Детекція ампліфікованої ДНК. Секвенування.
5. Напрями використання ПЛР-аналізу ДНК рослин.

### 1. Структура ДНК та її елементів.

ДНК – полімер, структурною одиницею якого є нуклеотид. Нуклеотид складається з азотистої основи – пуринової (аденін (А) чи гуанін (Г)) або піримідинової – (цитозин (Ц) чи тимін (Т)), вуглеводу дезоксирибози (п'ятикутне цукрове кільце) і залишку фосфорної кислоти ( $\text{HPO}_3$ ). Фосфатні угруповання перебувають зовні спіралей, а основи – всередині. Подвійна спіраль ДНК правобічна. Десять пар основ складають повний оберт 360 градусів, довжина витка приблизно 3,4 нм. Ланцюги утримуються разом водневими зв'язками між основами і закручені одна навколо іншої і навколо загальної осі.

У розробці моделі ДНК важливу роль зіграло правило Е. Чаргаффа (1949):

$A = T$ ;  $G = C$  або  $A + G / C + T = 1$ , тобто пропорція пуринових і піримідинових основ завжди рівна.



**Рис № 1** Схематичне зображення подвійної спіралі ДНК:

а – по Уотсону і Кріку (с – залишок дезоксирибози, р – залишок фосфорної кислоти); б – А-форма ДНК; в – В-форма ДНК

Нуклеотиди з'єднані в полінуклеотидні ланцюги зв'язками між 5'-положенням одного пентозного кінця і 3'-положенням наступного пентозного кільця через фосфатну групу з утворенням фосфодієфірних зв'язків. Генетична інформація записана в послідовності нуклеотидів в напрямку від 5'-кінця до 3'-кінця – така нитка називається смисловою ДНК, тут розташовані гени. Друга нитка напрямку 3'-5' вважається антисмисловою. Вона є еталоном зберігання генетичної інформації. Антисмислова нитка грає велику роль в

процесах реплікації і репарації. Основи в антипаралельних нитках утворюють за рахунок водневих зв'язків комплементарні пари: А + Т; Г + Ц. Таким чином, структура однієї нитки визначає послідовність нуклеотидів іншої нитки. Отже, послідовності основ в нитках ДНК завжди антипаралельні і комплементарні. Принцип комплементарності універсальний для процесів реплікації і транскрипції.

Поліморфізм ДНК – це здатність молекули приймати різні конфігурації. В даний час описано 6 форм, частина з них може існувати тільки *in vitro*:

*В-форма* існує в фізіологічних умовах (низька концентрація солей, високий ступінь гідратації – 92 %), є домінуючим структурним типом.

*А-форма* виявлена при 75 % вологості і при більш високому вмісті іонів калію і натрію. Вона коротше *В-форми* на 25 %, її конформація близька до структури гібридних молекул ДНК-РНК.

*С-форма* утворюється при 66 % вологості в присутності іонів літію, має менше основ на виток, ніж *В-форма*.

У цих трьох формах можуть перебувати всі ДНК незалежно від нуклеотидної послідовності. Наступні форми характерні тільки для молекул ДНК з певними послідовностями в парах основ.

*D і E-форми* – можливо, крайні варіанти однієї і тієї ж форми, мають найменше число пар основ на виток. Виявлені лише в молекулах ДНК, які не містять гуанін.

*Z-форма* – це зигзагоподібна лівозакручена форма, в той час як інші форми правозакручені. *Z-ДНК* зустрічається на ділянках, збагачених парами Г-Ц. Показано, що *Z-форма* ДНК може брати участь в регуляції експресії генів.

Зазначені форми при зміні концентрації солей і ступеня гідратації можуть переходити одна в одну, наприклад, А – В; а також Z – В. Вважають, що взаємні переходи А- і В-форм регулюють роботу генів.

ДНК не може грати роль матриці при синтезі білків з амінокислот, тому що майже вся вона знаходиться в хромосомах, розташованих в ядрі, в той час як більшість, якщо не всі, клітинні білки синтезуються в цитоплазмі. Отже, генетична інформація, яка міститься в ДНК, має передаватися проміжній молекулі, яка транспортується в цитоплазму і бере участь в синтезі поліпептидних ланцюгів. Такою проміжною молекулою є РНК. Про це свідчить те, що клітини, які синтезують велику кількість білка, містять багато РНК. Крім того, цукрозофосфатні «скелети» ДНК і РНК надзвичайно схожі, тому легко уявити, як відбувається синтез одиночних ланцюгів РНК на одноланцюговій ДНК з утворенням нестабільних гібридних молекул, один ланцюг яких представлений ДНК, а інший – РНК. Взаємовідносини ДНК, РНК і білка в 1953 р. були представлені у вигляді схеми:

### **реплікація ДНК → транскрипція РНК → трансляція → білок**

Одиночні ланцюги ДНК служать матрицями при синтезі комплементарних молекул ДНК (реплікація) і комплементарних молекул РНК (транскрипція). У свою чергу, молекули РНК служать матрицями для послідовного поєднання амінокислот з утворенням поліпептидних ланцюгів білків в процесі трансляції, названому так тому, що «текст», написаний на «мові» нуклеотидів, перекладається (транслюється) на «мову» амінокислот. Група нуклеотидів, що кодує одну амінокислоту, називається кодоном.

### **2. Суть методу ПЛР.**

Селекція рослин, традиційно заснована на гібридизації й відборі, збагачена новими методами біотехнології й генної інженерії. Сукупність цих методів дозволяє одержувати значне різноманіття вихідного матеріалу і створювати нові організми з наведено заданими генетичними ознаками. Різноманіття селекційного матеріалу вимагає ідентифікації генотипів і їхньої класифікації. На сучасному рівні це завдання вирішується за допомогою молекулярно-генетичних методів аналізу ДНК, зокрема, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

*Полімеразна ланцюгова реакція* (ПЛР, PCR – polymerase chain reaction) – це метод специфічної ампліфікації ДНК *in vitro*, за допомогою якого протягом декількох годин можна вибірково розмножити необхідну ділянку ДНК у мільйони разів.

Метод розроблений в 1983 році американським біохіміком фірми «Cetus» Кері Мюллісом і співробітниками. В 1995 році К. Мюлліс був удостоєний Нобелівської премії.

Суть методу ПЛР полягає в повторюваних циклах температурної денатурації ДНК, гібридизації праймерів з комплементарними послідовностями й наступним добуудовуванням полінуклеотидних ланцюгів ДНК–полімеразою. Метод ПЛР дозволяє синтезувати *in vitro* відносно невеликі ділянки ДНК довжиною від декількох десятків до декількох сотень пар нуклеотидів, рідше до 1000-2000 пн, використовуючи як матрицю будь-які зразки ДНК, які містять послідовність, що ампліфікується.

### **3. Особливості ампліфікації ДНК у першому, другому, третьому й наступному циклах ПЛР.**

Для ампліфікації обраного фрагменту ДНК використовують два праймери, комплементарні сайтам на досліджуваній ДНК. Праймери орієнтовані 3'-кінцями назустріч один одному та убік тієї послідовності, яку потрібно ампліфікувати. ДНК-полімераза здійснює синтез взаємно комплементарних ланцюгів ДНК, починаючи із праймерів. При синтезі ДНК праймери фізично вбудовуються в ланцюг молекул ДНК, що

новосинтезуються. Кожна із синтезованих за допомогою одного із праймерів молекул ДНК може бути матрицею для синтезу комплементарної ДНК за допомогою іншого праймера.

#### **4. Детекція ампліфікованої ДНК. Секвенування.**

Секвенування фрагментів ДНК, ампліфікованих у ході ПЛР, дозволяє встановити молекулярно-генетичні особливості структури геному, визначити генетичні взаємовідносини селекційних форм, внутрішньовидову і внутрішньопопуляційну мінливість.

#### **5. Напрями використання ПЛР-аналізу ДНК рослин.**

В аграрних технологіях ПЛР-аналіз має велике значення в селекції для проведення паспортизації сортів, ліній, гібридів і вихідних рослин, упорядкування банку генетичних ресурсів; у насінництві – для контролю чистоти сорту. У біотехнології рослин за допомогою ПЛР можна детектувати наявність мутацій у соматоклональних варіантів; у генній інженерії – визначити ефективність генетичної трансформації.

#### **Контрольні питання:**

1. Дайте визначення: ПЛР, праймер.
2. Суть методу ПЛР.
3. Який матеріал можна використовувати для проведення ПЛР?
4. Які компоненти необхідні для проведення ПЛР?
5. Охарактеризуйте стадії ПЛР.
6. Особливості ампліфікації ДНК у першому, другому, третьому й наступному циклах ПЛР. Що таке довгі та короткі матриці?
7. Які умови проведення ПЛР?

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.
2. Манушкіна Т. М. Основи біотехнології рослин: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» напряму 6.051401 – «Біотехнологія». Миколаїв, 2017. 40 с.
3. Мацкевич В. В., Подгасецький А. А., Філіпова Л. М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2019. 84 с.
4. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин: навч. посіб. Біла Церква: БНАУ, 2010. 135 с.
5. Основи біотехнології рослин : курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. : М. І. Гиль, В. О. Посухін. Миколаїв : МНАУ, 2025. 43 с.
6. Рудик Р. І., Савченко Ю. І., Герасимчук В. І. та ін. «Науково практичні рекомендації по виробництву і заготівлі кормів» / Житомир. ІСГП. 2016. 48 с.
7. Січняк О. Л. Генетика з основами селекції рослин : навч. посіб. / О. Л. Січняк. – Одеса. – Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 190 с.
8. Трохимчук І., Плюта Н., Логвиненко І. Біотехнологія з основами екології. Навчальний посібник. Кондор, 2019. 304 с.

Навчальне видання

## **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН**

Методичні рекомендації

Укладачі:

**Гиль Михайло Іванович**

**Посухін Вадим Олександрович**

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 13,0

Тираж \_\_\_\_ прим. Зам. № \_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкт видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.