

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет агротехнологій

Кафедра землеробства, геодезії та землеустрою

## СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ

**Методичні рекомендації**  
до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня доктора  
філософії на третьому освітньо-науковому рівні  
спеціальності 201 «Агрономія»



**МИКОЛАЇВ**  
**2017**

УДК 606:633/635  
С75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету агротехнологій Миколаївського національного аграрного університету від 02.02.2017 р., протокол № 5.

Укладач:

Т. М. Манушкіна – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри землеробства, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

О. М. Дробітько – канд. с.-г. наук, директор ФГ «Олена» Братського району Миколаївської області;

В. Г. Миколайчук – канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри рослинництва та садово-паркового господарства, Миколаївський національний аграрний університет

**ЗМІСТ**

Вступ.....	4
Правила роботи в біотехнологічній лабораторії.....	6
Модуль I. Біотехнологія рослин як наука.....	8
Контрольні питання до колоквіуму за модулем I. Біотехнологія рослин як наука.....	21
Модуль II. Клітинні технології рослин.....	21
Контрольні питання до колоквіуму за модулем II. Клітинні технології рослин .....	34
Модуль III. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування.....	35
Контрольні питання до колоквіуму за модулем III. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування.....	37
Список рекомендованої літератури.....	38
Додаток А.....	39

## ВСТУП

Біотехнологія – один із пріоритетних напрямів розвитку сучасної біологічної науки, головним завданням якого є використання біологічних процесів, систем і органів у різних галузях, таких як клітинна та генетична інженерія рослин, тварин і людини, використання іммобілізованих ферментів, виробництво антибіотиків, біогазу та ін. Із сучасних методів біотехнології рослин інтенсивно використовуються методи культури клітин, тканин та органів, емріокультури, гаплоїдії і дигаплоїдії, соматональної варіабельності, а також клітинної та генетичної інженерії.

**Завдання дисципліни** – розкрити теоретичні і практичні питання методів біотехнології рослин: культури калусних тканин та суспензійної культури, клітинної селекції, клонального мікророзмноження, культури протопластів та соматичної гібридизації, трансгенезу рослин та ДНК-технологій.

Основною **метою** вивчення біотехнології рослин є засвоєння здобувачами вищої освіти її теоретичних основ і формування практичних навичок, що необхідні для здобувачів ступеня доктора філософії на третьому освітньо-науковому рівні спеціальності 201 «Агрономія».

У результаті вивчення дисципліни «Сучасні методи біотехнології в рослинництві» здобувач ступеня доктора філософії повинен **знати**:

- суть біотехнології рослин як однієї з основних галузей сучасної біотехнології;

- основні методи біотехнології рослин;

- закономірності росту і розвитку ізолюваних клітин, тканин та органів рослин в умовах *in vitro*;

- принципово нові біотехнології в рослинництві;

- методи отримання генетично модифікованих рослин.

Здобувач ступеня доктора філософії повинен **уміти**:

- користуватися навчальною, методичною та науковою літературою з біотехнології;

- підготувати посуд, інструменти і прилади для біотехнологічних досліджень;

- працювати в біотехнологічній лабораторії та використовувати основні методи біотехнології рослин.

**Об'єм** дисципліни складає 90 годин, в тому числі 18 – лекційних, 18 – практичних, 34 – самостійних занять і 20 – консультації.

Розподіл навчального часу за темами практичних занять наведено в табл. 1.

Таблиця 1

### Розподіл навчального часу за темами практичних занять

№ п/п	Теми лабораторних занять	Кількість годин
Модуль I		
1.	Організація і техніка культивування клітин та тканин в умовах <i>in vitro</i>	2
2.	Методи стерилізації під час проведення робіт з культурою ізольованих клітин і тканин рослин	2
3.	Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин	2
4.	Вирощування стерильних паростків сільськогосподарських культур	2
Модуль II		
5.	Отримання і культивування калусної тканини рослин.	2
6.	Субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з різним складом гормонів. Індукція гомогенезу в калусній тканині	2
7.	Зняття ростових характеристик калусної культури. Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини	2
8.	Клональне мікророзмноження рослин. Ізолювання експланту, введення й ініціація його розвитку в умовах <i>in vitro</i>	2
Модуль III		
9.	Принципи та застосування ПЛР (семінар)	2
<b>Усього</b>		<b>18</b>

## ПРАВИЛА РОБОТИ 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, заклавши 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.

# МОДУЛЬ I. БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН ЯК НАУКА

## Практична робота № 1

### Організація і техніка культивування клітин та тканин рослин в умовах *in vitro*

**Мета:** вивчити методичні основи організації робіт у біотехнологічній лабораторії.

#### *Теоретичне обґрунтування*

Основою організації робіт із культури ізольованих тканин і органів рослин є спеціалізований блок, що складається з мийної кімнати, приміщення для стерилізації, кімнати для приготування живильних середовищ, операційної кімнати для роботи зі стерильними культурами, культуральної кімнати і лабораторних приміщень.

#### **1. Приміщення та обладнання біотехнологічної лабораторії**

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
1	2
<b><i>Кімната для миття посуду</i></b>	мийниці з гарячою та холодною водою; дистилятор; бідистилятор; шафи для зберігання посуду; втяжна шафа для роботи з кислотами.
<b><i>Приміщення для стерилізації (автоклава)</i></b>	автоклав; сушильна шафа; шафи для зберігання стерильних матеріалів.
<b><i>Кімната для приготування живильних середовищ</i></b>	лабораторні столи; шафи для зберігання реактивів і посуду; ваги; іонометр; магнітні мішалки; електроплитки; холодильник.



Продовж. табл. 1	
1	2
<b><i>Операційна кімната (бокс)</i></b>	ламінар-бокс; бактерицидні лампи; шафи для зберігання стерильних матеріалів.
<b><i>Культуральна кімната</i></b>	стелажі зі скляними полками і лампами; кондиціонер; зволожувач повітря; качалки для вирощування суспензій; реле часу; термометр; гігрометр.
<b><i>Кліматичні камери</i></b>	стелажі з лампами; система клімат-контролю.
<b><i>Лабораторне приміщення</i></b>	обладнання для біологічних досліджень.

### **Основні правила роботи в асептичних умовах.**

Всі роботи в операційній кімнаті проводяться в спеціальному одязі (халат, косинка або чеpecь, 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.

#### ***Завдання:***

1. Ознайомитися з приміщенням та обладнанням біотехнологічної лабораторії.
2. Визначити основні правила роботи в асептичних умовах.

***Матеріали і обладнання:*** набір мірного й хімічного посуду, пробірки, піпетки, сушильна шафа, ламінар-бокс, автоклав, набір інструментів і матеріалів для роботи в боксі.

#### ***Хід роботи:***

1. Ознайомитися з будовою та обладнанням біотехнологічної лабораторії.
2. Ознайомитися з основними правилами роботи в операційній кімнаті.

## Контрольні питання для самоперевірки

1. Які приміщення включає біотехнологічна лабораторія?
2. Яке обладнання мають містити окремі кімнати біотехнологічної лабораторії?
3. Основні правила роботи в асептичних умовах.

### Практична робота № 2

#### Методи стерилізації під час проведення робіт із культурою ізольованих клітин і тканин рослин

**Мета:** вивчити методи стерилізації обладнання та інструментів, підготовки рослинного матеріалу, операційної кімнати і ламінар-боксів та у процесі приготування живильних середовищ.

#### *Теоретичне обґрунтування*

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 строго 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.

**Стерилізація операційної кімнати.** 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.

**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)* використовується у вигляді 5–7 % розчину для обробки бруньок, зав'язей, квіток, насіння, пагонів протягом 5–8 хвилин.

*Гіпохлорит натрію* використовується у вигляді 0,5–5 % 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).

**Стерилізація вихідного рослинного матеріалу  
(за Р.Г. Бутенко, 1999)**

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

***Завдання:***

1. Вивчити методику стерилізації посуду, інструментів, матеріалів.
2. Ознайомитися із методикою стерилізації операційної кімнати.
3. Розглянути методику стерилізації рослинного матеріалу.

***Матеріали і обладнання:*** набір мірного й хімічного посуду, пробірки, піпетки, сушильна шафа, ламінар-бокс, автоклав, набір інструментів і матеріалів для роботи в боксі.

***Хід роботи:***

1. Ознайомитися з методикою стерилізації посуду, інструментів, матеріалів.
2. Провести стерилізацію посуду, матеріалів, інструментів.
3. Ознайомитися з основними правилами стерилізації операційної кімнати.
4. Розглянути методику стерилізації рослинного матеріалу.

**Контрольні питання для самоперевірки**

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?

### Практична робота № 3

#### Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин

**Мета:** навчитися готувати живильні середовища для культивування рослинних клітин, тканин та органів.

#### Теоретичне обґрунтування

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 піруватдекарбоксілази, бере участь у перетвореннях вуглеводів. Тіамінпірофосфат входить до складу ферментів окисного декарбоксілювання кетокислот (піровиноградної і кетоглутарової), є коферментом транскетолази.

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

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

*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 ембріодів, викликають стан спокою бруньок і насіння, опадання квітів, плодів.

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 рН 5,6–6,0. Іноді як ущільнювач використовують поліакриламідні гелі (біогелі). Для культивування різних типів тканин розроблено живильні середовища. Прописи живильних середовищ, що застосовуються найбільш широко, наведено в додатку А.

### **Завдання:**

1. Вивчити особливості компонентного складу живильних середовищ для культивування рослинних експлантів.

2. Приготувати маточні розчини для середовища Мурасиге і Скуга.

3. Приготувати та простерилізувати середовище Мурасиге і Скуга.

**Матеріали і обладнання:** хімічні склянки, колби, мірні циліндри від 5 мл до 2 л, пробірки, піпетки від 0,01 мл до 10 мл або дозатори, ваги аналітичні, ваги торсійні, пінцети, шпателі, електроплитки, магнітні мішалки, хімічні реактиви, необхідні для приготування розчинів макро- і мікросолей, вітамінів, фітогормонів.



**Хід роботи:**

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 кожен 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; по 100 мл розчину солей у 1 л середовища		<i>Мікросолі МС</i> – 100 мл розчину солей; по 1 мл розчину солей у 1 л середовища	
Реактив	Вага, г	Реактив	Вага, мг
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5	$\text{H}_3\text{BO}_3$	620
$\text{KNO}_3$	19,0	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,33
$\text{CaCl}_2$	3,3	$\text{ZnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	860
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4,2	$\text{KI}$	83
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	25
-	-	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
-	-	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,5

1.2. Приготувати розчин Fe-хелат: на 100 мл розчину беруть  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 557 мг;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$  (натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти або трилон Б) – 745 мг. Наважки розчинити окремо у бідистильованій воді, 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 мл етанолу, підігрівають, додають води до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);

- *цитокініни*: кінетин, зеатин, БАП – розчиняють 100 мг речовини в 2 мл 0,5н  $\text{HCl}$ , підігрівають, 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 НС1 (В<sub>1</sub>), піродиксин (В<sub>6</sub>), ніотинову кислоту (РР), аскорбінову кислоту (С), фолієву кислоту (В<sub>0</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°C не більше двох місяців. Розчини вітамінів, ферментів, рослинних екстрактів зберігають за температури -20°C. 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 бідистилляту 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 НС1.

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 атм (температура 115 – 120 °С) 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 для самоперевірки

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.

### Практична робота № 4

#### Вирощування стерильних проростків сільськогосподарських культур

**Мета:** навчитися вирощувати стерильні проростків сільськогосподарських культур як джерело експлантів для одержання калусу.

#### *Теоретичне обґрунтування*

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.

**Завдання:**

1. Навчитися вирощувати стерильні проростки сільськогосподарських культур.

**Матеріали і обладнання:** насіння сільськогосподарських культур, стерильні чашки Петрі, дно яких вкрите зволоженою ватою, стерильна вода, стерильні хімічні стакани, стерильні пінцети, стерильні марлеві мішечки, 0,1 %-й розчин сулеми, 96 %-ний розчин етилового спирту.

**Хід роботи:**

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.

**Контрольні питання для самоперевірки**

1. Назвіть напрями використання культури стерильних проростків в біотехнології.

2. Як проводити стерилізацію насіння для одержання стерильних проростків?

## **Контрольні питання до колоквиуму за модулем I. Біотехнологія рослин як наука**

1. Предмет і завдання біотехнології рослин.
2. Історія розвитку біотехнології. Зв'язок біотехнології з іншими біологічними та сільськогосподарськими дисциплінами.
3. Значення біотехнології для рослинництва.
4. Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції.
5. Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу.
6. Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин.
7. Методичні основи організації роботи біотехнологічної лабораторії.
8. Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин.
9. Основні компоненти живильних середовищ для культивування рослинних експлантів.
10. Фітогормони рослин.
11. Роль фітогормонів у регулюванні морфогенезу в культурі *in vitro*.
12. Основні прописи живильних середовищ.
13. Послідовність приготування живильного середовища.

## **МОДУЛЬ II. КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН**

### **Практична робота №5**

#### **Отримання і культивування калусної тканини рослин**

**Мета:** навчитися вводити експланти в культуру *in vitro* для отримання калусної тканини рослин.

#### **Теоретичне обґрунтування**

**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 органа. 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.

**Завдання:** 1. Ознайомитися зі способами стерилізації рослинного матеріалу.

2. Навчитися застосовувати методичні прийоми введення експлантів в культуру *in vitro*.

3. Вивчити особливості культивування рослинних тканин в умовах *in vitro*.

**Матеріали і обладнання:** молоді пагони культурних рослин, пробірки з живильним середовищем, чашки Петрі, скальпель, пінцет, спиртівка, етанол, 50 % розчин препарату «Брадофен», хімічні стакани на 200 мл.

### ***Хід роботи:***

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:*

5) 70 %-ний етанол – 40 секунд;

6) промити стерильною дистильованою водою;

7) 50 %-ний розчин препарату «Брадофен» - 12 хв;

8) 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.

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

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

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

### **Контрольні питання для самоперевірки**

1. Що називається калусом? Які функції виконує калусна тканина у рослин в умовах *in vivo*?

2. Назвіть напрями використання культури калусної тканини в біотехнології.

2. Які структурні та функціональні зміни характерні для клітин, переходять до дефіренціації і проліферації?

3. Від яких факторів залежить ефективність одержання калусної тканини

4. В чому суть методики введення експлантів у культуру *in vitro*?

### **Практична робота № 6**

#### **Субкультивування калусної тканини на свіжі живильні середовища з різним складом гормонів. Індукція гомогенезу в калусній тканині**

**Мета:** навчитися проводити субкультивування калусних тканин.

#### **Теоретичне обґрунтування**

**Субкультивування (пасажування)** – перенесення транспланта 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.

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 субкультують на стаціонарній фазі росту кожні 4–6 тижнів. Маса транспланта становить 60–100 мг на 20–40 мл середовища.

**Завдання:** 1. Визначити причини необхідності субкультивування калуса та принципи застосування гормонів у складі живильних середовищ для регулювання морфогенезу в калусній тканині.

2. Провести субкультивування калусних тканин на свіжі живильні середовища з різним складом гормонів.

**Матеріали і обладнання:** калус, що культивується в умовах *in vitro*, пробірки з живильним середовищем, чашки Петрі, скальпель, пінцет, спиртівка, етанол.



### ***Хід роботи:***

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 x 0,5 см, то з пробірки він зразу 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 x 0,5 см, а потім кожну 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.

### **Контрольні питання для самоперевірки**

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?

## **Практична робота № 7**

### **Зняття ростових характеристик калусної культури. Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини**

**Мета:** навчитися знімати ростові характеристики та проводити візуальний і цитологічний аналіз калусних культур.

#### ***Теоретичне обґрунтування***

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 лагфазі (латентній фазі) клітини не діляться, не збільшуються в розмірі, мають низьку метаболічну активність. У 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.

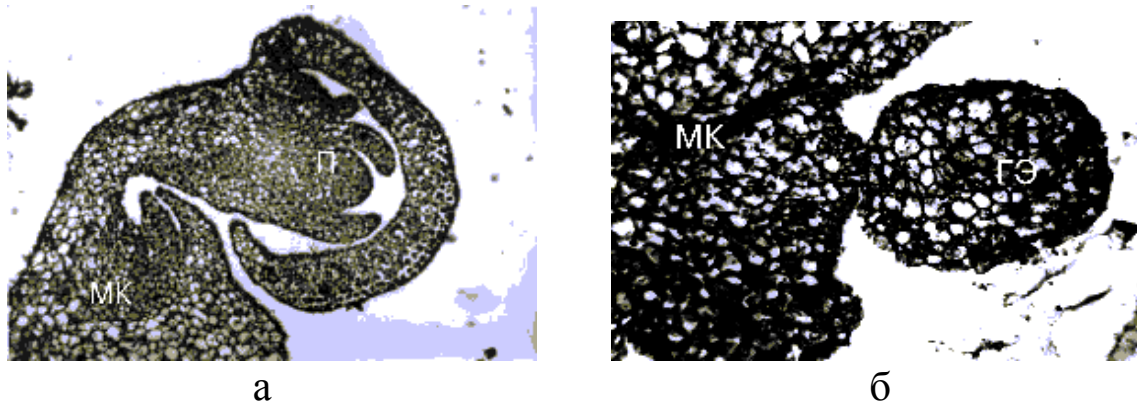
Калусна тканина, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що не має точно визначеної анатомічної структури. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним. Залежно від походження й умов вирощування калусні тканини бувають:

- 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 ограногенезу (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, ГЭ - 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.

**Завдання:**

1. Ознайомитися з особливостями росту калусу впродовж культивування в умовах *in vitro*.
2. Провести візуальний аналіз калусу.
3. Зняти ростові характеристики калусної культури.
4. Освоїти методику цитологічного аналізу калусу.

**Матеріали і обладнання:** калус, що культивується в умовах *in vitro*, ваги, ацетокармін чи інший вітальний барвник, чашки Петрі, скальпель, пінцет, спиртівка, етанол, предметні та покривні скельця, фільтрувальний папір, мікроскоп біологічний.

**Хід роботи:**

1. Провести візуальний аналіз калусних культур. Описати колір калуса, його консистенцію, наявність на поверхні новоутворень і некротичних ділянок. Заповнити табл. 1.

Таблиця 1

**Візуальний аналіз калусних культур різних видів рослин**

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

2. Побудувати графік росту калусу. Зважити по 5 калусів одного виду рослин через 1-2-3-4 тижні культивування, результати зважування занести до табл. 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

Визначити середні показники для кожного тижня і побудувати графік росту калусу.

3. Визначити ростовий індекс 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 табл. 2, розрахувати ростовий індекс калусу для кожного зразка з пешого по третій тиждень. Обробити результати методом описової статистики (Лакін, 1980). Визначити середнє арифметичне ( $M$ ) за формулою

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

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

4. *Визначити число клітин на одиницю маси тканини або на калус.* 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<sup>0</sup>С у термостаті. Підрахунок клітин ведеться в камері Фукса-Розенталя.

5. *Приготувати давлений препарат калусної тканини.* Помістити на предметне скло невеликий (не більше 2-3 мм) шматочок калусу і акуратно роздавити його плоскою поверхнею скальпеля. Піпеткою нанести на нього 1-2 краплі ацетокарміну чи іншого вітального барвника. За необхідності предметне скло підігріти на полум'ї спиртівки, не доводячи до кипіння. Відкласти на 5 хвилин для фарбування. Після цього нанести одну краплю гліцерину і накрити калус покривним склом, на яке покласти шматочок фільтрувального паперу, злегка надавити на нього для розпластання клітин.

6. *Провести цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини.* Помістити готовий препарат під мікроскоп і роздивитися при малому збільшенні. Звернути увагу на наявність клітин різної форми і розмірів. Виділити основні групи клітин за розміром і формою. Розглянути окремі типи клітин при великому збільшенні (об'єktiv 40 х). Звернути увагу на характер розміщення цитоплазми і ядра, наявність вакуолей. Провести підрахунок клітин різної форми в 5 полях зору мікроскопа, дані занести в табл. 3.

### Цитологічний аналіз давленого препарату калусної тканини

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

Замалювати визначені типи клітин. Зробити висновок щодо наявності в калусній тканині диференційованих клітин та можливості морфогенезу.

#### Контрольні питання для самоперевірки

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?

#### Практична робота №8

#### Клональне мікророзмноження рослин. Ізолювання експланту, введення та ініціація його розвитку в умовах *in vitro*

**Мета:** оволодіти методикою ізолювання і введення апікальних меристем рослин у культуру *in vitro* та мікроживцювання пагонів рослин-регенерантів.

#### Теоретичне обґрунтування

**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**:

- а) виникнення організованих структур безпосередньо із спеціалізованих тканин експланту (тканин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листка);
- б) з первинного калусу, утвореного клітинами експланту;
- в) 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 [14].

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*.

**Завдання:**

1. Вивчити методологічні основи клонального мікророзмноження (типи, методи, основні етапи).

2. Ізолювати і ввести апікальні меристеми рослин у культуру *in vitro*.

**Матеріали і обладнання:** ламінар-бокс, бінокулярний мікроскоп МБС-10, спиртівка, чашки Петрі, пінцети, скальпелі, голкотримачі з лезом, препарувальні голки, очні скальпелі, етанол, стерилізуючі розчини, пробірки з живильним середовищем, пробірки з мікророслинами, пагони рослин (етиольовані проростки картоплі, пагони лаванди, герані та ін.).

### ***Хід роботи:***

1. *Підготувати до роботи ламінар-бокс.* На його робочій поверхні розмістити мікроскоп МБС-10, пробірки з живильним середовищем, спиртівку, необхідні матеріали, інструменти. Всі поверхні в ламінар-боксі протерти 96%-ним етанолом. На 2 години включити бактерицидний фільтр і ультрафіолетову лампу. (Підготовчі операції до заняття виконуються лаборантом).

2. *Підготувати рослинний матеріал.* 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.

5. *Провести 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.

4. *Обробити руки й робочу поверхню ламінар-боксу 70%-ним етанолом.*

Інструменти помістити 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.

5. *Виділити (ізолювати) та експлантувати на живильне середовище меристеми.* Операція проводиться під мікроскопом МБС-10 (збільшення 16х). За допомогою леза голкотримача видалити з бруньки верхні покривні листочки, послідовно оголюючи меристему з 1-2 листовими примордіями, а потім зрізати меристему біля основи. Ізольовану меристему на кінчику леза перенести в



пробірку і розмістити на поверхні живильного середовища. Ватно-марлеву пробку і краї пробірки злегка обпалити в полум'ї спиртівки й закрити пробірку. Виділити в такий спосіб кілька меристем різних розмірів – 0,3, 0,5, 0,8 і 1мм з 1-3 листковими примордіями і помістити їх на живильні середовища.

6. *Культивування меристем.* Пробірки з меристемами підписати, установити в штатив і перенести для вирощування в культуральну кімнату з температурою +26°C, відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 2-3 тис. лк із 16-годинним фотоперіодом.

7. *Аналіз результатів.* Через 2-4 тижні культивування результати замалювати. Зробити біометричний аналіз мікророслин, що регенерували з меристем різних розмірів, заповнивши табл. 1.

Таблиця 1

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

№ пробірки	Висота рослини, мм	Кількість пагонів, шт.	Наявність калусу
Експланти розміром 0,3 мм			

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

### Контрольні питання для самоперевірки

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*?

## **Контрольні питання до колоквіуму за модулем II. Клітинні технології рослин**

1. Калусогенез як основа створення клітинних культур.
2. Дедиференціювання та калусоутворення *in vitro*.
3. Методика одержання калусних культур.
4. Сомаклональна варіабельність.
5. Методи клітинної селекції.
6. Особливості індукованого мутагенезу *in vitro*.
7. Тотипотентність рослинних клітин.
8. Основні механізми регенерації рослин.
9. Типи вторинної диференціації та морфогенезу.
10. Індукція морфогенезу за допомогою фітогормонів.  
Отримання рослин-регенерантів.
11. Завдання та переваги клонального мікророзмноження.
12. Типи та основні етапи клонального мікророзмноження.
13. Одержання безвірусного садивного матеріалу.
14. Методи криозберігання. Банки генетичних ресурсів.
15. Одержання протопластів. Культивування протопластів.
16. Регенерація рослин з протопластів.
17. Соматична гібридизація.
18. Типи соматичних гібридів та їх характеристика.
19. Аналіз соматичних гібридів.
20. Практичне застосування соматичної гібридизації.
21. Методика введення експлантів у культуру *in vitro*.
22. Стерилізація рослинного матеріалу.
23. Методичні прийоми введення експланту в культуру *in vitro*.
24. Особливості культивування рослинних тканин в умовах *in vitro*.
25. Методика субкультивування калусних тканин.
26. Методика морфологічного аналізу калусних культур.

## МОДУЛЬ III. МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ: ПРИНЦИПИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

### Практична робота № 9

#### ПЛР: принципи та застосування (семінар)

**Мета:** вивчити принципи та напрями застосування полімеразної ланцюгової реакції.

#### *Теоретичне обґрунтування*

У цей час селекція рослин, традиційно заснована на гібридизації й доборі, збагачена новими методами біотехнології й генної інженерії. Сукупність цих методів дозволяє одержувати значне різноманіття вихідного матеріалу і створювати нові організми з направлено 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.

Для ампліфікації вибраного фрагмента ДНК використовують два *праймера*, комплементарних 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.

**Суть методу ПЛР** полягає в повторюваних циклах температурної денатурації ДНК, гібридизації праймерів з комплементарними послідовностями й наступним добудовуванням

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.

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

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 до семінару**

1. Структура ДНК та її елементів.
2. Дайте визначення: ПЛР, праймер.
3. Суть методу ПЛР.
4. Який матеріал можна використовувати для проведення ПЛР?
5. Які компоненти необхідні для проведення ПЛР?
6. Охарактеризуйте стадії ПЛР.
7. Особливості ампліфікації ДНК у першому, другому, третьому й наступному циклах ПЛР. Що таке довгі та короткі матриці?
8. Умови проведення ПЛР.
9. Детекція ампліфікованої ДНК. Секвенування.
10. У чому суть дидезоксинуклеотидного методу?
11. Опишіть послідовність проведення секвенування дидезокси-нуклеотидним методом.
12. Напрями використання ПЛР-аналізу ДНК рослин.
13. Чим викликана необхідність проведення паспортизації сортів, ліній і гібридів?
14. Що таке дендрограма?
15. З якою метою проводиться картування генів?
16. Підходи до розробки тест-систем на основі ПЛР для виявлення трансгенів у генетично модифікованих організмах.

## **Література для підготовки до семінару**

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. 2002. 596 с.
2. ДНК–технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В. И. Глазко, Е. В. Шульга, Т. Н. Дымань, Г. В. Глазко. Белая Церковь, 2001. 488 с.
3. Использование ПЦР–анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю. М. Сиволапа. Киев : Аграрна наука, 1998. 156с.
4. Мельничук М. Д., Новак Т. В. , Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підруч. Київ. : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.

### **Контрольні питання до колоквиуму за модулем III. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування.**

1. Молекулярні основи спадковості. Транскрипція генів еукаріотів. Гени рослин.
2. Плазмідні. Способи перенесення генів у реципієнтні клітини.
3. Ідентифікація рекомбінантних клонів.
4. Експресія трансформованих генів і способи її оптимізації.
5. Стан та перспективи генно-інженерних досліджень у рослинництві.
6. Методи імунодіагностики.
7. Молекулярно-генетичні маркери.
8. ПЛР: принципи та застосування.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

### ОСНОВНА ЛІТЕРАТУРА

1. Генетично модифіковані рослини: перспективи і проблеми. За редакцією Роїка М. В. Київ, 2003. 156 с.
2. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підруч. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
3. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин : навч. посіб. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.
4. Завірюха П. Д., Неживий З. П. Сільськогосподарська біотехнологія: клітинна інженерія рослин. Методичні рекомендації до лабораторно-практичних занять та самостійної аудиторної та поза аудиторної роботи студентів факультету агротехнологій і екології спеціальностей 6.090101 «Агрономія», «Плодоовочівництво і виноградарство», 6.040106 «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування». Львів, 2009. 83 с.
5. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. 84 с.

### ДОПОМІЖНА ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. 2002. 488 с
2. Пузік В. К., Попов В. М., Сергеев В. В. Атлас з біотехнології рослин : навч. посіб. Харків, 2009. 28 с.
3. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ : Логос, 2012. 428 с.
4. Дубровна О. В., Моргун Б. В., Бавол А. В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.

**Живильні середовища для культивування тканин рослин**

Компоненти	Концентрація в живильному середовищі, мг/л			
	Мурасиге і Скуга	Гамборга	Уайта	Шенка и Хільдебрандта
Макросолі				
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	-	-	-
$\text{KNO}_3$	1900	2500	80	2500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	-	200
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	-	400
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134	-	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	300
$\text{MgSO}_4$	-	-	360	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	-	-	200	-
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	-	200	-
KCl	-	-	65	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	-	-	16.5	-
Мікросолі				
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3,0	1,5	5,0
$\text{MnSO}_4$	-	-	4,5	-
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	-	2,5	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,02	0,2
$\text{ZnSO}_4$	-	-	1,5	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,0025	0,1
KJ	0,83	0,75	0,75	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	-	-	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	-	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	-	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	10,0	-	-
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	28,0	-	15,0
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	-	-	20,0
Вітаміни и БАВ				
Тіамін-НСІ	0,1	10,0	0,1	5,0
Піридоксин-НСІ	0,5	1,0	0,1	0,5
Нікотинова кислота	0,5	1,0	0,5	5,0
Мезоінозит	100	100	-	1000
Гліцин	2,0	-	3,0	-
ІОК	2,0	-	-	-
Кінетин	0,2	-	-	0,1
2,4Д	-	2,0	-	0,5
ПХУ	-	-	-	20
Сахароза	30000	20000	20000	30000
Агар-агар	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%

Навчальне видання

# СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ У РОСЛИННИЦТВІ

Методичні рекомендації

Укладач: **Манушкіна** Тетяна Миколаївна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 2,5.  
Тираж 50 прим. Зам. № \_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету  
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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