

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет агротехнологій

Кафедра землеробства, геодезії та землеустрою

## **ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ**

**Методичні рекомендації**

до виконання практичних робіт для здобувачів вищої освіти  
ступеня «бакалавр» спеціальності 201 «Агрономія»  
денної форми навчання



**МИКОЛАЇВ  
2017**

УДК 606:633/635  
О-75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету агротехнологій Миколаївського національного аграрного університету від 23.02.2017 р., протокол № 6.

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;

О. А. Коваленко – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри рослинництва та садово-паркового господарства, Миколаївський національний аграрний університет

**ЗМІСТ**

Вступ	4
Основні терміни біотехнології рослин	5
Модуль I. Біотехнологія рослин як наука	6
Контрольні питання до колоквіуму за модулем I. Біотехнологія рослин як наука	17
Модуль II. Клітинні технології для вирішення теоретичних питань і практичних завдань рослинництва і селекції	17
Контрольні питання до колоквіуму за модулем II. Клітинні технології для вирішення теоретичних питань і практичних завдань рослинництва і селекції	33
Модуль III. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування	34
Контрольні питання до колоквіуму за модулем III. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування	36
Список рекомендованої літератури	37
Додаток А	38

## 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 в рослинництві 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, трансгенозу рослин та ДНК-технологій.

Основною **метою** вивчення біотехнології рослин є засвоєння студентами її теоретичних основ і формування практичних навичок, що необхідні для формування висококваліфікованих сучасних фахівців сільського господарства.

У результаті вивчення дисципліни «Біотехнологія в рослинництві» студент повинен **знати**:

- суть біотехнології як однієї з основних галузей сучасної біології;
- основні методи біотехнології;
- закономірності росту і розвитку ізолюваних клітин, тканин та органів рослин в умовах *in vitro*;
- принципово нові біотехнології в сільському господарстві;
- методи отримання трансгенних рослин.

Студент 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.

## ОСНОВНІ ТЕРМІНИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

**Клітинна інженерія** – метод отримання нових рослин шляхом маніпуляцій з клітинами.

**Генетична (генна) інженерія** - метод отримання нових рослин шляхом маніпуляцій з генами.

**Клональне мікророзмноження** – одержання в культурі *in vitro* нестатевим шляхом рослин (найчастіше з апікальної меристеми), генетично ідентичних вихідній рослині.

**In vitro** – вирощування живого матеріалу у склі, на штучних живильних середовищах в асептичних умовах.

**Диференціювання** – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між материнськими та дочірніми клітинами, стан спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших. Проявляється морфологічними, фізіологічними і біохімічними змінами клітин.

**Дедиференціювання** – перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації, яка призводить до втрати більшості ознак спеціалізації.

**Експлант** – фрагмент тканини або органа, що використовується для вирощування *in vitro* самотійно або для одержання первинного калусу.

**Калус** – тканина, що виникла внаслідок дедиференціації та неорганізованої проліферації клітин на поверхні рани.

**Морфогенез** – виникнення та розвиток спеціалізованих клітин, органів і частин організму.

**Органогенез** – процес виникнення *de novo* у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів (коренів і пагонів).

**Гемогенез** – утворення (диференціація) бруньок калусними клітинами.

**Гіногенез** – процес формування рослин із клітин зародкового мішка.

**Ризогенез** – утворення коренів.

**Субкультивування (пасажування) експланта** – перенесення експланта, калусу, рослини-регенеранта на свіже живильне середовище.

**Цикл вирощування (пасаж)** – період між двома субкультивуваннями.

**Трансгенна рослина** – рослина, що містить у своєму геномі чужорідний рекомбінантний ген (гени).

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

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

**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. Вивчити методику стерилізації приміщень, посуду, інструментів, матеріалів.
3. 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. Під керівництвом викладача освоїти принципи роботи автоклаву, сушильної шафи, дистильатора.
3. Провести стерилізацію посуду, матеріалів, інструментів.
4. Ознайомитися з основними правилами роботи в операційній кімнаті.

## **Контрольні питання для самоперевірки**

1. Які приміщення та обладнання має містити біотехнологічна лабораторія?
2. Які правила миття та стерилізації посуду?
3. Як стерилізують матеріали для роботи з культурою тканин рослин?
4. Які інструменти використовуються для операцій з рослинними експлантами? Правила їх стерилізації.
5. Яка методика стерилізації операційної кімнати біотехнологічної лабораторії?
6. Які речовини застосовують для стерилізації рослинного матеріалу?
7. Від яких чинників залежить концентрація речовин та експозиція стерилізації рослинного матеріалу?
8. Основні правила роботи в асептичних умовах.

## **Практична робота № 2**

### **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).

*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).



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

*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<sub>1</sub>)* входить до складу піруватдекарбоксилази, бере участь у перетвореннях вуглеводів. Тіамінпірофосфат входить до складу ферментів окисного декарбоксилювання кетокислот (піровиноградної і кетоглутарової), є коферментом транскетолази.

*Піридоксин (В<sub>6</sub>)* у вигляді фосфорнокислого ефіру входить до складу ферментів декарбоксилювання і переамінування амінокислот.

*Нікотинова кислота (РР)* у вигляді амідів входить до складу дегідрогеназ НАД і НАДФ, що каталізують донорно-акцепторний ланцюг Н<sup>+</sup> (відбирання Н<sup>+</sup> 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 – α-нафтилоцтова кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова 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**

<b>Макросолі МС – 1 л розчину солей; по 100 мл розчину солей у 1 л середовища</b>		<b>Мікросолі МС – 100 мл розчину солей; по 1 мл розчину солей у 1 л середовища</b>	
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	КІ	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  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 557 мг;  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової 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 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*:  $\text{ГК}_3$  – розчиняють у воді;

- *абсцизини*: АБК – розчиняють у 3 мл 70 % етанолу, доводять водою до потрібного об'єму.

1.4. Приготувати розчини вітамінів  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_6$  і РР у концентрації 1 мг/мл.

Розчини вітамінів: тіамін  $\text{HCl}$  ( $\text{B}_1$ ), піродиксин ( $\text{B}_6$ ), нікотинову кислоту (РР), аскорбінову кислоту (С), фолієву кислоту ( $\text{B}_9$ ), біотин (Н), параамінбензойну кислоту, Са – пантотенат, ціанкобаламін ( $\text{B}_{12}$ ), рибофлавін ( $\text{B}_2$ ) – розчиняють в бідистильованій воді (концентрація 1 мг/мл, або 0,1 мг/мл).

Маточні розчини зберігають у посудинах із притертими пробками в холодильній камері за температури  $0 \dots +4^\circ\text{C}$  не більше двох місяців. Розчини вітамінів, ферментів, рослинних екстрактів зберігають за температури  $-20^\circ\text{C}$ . 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 бідистиляту і додати макросолей МС – 100 мл; мікросолей МС – 1 мл; Fe-хелату – 5 мл;  $\text{B}_1$  – 1 мг;  $\text{B}_6$  – 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  $\text{KOH}$  або 1н  $\text{HCl}$ .

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 до 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.



## **Контрольні питання до колоквіуму 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 ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ТЕОРЕТИЧНИХ ПИТАНЬ І ПРАКТИЧНИХ ЗАВДАНЬ РОСЛИННИЦТВА ТА СЕЛЕКЦІЇ**

### **Практична робота №3**

**Отримання і культивування калусної тканини рослин.**

***Колоквіум за модулем I. Тестування.***

**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:*

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.

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 дефференціації і проліферації?

3. Від яких факторів залежить ефективність одержання калусної тканини

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

### **Практична робота № 4** **Субкультивування калусної тканини на свіжі живильні** **середовища з різним складом гормонів.**

**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 № 5

### Зняття ростових характеристик калусної культури.

**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.

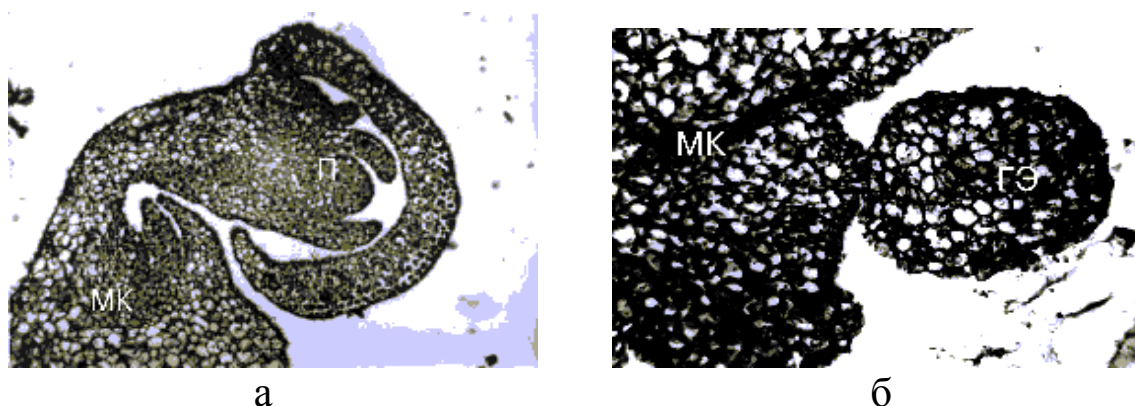
Калусна тканина, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що не має точно визначеної анатомічної структури. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним. Залежно від походження й умов вирощування калусні тканини бувають:

- 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 калусу, 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 °C 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 x). 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.

Таблиця 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 №6 Клональне мікророзмноження рослин

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

### **Теоретичне обґрунтування.**

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

Залежності 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 листковими 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*.

3. Провести мікроживцювання пагонів рослин-регенерантів та їх субкультивування на свіже живильне середовище.

**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:***

#### ***Ізолювання експланту, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro****

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 листовими 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 замальовати. 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.

### ***Власне мікророзмноження***

1. *Підготувати до роботи ламінар-бокс, інструменти (пінцет, скальпель), пробірки з мікророслинами.*

2. *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°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 2.

Таблиця 2

### Біометричний аналіз мікророслин

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

За даними табл. 2 визначити приживлюваність мікропагонів, частоту регенерації мікророслин. Зробити висновок про розвиток мікророслин.

### 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. Назвіть основні етапи клонального мікророзмноження.

6. Які особливості ізолювання та введення апікальних меристем у культуру *in vitro*?

6. Опишіть методику мікроживцювання пагонів рослин-регенерантів.

**Практична робота № 7**  
**Культура ізольованих зародків рослин *in vitro*.**  
***Колоквіум за модулем II. Тестування.***

**Мета:** освоїти методику ізолювання і введення зародків рослин у культуру *in vitro*.

***Теоретичне обґрунтування.***

**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.

***Завдання:***

1. Визначити завдання, що вирішуються за допомогою ембріокультури.
2. Провести ізолювання і введення зародків рослин у культуру *in vitro*.

***Матеріали і обладнання:*** мікроскоп МБС-10, спиртівка, пінцети, скальпелі, чашки Петрі, вата, етанол, пробірки з живильним середовищем, недозріле насіння рослин.

***Хід роботи:***

1. Провести гібридизацію (проводиться заздалегідь лаборантом).
2. Підготувати до роботи ламінар-бокс.
2. Відібрати і простерилізувати рослинний матеріал. Через 11-20 днів після запилення на торпедоподібній стадії розвитку зародка недозріле насіння відокремити від суцвіть і провести його

поверхневу стерилізацію в ламінар-боксі 50% розчином препарату «Брадофен» протягом 10-12 хв. Потім матеріал промити у трьох змінах стерильної дистильованої води.

3. *Ізолювати гібридні зародки.* 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 зробити невеликий надріз покривів, розсунути їх препарувальною голкою й ізолювати зародок разом з ендоспермом.

4. *Експлантація зародків на живильне середовище.* Ізольований зародок на кінчику препарувальної голки перенести на живильне середовище, закрити пробірку пробкою, підписати й помістити у культуральну кімнату.

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

6. *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. Провести біометричний аналіз рослин на 30-й день культивування, заповнивши табл. 1.

Таблиця 1

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

№ пробірки	Висота проростка, мм	Кількість листків, шт.	Кількість коренів, шт.

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

**Контрольні питання для самоперевірки**

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?



**Контрольні питання до колоквиуму за модулем II.  
Клітинні технології для вирішення теоретичних питань  
і практичних завдань рослинництва та селекції**

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 кріозберігання. 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 № 8

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

#### *Колоквіум за модулем III. Тестування.*

**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 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.

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 добуванням 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. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 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. – К. : Аграрна наука, 1998. – 156с.
4. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин : підруч. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : 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. Плазмідни. 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

1. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 596 с.
2. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. думка, 1980. – 486 с.
3. Калинин Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая. – Киев, 1992. – 232 с.
4. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин : підруч. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
5. Мусієнко М. М. Біотехнологія рослин : навч. посіб. / М. М. Мусієнко, О. О. Панюта – К. : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. – 114 с.
6. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. / Н. С. Задерей. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. – 84 с.

**Живильні середовища для культивування тканин рослин**

Компоненти	Концентрація в живильному середовищі, мг/л			
	Мурасиге і Скуга	Гамборга	Уайта	Шенка и Хільдебрандта
Макросолі				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	80	2500
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	440	150	-	200
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	370	250	-	400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	-	150	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	300
MgSO <sub>4</sub>	-	-	360	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	200	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	200	-
KCl	-	-	65	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	16.5	-
Мікросолі				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,0	1,5	5,0
MnSO <sub>4</sub>	-	-	4,5	-
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	2,5	-
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,02	0,2
ZuSO <sub>4</sub>	-	-	1,5	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,0025	0,1
KJ	0,83	0,75	0,75	1,0
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	-	0,1
ZuSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,6	2,0	-	1,0
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	-	10,0	-	-
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8	28,0	-	15,0
Na <sub>2</sub> ЭДТА x 2H <sub>2</sub> 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

# ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ В РОСЛИННИЦТВІ

Методичні рекомендації

Укладач: **Манушкіна** Тетяна Миколаївна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 2,75.  
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.

