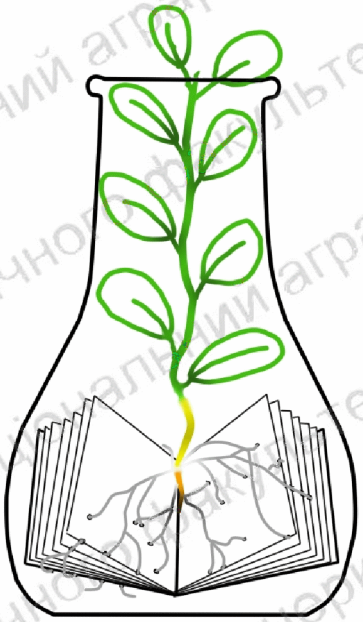
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій):

науково-практичний посібник

Біла Церква

2019

УДК 602.7:582.5/.9
М 36

Рекомендовано науково-методичною
комісією Білоцерківського
національного аграрного університету
(протокол № 8 від 04.04. 2019 р.)

Укладачі: **Мацкевич В. В.,** канд. с.-г. наук;
Подгаєцький А. А., д-р с.-г. наук;
Філіпова Л. М., канд. с.-г. наук.

Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М.
М 36 Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. Біла Церква: БНАУ, 2019. 85 с.

Представлено протоколи технологій культивування *in vitro* поширених декоративних, лісових та сільськогосподарських рослин.

Рекомендовано здобувачам вищих навчальних закладів денної та заочної форм навчання за кредитно-трансферною системою організації навчального процесу, які навчаються за спеціальностями «Лісове господарство», «Садово-паркове господарство», «Біотехнологія та біоінженерія», «Агрономія» з вивчення дисципліни «Основи біотехнології рослин», а також науково–педагогічним працівникам, аспірантам, працівникам біотехнологічних лабораторій.

Рецензенти:
Троценко В. І., д-р с.-г. наук, професор, завкафедри рослинництва, Сумський національний аграрний університет;

Кубрак С. М., канд. с.-г. наук, доцент кафедри генетики, селекції і насінництва сільськогосподарських культур, Білоцерківський національний аграрний університет.

М 36
ISBN 978-966-2122-8

© Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А.,
Філіпова Л. М., 2019

ЗМІСТ

Вступ			4
I.	ЗАГАЛЬНІ ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ		5
	1.1.	Асептика	5
	1.2.	Фітобіотехнологічний менеджмент	8
	1.3.	Функціональні сектори лабораторії	9
	1.4.	Штучні живильні середовища	12
	1.5.	Введення експлантів *in vitro*. Культура меристем	15
		1.5.1. Введення в асептичну культуру рослинних об'єктів	15
		1.5.2. Культ ура меристем	19
	1.6.	Фітогормони	20
	1.7.	Мікроклональне розмноження рослин	22
	1.8.	Постасептична адаптація рослин-регенерантів	25
II.	ПРОТОКОЛИ ТЕХНОЛОГІЙ МКР ТА ПОСТАСЕПТИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ		27
	2.1.	Хоста	27
	2.2.	Агапантус	36
	2.3.	Туя західна	37
	2.4.	Картопля	38
	2.5.	Малина	43
	2.6.	Ожина	47
	2.7.	Актинідія	51
	2.8.	Алича, слива персик, підщепи персика	54
	2.9	Павловнія	60
	2.10	Часник	74
Література			83

ВСТУП

Перші методи мікроклонального розмноження (МКР) було розроблено понад століття тому. Сьогодні МКР комерціолізоване для багатьох культур. Часто розробка технологічного протоколу потребує тривалого часу. Сучасний ритм економіки вимагає швидкого реагування лабораторій *in vitro* на попит ринку. Тому актуальними є готові протоколи розмноження конкретних культур. Це дозволяє підприємцям-виробникам уникнути витрат коштів і часу на дослідження.

Перші спроби подання подібних протоклів представлено у монографії А. А. Подгаєцького з співавторами «Особливості мікроклонального розмноження видів рослин. У зв'язку з попитом на таку інформацію розділ монографії «Протоколи мікроклонального розмноження…» [1] оновлено, розширено і пропонується до друку окремо для практичного використання як у навчальних закладах, так і в умовах виробництва.

Дана праця може бути корисною як для підприємців, науковців, так і для початківців у МКР.

І. ЗАГАЛЬНІ ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

1.1. Асептика[1]

Дослідження у галузі біотехнології та виробництва продукції вимагають особливих умов, які можливо створити лише у спеціалізованих лабораторних приміщеннях. Оскільки дослідження та виробництво переважно проходять в асептичних умовах, це визначає основні вимоги до організації робіт, оснащення приміщень та проведення стерилізації. Необхідність ретельної стерилізації обумовлена тим, що на штучних поживних середовищах, які використовують для культивування ізольованих органів тканин та протопластів, одночасно добре ростуть і мікроорганізми (гриби, бактерії та ін.). Розвиток цих організмів створює подвійну небезпеку для клітин і тканин, які культивуються *in vitro*. По-перше, в результаті життєдіяльності мікроорганізмів може суттєво змінитися склад поживного середовища, що зробить неможливим вирощування клітин у заданих стабільних умовах. Наприклад, інфіковані дріжджами живильні середовища погано загусають і стають токсичними для рослинних об′єктів уже через 48 годин. Токсичність не зникає навіть після автоклавування середовища. По-друге, ізольовані від рослини тканини і клітини легко пошкоджуються мікроорганізмами.

Асептичні умови досягають такими методами стерилізації:

- стерилізація високими температурами (полум’ям);
- обробка сухим жаром;
- автоклавування;
- фільтрування повітря та розчинів;
- застосування бактерицидного опромінення

[1] **Асе́птика** (грец.α – не і *σηπτικος* – гнійний) – сукупність заходів, спрямованих на попередження інфікування збудниками інфекції (бактерії, грибки) середовища, рослинних об’єктів та всього, що їх оточує.

- стерилізація розчинами антисептиків[2].

Враховуючи те, що у природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, бактерій, їх спор, рослинний матеріал стерилізують *розчинами антисептиків.* Їх у біотехнологічній практиці найчастіше застосовують під час одержання стерильного рослинного матеріалу. Це складне завдання, тому що необхідно нейтралізувати мікрофлору і не пошкодити рослинну тканину. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини, які не проникають у тканину і легко змиваються водою:

- 70 % етиловий спирт (занурюють насіння − на 2−3 хв, меристеми листя − на 0,5−1 хв);
- препарати з активним хлором (гіпохлорит натрію – комерційний препарат Білизна розводять дистильованою водою у співвідношенні 1:3);
- препарат Бланідас 300 (діюча речовина – дихлорізоціанурова кислота);
- біоцид PPM (Plant Preservative Mixture), у склад якого входять діючі речовини 5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone і 2-methyl-3(2H)- isothiazolone [1, 2];
- ртутні препарати (0,2−0,5 % розчин сулеми, діоцид, фапосепт);
- 5−20 % розчин перекису водню;
- 0,5−2 % розчин нітрату срібла (азотнокисле срібло).

Для підвищення стерилізуючого ефекту в розчини інколи додають незначну кількість емульгатора, наприклад, Твін-80 або Твін-200 (1 крапля на 100 мл розчину).

---

[2]**Антисептик** – будь-яка речовина, що перешкоджає росту мікроорганізмів, зокрема бактерій. На відміну від антисептиків, сполуки, які викликають загибель мікророоргані змів, називаються дезінфікуючими або бактерицидними (фунгіцидними) засобами. Речовини залежно від концентрації, часу дії, температури та інших умов мають ті чи інші властивості, тому в ужитку ці терміни використовують як синоніми. Проте антисептиками обробляють рослинні об'єкти та предмети, що їх оточують (інструмент та ін.), не запобігаючи їх небезпеці для живих тканин, а дезіфінкуючими засобами обробляють неживі об'єкти. Повне знищення всіх мікроорганізмів та їх спор називається *стерилізацією.*

Час стерилізації визначають експериментально, залежно від обраної стерилізуючої речовини та об'єкта стерилізації. З метою видалення з тканин цієї речовини, промивку експланта проводять чотири рази із періодом експозиції 15 хв. У разі порушення режиму відбувається отруєння культури, що призводить до гальмування ростових процесів або повної загибелі рослин.

Розчини антисептиків (переважно гіпохлорит натрію) застосовують для дезінфекції приміщень (миття поверхонь). Використовуючи етанол як антисептик, дезінфікують поверхні ламінар-боксів, прилади, інструменти.

Стерилізація *високими температурами* у полум'ї ефективна завдяки тому, що високі температури знищують майже всі мікроорганізми під час прожарювання. Застосовується для обробки поверхонь інструментів (ланцети, голки, бактеріологічні петлі) та культуральних ємкостей.

Стерилізація сухим жаром проводиться у сушильних шафах за температури 160–165 °С протягом двох годин. Цим методом стерилізують лабораторний посуд, металеві предмети.

Стерилізація нагрітою водяною парою під тиском відбувається під час *автоклавування*. Цей метод термічної стерилізації поживних середовищ, рідин та різноманітних предметів здійснюється з використанням парових стерилізаторів (автоклавів) із насиченою водяною парою за умов надлишкового тиску 0,11 МПа і температури 120 °С, або 0,20 МПа і температури 132 °С.

Розчини, які розкладаються під час термічної обробки, стерилізують за допомогою спеціальних *мікрофільтрів* із порами діаметром 0,22 мкм (рис.1).

Щоб уникнути потрапляння мікроорганізмів та їх спор у ламінарні шафи, працюють за постійного потоку повітря, яке нагнітається через фільтри і не дозволяє завислим у повітрі мікроорганізмам та їх спорам опускатися на робочу поверхню боксу.

Рис. 1. **Мікрофільтр для стерилізації розчинів:** 1 – мікрофільтр у стерильній упаковці; 2 – мікрофільтр і шприц перед фільтруванням.

Для знищення мікроорганізмів та їх спор у повітрі застосовують бактерицидну обробку приміщень спеціальними *бактерицидними лампами*. Вони призначені для знезараження приміщень від мікроорганізмів. Їх широко застосовують у медицині і промисловості для знезараження повітря, води, продуктів харчування. Бактерицидні лампи низького тиску типу ДБ є джерелом ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 253,7 нм, яке має сильну бактерицидну дію.

1.2. Фітобіотехнологічний менеджмент

Комерційні біотехнологічні лабораторії займаються виробництвом з використанням двох основних груп методів:

- *селекційні* (трансгенні і нетрансгенні методи);
- *культура тканин* (оздоровлення та клональне мікророзмноження).

Лабораторії з мікроклонального розмноження можуть спеціалізуватися на отриманні безвірусних, сортотипових ліній з діагностикою на наявність патогенів та ідентичності матеріалу найсучаснішими методами (ПЛР тощо). Як правило, такі вихідні рослини супроводжують відповідними документами. Ряд лабораторій спеціалізується на масовому клонуванні і часто реалізації вже готового посадкового матеріалу.

Групи лабораторних методів селекційного та вегетативного розмноження *in vitro* можуть переплітатися між собою або доповнювати один одного, і відповідно, формувати різні напрями як наукової, так і комерційної діяльності лабораторій:

- клітинна інженерія рослин;
- трансформація рослин;
- регенерація трансгенних рослин;
- мікроклональне розмноження рослин;
- оздоровлення рослин від вірусної, грибкової, бактеріальної інфекцій;
- введення в культуру *in vitro* рідких та цінних видів рослин, які складно розмножуються.

На сьогодні створення трансгенних організмів потребує значних капіталовкладень. Зосередження великого матеріального потенціалу й значної кількості висококваліфікованих працівників та науковців під силу лише великим транснаціональним компаніям (наприклад, Monsanto). Крім цього, широке впровадження трансгенних організмів неоднозначно сприймається світовою спільнотою. Більш поширеними є невеликі біотехнологічні лабораторії зі штатом 10–20 співробітників. Основний напрям їх діяльності – оздоровлення та клональне мікророзмноження. Цей напрям найчастіше застосовують у декоративному садівництві (розсадництво) та сільському господарстві (насінництво таких культур як картопля, хміль та ін.).

1.3. Функціональні сектори лабораторії

Основна стратегія лабораторій, що займаються клональним мікророзмноженням, полягає у виконанні наступних заходів:

- діагностування та оздоровлення від вірусів, бактерій та інших патогенів;
- підтримання колекцій безвірусних рослин *in vitro*;
- аналіз на генетичну ідентичність вихідним формам, сортам;

- прискорене асептичне клонування;
- постасептична адаптація.

Для успішного виконання цих робіт у структурі лабораторного приміщення мають бути такі сектори:

1) кімната для миття посуду (мийна кімната);
2) кімната приготування середовищ;
3) автоклавна;
4) операційні бокси (рис. 2);
5) культиваційні кімнати (рис. 3);
6) сектор постасептичної адаптації: теплиця, гідропонна установка (рис. 4).

Перший та шостий сектори не потребують особливої стерильності, в усіх інших секторах дотримання асептичних умов є обов'язковим.

Мийна кімната. Специфіка цього сектору полягає в очищенні посуду, матеріалів і знарядь від бруду. Найчастіше ці кімнати розміщують віддалено від стерильної частини лабораторії, оскільки підвищена вологість є несприйнятливою для боротьби зі спорами бактерій та грибів у сусідніх приміщеннях. Кімната має водопостачання, водовідведення та забезпечена лініями миття посуду.

Кімнату *приготування середовищ* обладнують шафами для зберігання реактивів та посуду, холодильником для зберігання розчинів реактивів, аналітичними вагами, магнітними мішалками, pH-метрами, плитою для розігрівання середовищ, мийними раковинами.

В *автоклавній* розміщують автоклав та столи для зберігання приготовлених середовищ.

Операційні (*ламінарні*) *бокси* є основою лабораторії. У ламінар-боксах проводять живцювання та інші маніпуляції з рослинними об'єктами в асептичних умовах. У цьому секторі лабораторії вимоги до стерильності найвищі, тому застосовують регулярне миття підлоги з антисептиками та бактерицидну обробку повітря у приміщенні.

Рис. 2. **Операційна кімната.**

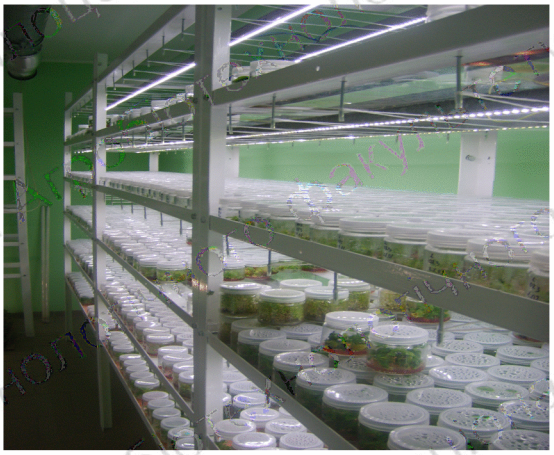


Рис. 3. **Культиваційна кімната.**

Рис. 4. **Постасептичне гідропонне вирощування гербери.**

У *культиваційних* кімнатах розміщують освітлювальні стелажі (блоки) для вирощування за штучного освітлення асептичних культур.

Сектор *постасептичної* адаптації призначений для адаптації стерильного матеріалу до звичайних природних умов – *ex vitro* (рис. 5).

Рис. 5. **Постасептична адаптація павловнії на перлітовому субстраті.**

Найчастіше цей сектор розміщують окремо від основної будівлі лабораторії. Адаптацію до нестерильних умов проводять у різних тепличних комплексах (гідро- та аеропонні установки тощо).

1.4. Штучні живильні середовища

Штучні живильні середовища для культивування *in vitro* рослинних клітин, тканин, органів є багатокомпонентними сумішами, до складу яких входять органічні та мінеральні сполуки різної хімічної природи (рис. 6). Вони забезпечують рослинні об’єкти, що культивуються, трофічними і фізіологічно активними речовинами на фоні оптимальних умов температури,

тиску та *pH*. Також до складу поживних середовищ можуть входити: гідролізат казеїну, або амінокислоти; ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) або її натрієва сіль (NaЕДТА або трилон Б) для підвищення доступності заліза в широких межах pH; вуглеводи – необхідний компонент поживних середовищ за культивування ізольованих клітин і тканин, оскільки вони майже не здатні до автотрофного живлення (фотосинтез).

Компоненти середовища поділяють на 6–8 груп, що найчастіше відображає порядок приготування концентрованих маточних розчинів: макроелементи, мікроелементи, хелатне залізо, вітаміни та інші біологічно активні речовини, джерела вуглеводів, фітогормони.

Основою всіх поживних середовищ є суміш мінеральних солей. Ці сполуки нітрогену у формі нітратів, солей амонію; фосфору – у формі фосфатів; сульфуру – у формі сульфатів, також розчинних солей K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}. Залізо використовують у формі хелатів [FeO_4 або $Fe_2O_4^+$ ЕДТА або NaЕДТА (трилон Б)]. Досить ефективним є використання залізоумісного мікродобрива Ферилен Fe-EDDHA [3].

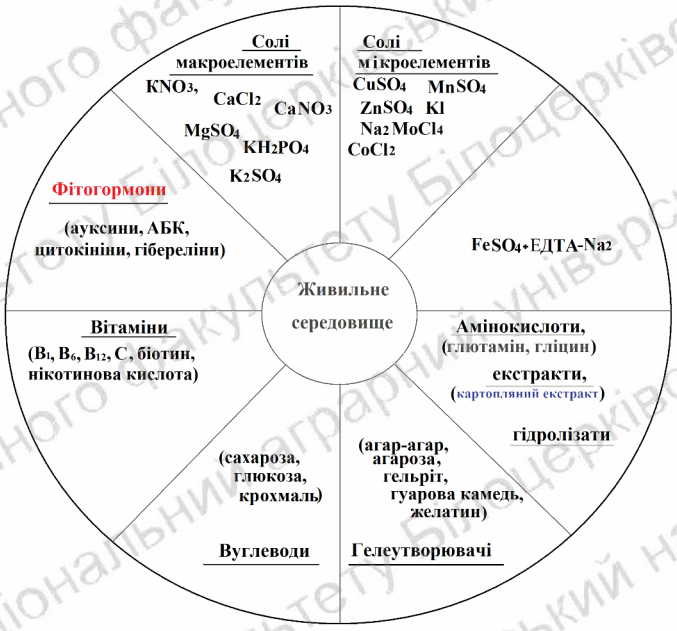


Рис. 6. **Компонентий склад штучних живильних середовищ для культивування *in vitro* об'єктів рослинного походження.**

З метою стимуляції у рослинах синтезу органічних речовин, як джерело вуглецю для біологічних макромолекул за гетеротрофного живлення культивованих об'єктів, до поживних середовищ додають вуглеводи у концентрації 20–60 г/л. Найчастіше це дисахариди (сахароза) та

моносахариди (глюкоза, фруктоза). Полісахариди (крохмаль) у поживних середовищах використовують рідко.

Для стимуляції біохімічних реакцій у клітинах існують біологічні каталізатори – ферменти. Активною небілковою частиною (коферментом), як правило, є мікроелементи та вітаміни, тому до складу середовищ для культивування рослинних об'єктів додають екзогенні вітаміни: вітаміни групи В (B_1, B_6, B_{12}), С (аскорбінову кислоту), РР (нікотинову кислоту), мезоінозит.

Для керування процесами морфогенезу (утворення пагонів, ризогенез, калюсогенез та ін.) вводять до складу середовища фітогормони. Класи гормонів є двох типів: стимулятори (ауксини, цитокініни, гібереліни) та інгібітори (етилен, абсцизова кислота). Ці речовини впливають на диференціацію і дедиференціацію клітин і тканин, ініціюють утворення тканин, поділ та розтягування клітин, беруть участь у процесах старіння й дозрівання, стимулюють або інгібують ріст, розвиток клітинних структур.

Найчастіше застосовують:

- ауксини: індолілоцтова кислота (ІОК), індолілмасляна (індолілолійна) кислота (ІМК), нафтилоцтова кислота (НОК);
- цитокініни: кінетин (фурфуриламінопурин), зеатин, 6-БАП (6-бензиламінопурин), 2iP (2 ізопентиаденін);
- гібереліни: гіберелова кислота ($ГК_3$, $ГК_4$, $ГК_7$ та ін.).

За консистенцією в культурі *in vitro* живильні середовища можуть бути рідкими та твердими (агаризованими). Рідкі середовища використовують для культивування клітинних суспензій, ізольованих органів та рослин-регенерантів. За такого культивування для підтримання експлантів у пробірках розміщують спеціальні містки-підтримки із фільтрувального паперу або синтетичних пористих матеріалів. Агаризовані середовища готують на основі полісахариду агар-агару, який входить до складу морських водоростей. За додавання в середовище агар-агар з водою утворює гель (7 г/л). Інколи як ущільнювачі використовують поліакриламідні гелі (біогелі).

Приготування маточних розчинів. Для штучних живильних середовищ розчини макро- і мікросолей готують завчасно і використовують багаторазово у вигляді концентрованих маточних розчинів, які зберігають у холодильнику.

Маточні розчини макросолей готують у концентраціях у 10−40 разів більше за концентрації робочих розчинів та у 100−1000 разів − мікросолей та вітамінів. Маточні розчини хлористого або нітратного кальцію, а також хелати заліза готують і зберігають окремо від інших солей. Частину фітогормонів готують безпосередньо перед використанням, наприклад ІОК. Розчини гормонів та вітамінів для зручності готують з розрахунку 1 мг наважки на 1 мл рідини. Наприклад, 25 мг гормону ІОК розчиняють у 10 мл спирту, і об'єм доводять до 25 мл бідистильованою водою, тобто 25 мг у 25 мл. Речовини, які важко розчиняються у воді, розчиняють у спирті (ауксини, гібереліни) або 0,5−1 Н КОН (цитокініни). Такі речовини як кінетин, абсцизова кислота розчиняють на водяній бані.

Для культивування клітин, тканин та органів різних рослин використовують поживні речовини різноманітного кількісного і якісного складу (табл. 1). Найбільш широко використовують середовища Мурасіге і Скуга, Гамбурга, Ллойда і Маккоуена (Wood Plant Medium, або скорочено WPM).

1.5. Введення експлантів *in vitro*. Культура меристем

1.5.1. Введення в асептичну культуру рослинних об'єктів

Однією з основних умов успішного культивування ізольованих органів, тканин, клітин та протопластів є дотримання суворої стерильності. Ретельна стерилізація необхідна, тому що, як зазначалося раніше, на штучних поживних середовищах, призначених для культивування рослинних клітин і тканин, добре розвиваються мікроорганізми, які є небезпечними для культивованого матеріалу.

Таблиця 1 – **Склад найбільш поширених поживних середовищ, що застосовують для культивування декоративних рослин *in vitro***

Murashige&Skoog, 1962		Gamborgetal, 1968		Lloyd & McCown, 1980	
Компонент	Уміст, мг/л	Компонент	Уміст, мг/л	Компонент	Уміст, мг/л
Макроелементи					
NH_4NO_3	1650,0	$(NH_4)_2SO_4$	134,0	NH_4NO_3	400,0
KNO_3	1900,0	KNO_3	3000,0	K_2SO_4	980,0
KH_2PO_4	170,0	NaH_2POx4H_2O	150,0	KH_2PO_4	170,0
$MgSO_4x7H_2O$	370,0	$MgSO_4x7H_2O$	500,0	$MgSO_4x7H_2O$	370,0
$CaCl_2x2H_2O$	440,0	$CaCl_2x2H_2O$	150,0	$CaCl_2x2H_2O$	96,00
				$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	556,0
Мікроелементи					
KI	0,83	Kl	0,75		
H_2BO_3	6,20	H_3BO_3	3,00	H_3BO_3	6,20
$MnSO_4x4H_2O$	22,30	$MnSO_4x4H_2O$	10,00	$MnSO_4x4H_2O$	22,30
$ZnSO_4x7H_2O$	8,60	$ZnSO_4x7H_2O$	2,00	$ZnSO_4x7H_2O$	8,80
$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25	$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25	$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25
$CuSO_4x5H_2O$	0,025	$CuSO_4x5H2O$	0,025	$CuSO_4x5H_2O$	0,25
$CoCl_2x6H_2O$	0,025	$CoCl_2x6H_2O$	0,025		
Na_2EDTA	37,30	Na_2EDTA	37,30	Na_2EDTA	37,30
$FeSO_4x7H2O$	27,80	$FeSO_4x7H_2O$	27,80	$FeSO_47H_2O$	27,80
Органічні компоненти					
Іносітол	100,0	Іноситол	100,0	Міоінозитол	100,0
Тіамін HCl	0,1	Тіамін HCl	10,0	Тіамін HCl	0,10
Піридоксин HCl	0,5	Піридоксин HCl	1,0	Піридоксин HCl	0,50
Нікотинова кислота	0,5	Нікотинова кислота	1,0	Нікотинова кислота	0,50
Гліцин	2,0			Гліцин	2,00

Стерилізація рослинного матеріалу. Для отримання стерильних рослин відбирають в *in vivo* необхідні рослини, відмивають їх від бруду, розділяють на сегменти, які називають *експлантатами* або *експлантами*.

Як експлант можуть використовуватися будь-які частини рослинного організму – живці, бруньки, шматочки кореня, стебла, листка та інших органів. Найчастіше у практиці використовують частини пагону з бруньками або ж самі бруньки. За потреби звільнення від вірусів з рослини-донора ізолюють апікальні меристеми[3], більша частина яких є вільною від вірусів. Для рослин, в яких складно ізолювати апікальні меристеми, наприклад, гербера, хоста, як експланти беруть бутони, або частини суцвіття. У деяких рослин, що мають схильність до утворення адвентивних органів[4], як експлант можна використати навіть шматок листка. Наприклад, використання листків для отримання мікроцибулин гіацинта.

У ламінар-боксі протирають внутрішню робочу поверхню ламінару 70 % спиртом. Потім у ламінарі розміщують спиртівку з 96 % спиртом, стерильний посуд та інструменти, колбу зі стерильною водою. Під час виконання роботи з ізоляції меристем в ламінарі розміщують бінокуляр. За два-три дні до проведення робіт приміщення з ламінар-боксом стерилізують протягом 10–12 годин бактерицидними ультрафіолетовими лампами.

---

[3]**Культура меристем** – асептичне вирощування на поживних середовищах ізольованого з апексу або пазушної бруньки пагона конусу наростання з одним або двома листковими примордіями. Сам конус складається з твірних недиференційованих клітин, що здатні до активного поділу, і з яких утворюються всі постійні тканини організму. У рослин виділяють декілька типів меристем – апікальні (недетерміновані), детерміновані та інтеркалярні (розміщені між ділянками постійних тканин, наприклад, при основі міжвузля злаків).

[4]**Адвентивні органи** (а.о.), *придаткові органи* – органи рослин, які походять не з ембріональних тканин точки росту, а зі старіших частин рослини й розвиваються в незвичних місцях. До а. о. належать придаткові (адвентивні) бруньки, що виникають на міжвузлях, коренях, листках, та придаткові корені, які розвиваються на стеблах і листках. Здатність рослин утворювати а.о. використовують у разі вегетативного розмноження (живцювання, розмноження відростками, пагонами).

Потім ламінар провітрюють[5] фільтрованим повітрям.

Рослинні об’єкти перед стерилізацією ретельно промивають проточною водою, інколи з миючими засобами (пральний порошок, Твін-80) та звільняють від надлишкових тканин. Із коренеплодів, кореневищ знімають шкірку, з пагонів – кору, з бруньок – покривні луски. Відмиті об’єкти поділяють на менші шматки і занурюють на 20 хв у розчин гіпохлориту натрію або іншого антисептика (70 % етанол, діоцид). Для подальшого видалення антисептика з поверхні рослинні об’єкти 2–3 рази промивають стерильною автоклавованою водою та переносять у стерильну чашку Петрі. Послідовність цих дій представлено на рисунку 7.

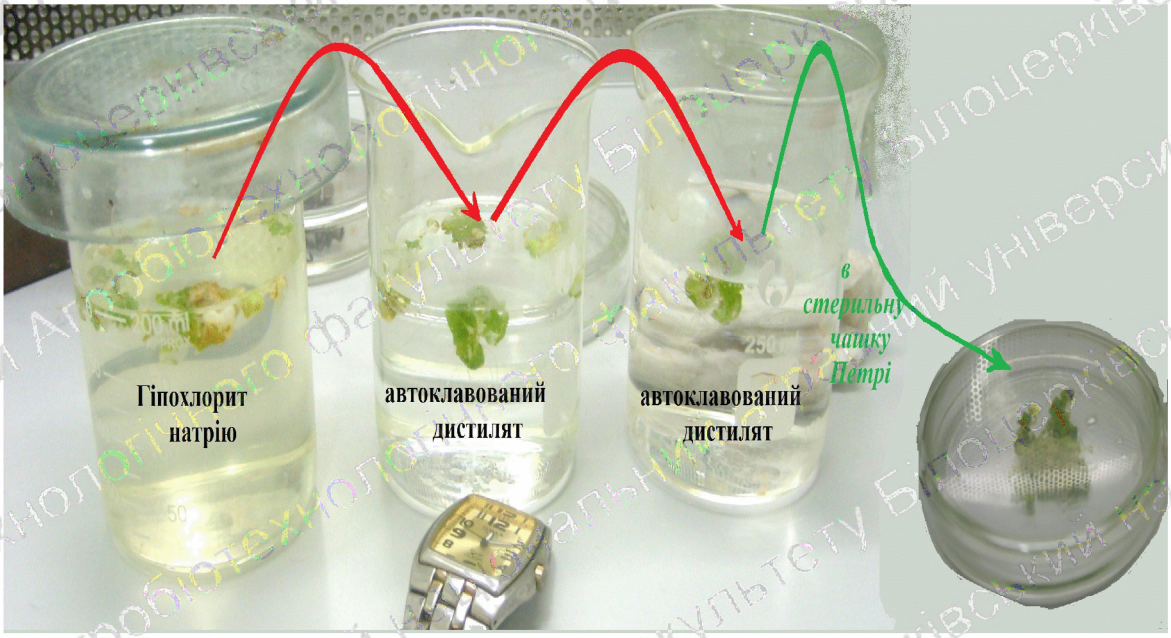


Рис. 7. **Послідовність стерилізації та відмивання експлантів.**

Для попередження підсихання до чашки додають 10–20 крапель стерильної води. Стерильним інструментом експланти в чашці розділяють на необхідні сегменти, звільняють від зайвих частин і переносять на поживне середовище для подальшого культивування *in vitro*.

[5] Працювати під час роботи бактерицидних ламп або в непровітреному приміщені після опромінення небезпечно для здоров’я працюючих.

Успішність стерилізації при введенні в асептичну культуру визначається за такими показниками: регенерація, наявність патогенної мікрофлори.

Ознаками наявності мікроорганізмів є помутніння середовища та поява маслянистої плівки на поверхні (це властиво переважно бактеріальному забрудненню), або поява спорангіїв цвілевих та інших грибів: аспергіл, мукор (рис. 8).

Рис. 8. **Контамінування[6] цвілевими грибами середовища внаслідок неякісної стерилізації експлантів *Hydrangea macrophylla.***

1.5.2. Культура меристем

У культурі тканин можна розмножувати рослини й отримувати оздоровлений (безвірусний) садивний матеріал декоративних, лісових та сільськогосподарських рослин. Для оздоровлення застосовують культуру апексів, або культуру апікальних меристем, тому що у стебловий апекс віруси проникають повільніше, ніж в інші частини рослини. В цілому існує така закономірність: чим менша величина меристеми, тим більша ймовірність отримання безвірусних рослин-регенерантів. Фітобіотехнологія дозволяє отримати безвірусний матеріал практично для всіх видів рослин (рис. 9, 10).

[6]**Контамінація**– від лат. *забруднення, змішування.*

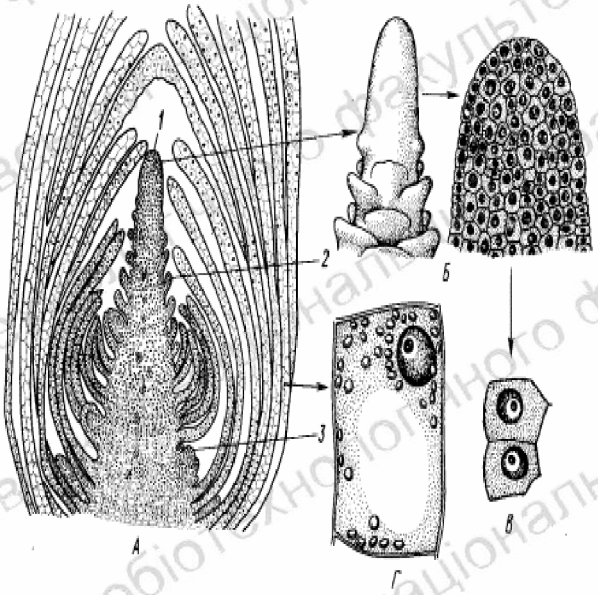


Рис. 9. **Верхівкова меристема пагону елодеї:**

А – поздовжній зріз; *Б* – конус наростання (зовнішній вигляд і поздовжній зріз); *В* – меристематичні клітини; Г – паренхімні клітини: *1*– конус наростання, 2 – зачаток листка, *3* –горбик пазухової бруньки.

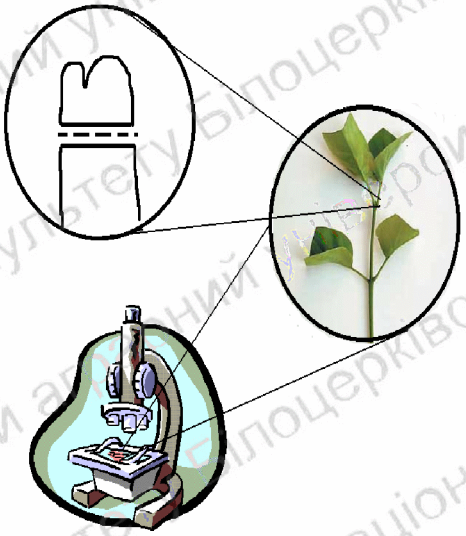


Рис. 10. **Ізоляція меристем.**

1.6. Фітогормони

Фітогормони – це низькомолекулярні органічні речовини, що виробляються рослинами і виконують регуляторні функції. Зазвичай фітогормони діють у досить низьких концентраціях (до 10^{-11} М) і зумовлюють різні фізіологічні і морфологічні зміни у чутливих до їх дії частинах рослин.

Головними класами фітогормонів є: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизини і етилен, що визначені за ефектом на рослину, тоді як структура представників одного класу може сильно різнитися. Часто до цього списку додають брасиностероїди, саліцилову кислоту, жасмонати.

Ауксини в культурі тканин викликають ріст клітин, у більших концентраціях − їх поділ, а у поєднанні з цитокінінами − органогенез. У біотехнології застосовуються як природні ауксини (ІОК), так і синтетичні (індоліл-3-масляна кислота), НОК (нафтилоцтова кислота).

Цитокініни у поєднанні з ауксинами індукують мітоз, проліферацію[7] клітин, тканин та пагонів. До природних цитокінінів відносять: зеатин, кінетин (6-фурфураміпопурин), 1,3-дифенілсечовину, що входить до складу кокосового молока, до синтетичних – 6-БАП (6-бензиламінопурин).

Гібереліни стимулюють ріст клітин розтягуванням та синтез ауксинів і цитокінінів. Відомо понад 60 видів гіберелінів. У культурі тканин найчастіше використовують гіберелову кислоту ($ГК_3$).

Абсцизини (АБК – абсцизова кислота) і етилен інгібують ростові процеси, поділ клітин. Абсцизова кислота індукує період спокою у бруньках і підтримує його у насінні, може впливати на геотропізм коріння, замикання продихів і ряд інших процесів.

Фітогормони у рослині перебувають у тісній взаємодії один з одним. Наприклад, ІОК індукує синтез етилену та цитокінінів, цитокініни посилюють синтез масляноцтової кислоти, але зменшують вміст АБК, етилен гальмує транспорт ІОК і збільшує вміст АБК. У культурі тканин екзогенні фітогормони, введені в середовище у різних пропорціях, регулюють синтез ендогенних гормонів рослин, що проявляється у різноманітних морфогенетичних реакціях клітин і тканин.

У 1955 р. Скуг і Міллер запропонували гіпотезу гормональної регуляції в культурі клітин і тканин, яка нині відома як правило Скуга-Міллера: якщо концентрації ауксинів і цитокінінів у поживному середовищі відносно рівні, або концентрація ауксинів незначно переважає концентрацію цитокінінів, то утворюється калюс; якщо концентрація ауксинів значно переважає концентрацію цитокінінів, то формуються корені; якщо

[7] **Проліферація** – новоутворення клітин і тканин розмноженням.

концентрація ауксинів значно менша за концентрацію цитокінінів, то утворюються бруньки, пагони.

Гормональна система тісно пов'язана з генетичним апаратом клітини. Фітогормони викликають експресію[8] та активацію структурних генів. Відповідно, змінюючи співвідношення гормонів у поживних середовищах, можна детермінувати генетичні програми клітин і тканин.

1.7. Мікроклональне розмноження рослин

МКР – це масове безстатеве розмноження рослин у культурі тканин та клітин, унаслідок якого отримують рослини генетично ідентичні материнській особині. Вихідним матеріалом для цього методу розмноження є апікальні і латеральні меристеми, молоді листки, елементи квітки, цибулини чи бульбоцибулини. Технологія клонального мікророзмноження складається з декількох етапів, що вимагають створення певних умов. Завдяки цьому методу може бути розмножено та оздоровлено велику кількість рослин як відкритого, так і закритого ґрунту (орхідні, бромелії, фікуси, кордиліни, гвоздики, троянди, хризантеми, гербери, півонії, бузок, дуб, берези, ялини та ін.).

Процес мікроклонального розмноження *in vitro* може відбуватися за рахунок:

a) активації розвитку вже існуючих у рослині меристем, які знаходяться у верхівках стебла, у пазухових (сплячих) бруньках (рис. 11, 12);
b) формування зародкоподібних структур заново, через калюсну тканину або адвентивних бруньок (рис. 13).

На практиці найбільш поширений перший тип розмноження, який зводить до мінімуму появу генетично змінених форм рослин. Органогенез за

[8]**Експресія гена** – процес, під час якого інформація, закодована в гені, переноситься на і-РНК і потім транслюється в білок. Таким чином, фітогормони, експресуючи той чи інший ген, впливають на фенотип та онтогенез організму.

мікроклонального розмноження рослин відбувається за таким сценарієм: *а)* на штучне поживне середовище із певним балансом фітогормонів у контрольованих умовах температури й освітлення вміщують невеличку частину рослини (бруньку, верхівку 0,3–30 мм), яка пускає пагони; *б)* пагони відділяють і пересаджують на інше середовище для вкорінення; *в)* одержані рослини-регенеранти адаптують до природних умов.

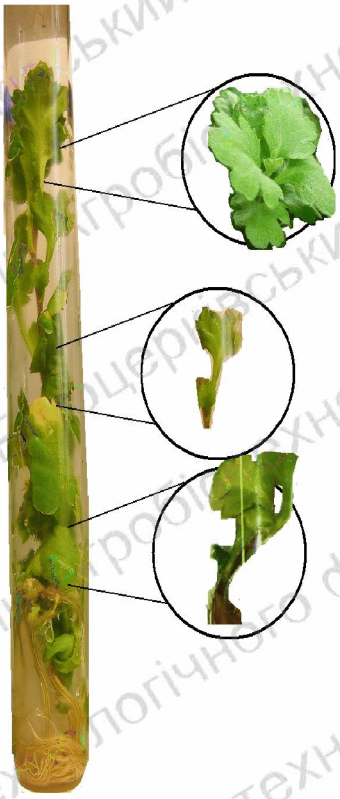
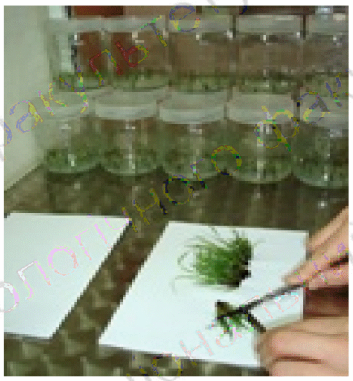


Рис. 11. **Живцювання *in vitro* хризантеми поділом пагону.**

вихідні рослини

живці



живцювання поділом куща

регенерація рослин із живців

Рис. 12. **Живцювання *in vitro* міскантуса поділом куща.**

Таким чином, ***мікроклональне розмноження*** (***клональне мікророзмноження***) – це масове нестатеве розмноження рослин у стерильних умовах, яке виключає появу генетично змінених форм.

Рис. 13. **Клональне мікророзмноження гортензії (*Hydrangea macrophylla*) в калюсній культурі за [4]:**

a –ізоляція експлантів; в **–** шматок калюсу з мікропагонами; c – чашка Петрі з морфогенними калюсами; d – регенеранти *in vitro*, (i) – регенеранти вирощені на середовищі Гамбурга з додаванням 0,5 мг/л нафтилоцтової кислоти, (ii) – регенеранти вирощені на середовищі Гамбурга без гормонів; e – постасептична адаптація.

У разі живцювання із бруньки, що знаходиться в пазусі листка, відростає пагін та утворюються корені, і таким чином регенерується нова рослина.

Основною відмінністю цих методів, на яку звертають увагу на виробництві, є відмінність між рослинами, що регенерувались із меристем: 1) рослини є генетично ідентичними батьківським формам (перша група методів); 2) рослини, утворені зі спеціалізованих і калюсних клітин, у яких можлива мінливість генної інформації. Першу групу методів використовують для прискореного розмноження у насінництві, другу – переважно із селекційною метою.

1.8. Постасептична адаптація рослин-регенерантів

Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *in vivo* – важливий і найбільш трудомісткий заключний етап мікроклонального розмноження. Найкращим для пересаджування є період, коли у рослини добре розростається коренева система для поглинання мінеральних елементів з грунту, а молоді листочки вже здатні до продуктивного фотосинтезу. Рослина стає повністю автотрофною, здатна до самостійного існування, її можна пересаджувати у природні умови.

Важливим аспектом роботи є вибір субстрату, на який переноситься рослина. Переважно це *суміш торфу з піском, перлітом або вермикулітом*. Наприклад, для суниць, вишні, смородини використовують суміш *грунт:торф:пісок = 1:1:1*. Перед висаджуванням у грунт корені рослин промивають у розчині *фунгіциду* (фундазол, бенолат). Висаджують не дуже загущено, щоб запобігти розвитку грибкових захворювань і сильному видовженню рослин у боротьбі за світло. У період вирощування щотижня рослини обприскують слабким розчином фунгіциду.

Фізіологічні особливості молодих листків (відсутність захисного воскового шару) та кореневої системи (недостатнє закріплення у субстраті, відсутність потужної зони кореневих волосків) не забезпечують

оптимального водного балансу рослин. Інтенсивна кутикулярна транспірація не компенсується надходженням води за допомогою тиску кореневої системи, що може призвести до в'янення і загибелі рослин. Саме тому *високий рівень вологості (90–100 %) повітря, в якому буде знаходитись рослина після пробірки, – найважливіший фактор перших тижнів вирощування*. Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях, індивідуальне покривання рослин поліетиленовою плівкою або скляним посудом (створення вологої камери). Як правило, високий рівень вологості підтримують до утворення нового листка протягом двох і більше тижнів.

Потім рослини *загартовують* – готують до відкритого ґрунту: поступово знімають покриття з рослини і зменшують вологість до природної. Для загартування рослин за останньої фази адаптації необхідно приділяти увагу оптимальному їх живленню. Надлишкове підживлення призводить до жирування рослин, вони стають надмірно рослими і погано приживаються після перенесення у відкритий ґрунт.

Якщо робота проводиться у великих промислових масштабах, то період адаптації рослин бажано спланувати і проводити з березня до вересня, що скоротить до мінімуму витрати. Рослини, одержані у зимовий період, зберігають у холоді (+5...+8 °С) за освітлення, а весною проводять усі зазначені вище прийоми.

ІІ. ПРОТОКОЛИ ТЕХНОЛОГІЙ МКР ТА ПОСТАСЕПТИЧНОЇ АДАПТАЦІЇ

Вирощування ізольованих рослинних експлантів потребує чіткого дотримання технологічних прийомів на кожному етапі МКР. В цілому МКР складається із чотирьох етапів:

I. Введення в асептичну культуру (добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування).
II. Мультиплікація або розмноження *in vitro (*найчастіше живцюванням).
III. Індукція ризогенезу (укорінення *in vitro*/*ex vitro).*
IV. Постасептична адаптація.

Нами наведено протоколи біотехнологій МКР наступних культур: хоста, туя західна, агапантус, малина, ожина, актинідія, картопля, алича, слива, персик.

2.1. Хоста

I. Добір рослин донорів експлантів. Найкращий період для ізоляції експлантів – це поява перших скручених у трубку листків у кущах, що вийшли зі стану спокою. За візуальними ознаками або інструментальним аналізом відбирають кущі, вільні від вірусних хвороб. Відібрані рослини відмивають від субстрату та ізолюють бруньки.

Для стерилізації застосовують свіжий розчин гіпохлориту натрію (15−30 днів після розфасування на підприємстві виробника) і дистильованої автоклавованої води у співвідношенні 1:3. До отриманого розчину додають перманганат калію. Експозиція обробки експлантів – 20 хв.

Стерильний рослинний матеріал 2−3 рази промивають в автоклавованому дистиляті до зникнення слідів забарвлення деконтамінуючої речовини. Після стерилізації та промивання експланти переносять у стерильні чашки Петрі.

Видаляють відмерлі тканини або зі слідами опіків, а бруньки висаджують на живильне модифіковане середовище Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 мг/л ІМК та 2,5 мг/л БАП (табл. 2).

Таблиця 2 – **Живильне середовище для розмноження та укорінення хости**

Компонент середовища	Кількість, мг/л		Компонент	Кількість, мг/л	
	розмн.	укорін.		розмн.	укорін.
NH_4NO_3	1250	1250	$Na_2ЕДТАx2H_2O$	37,3	37,3
KNO_3	1100	1100	Тіамін-HCl	0,1	0,1
$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	440	440	Піридоксин-HCl	0,5	0,5
$MgSO_4x7H_2O$	770	770	Вітамін С	1,6	1,6
KH_2PO_4	970	970	Нікотинова кислота	1,0	1,0
H_3BO_3	6,2	6,2	Мезоінозит	100	100
$MnSO_4xH_2O$	22,3	22,3	Гліцин	0,5	0,5
$CoCl_2x6H_2O$	0,025	0,025	ІМК	0,5	4,0
$CuSO_4xH_2O$	0,025	0,025	БАП	2,5	0,5
$ZnSO_4x7H_2O$	8,6	8,6	Сахароза	30000	10000
$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25	0,25	Агар	7000	7000
KJ	0,83	0,83	Активоване вугілля	-	4000
$FeSO_4x7H_2O$	27,8	27,8			

У випадку прояву ознак ендофітного контамінування експланти повторно обробляють розчином гіпохлориту натрію та перманганату калію. Залежно від походження контамінуючої мікрофлори додають антибіотики або фунгіциди. Найчастіше на хості ендофітами є бактерії видів *Erwinia, Pseudomonas* та ін. У випадку такої контамінації до живильного середовища додають левоміцетин (діюча речовина хлорамфенікол) та нітрат срібла у кількості 250 та 5 мг/л відповідно.

Якщо неможливо встановити тип забруднення або ж встановлено, що контамінування має грибне походження, перед стерилізацією гіпохлоритом натрію й перманганатом калію проводять замочування бруньок у розчині фунгіциду Превікур Енерджі 840 SL.Для кращого прояву ознак розвитку контамінантів у штучному живильному середовищі агар-агар замінюють на гелріт у кількості 4–5 г/л. Цей гелеутворювач надає середовищу прозорої консистенції.

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження хости використовують середовище із вмістом компонентів, наведених у таблиці 2. Для приготування середовища застосовують заздалегідь заготовлені маточні розчини (табл. 3–7).

Таблиця 3 – **Макросолі** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л), колба №1

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість (г) на 1 л маточного розчину
1	NH_4NO_3	50,000
2	KNO_3	74,000
3	$MgSO_4x7H_2O$	30,800
4	KH_2PO_4	38,800

Таблиця 4 – **Мікросолі** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л), колба №2

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість (г) на 1 л маточного розчину
1	KJ	0,830
2	H_3BO_3	6,200
3	$MnSO_4xH_2O$	22,300
4	$ZnSO_4x7H_2O$	8,600
5	$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,250
6	$CuSO_4xH_2O$	0,025
7	$CoCl_2x6H_2O$	0,025

Таблиця 5 – **Fe-хелат** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л), колба №3

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість (г) на 1 л маточного розчину
1	$FeSO_4x7H_2O$	0,556
2	$Na_2ЕДТАx2H_2O$	0,756

Таблиця 6 – **Кальцій*** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л), колба №4

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість (г) на 1 л маточного розчину
1	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	44,000

***Примітка:** Готується окремо від макросолей, тому що в маточних розчинах разом з ними випадає в осад.

Таблиця 7 – **Маточні розчини біологічно активних речовин** (розчиняти в окремих колбах), колба №5

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість речовини, мг	Об’єм колби, мл
1	Вітамін B_1 (тіамін)	250	250
2	Вітамін B_6 (піридоксин)	250	250
3	Вітамін С (аскорбінова кислота)	250	250
4	Нікотинова кислота	250	250
5	Гліцин	50	50
6	Інозитол	2500	250
7	Аденін	250	250
8	Бензиламінопурин	250	250
9	Індолілмасляна кислота	250	250

Приклад приготування 4 л живильного середовища для розмноження хости:

1. Підготувати посуд, у який буде розлито приготовлене середовище (пробірки, банки або контейнери).
2. Налити у колбу, а за її відсутності в емальовану каструлю, 3,0 л дистиляту.
3. У цю ж колбу (каструлю) відважити 28 г агару та 120 г цукру.
4. Каструлю з агаром, дистилятом та цукром поставити на електроплиту і за малого нагрівання, не доводячи до кипіння, розплавити агар. Ознаками того, що агар ще не розплавився є наявність крупинок агару на зануреній у розчин скляній паличці (пробірці). Якщо агар переплавився на поверхні розчину з'являтиметься піна. Цього не можна допускати, оскільки таке середовище може не загуснути, тобто не утвориться однорідна гелеподібна маса.
5. Виставити маточні розчини на столі згідно з таблицею 8.
6. Перевірити, чи є всі маточні розчини.
7. Відсутні маточні розчини приготувати.
8. У літрову ємність (колбу) налити 250−300 мл дистиляту.
9. Згідно з таблицею 8 додати компоненти в цю літрову ємність.
10. Об'єм ємності (колби) дистилятом довести до 1 л.
11. Довести pH до необхідного значення.
12. Після розчинення в каструлі агару й цукру додати в неї суміш з літрової ємності.
13. Отримані 4 літри розлити в банки й проавтоклавувати (45 хв з тиском 1,21 атм).
14. Приготовлене середовище залишити загусати за кімнатної температури впродовж години. Нормальною вважається консистенція, за якої вміст колби (пробірки чи іншої культуральної ємності) із проавтоклавованим і загуслим середовищем не розтікається за умови нахилу її на бік.

У випадку занадто загуслого середовища під час посадки живців відчувається його пружність, що також є небажаним. Живці повинні входити в середовище без зусиль.

Таблиця 8 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	На			Розведення в маточному розчині
		1 л	2 л	4 л	
1	Макросолі	25	50	100	1:40
2	Мікросолі	1	2	4	1:1000
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	10	20	40	1:40
4	Fe-хелат	25	50	100	1:20
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	3,2	6,4	1:1*
6	Вітамін B_6	1,0	2,0	4,0	1:1
7	Вітамін С	3,0	6,0	12,0	1:1
8	Нікотинова кислота	1,0	2,0	4,0	1:1
9	Гліцин	0,5	1,0	2,0	1:1
10	Інозитол	10	20	40	1:10
11	Аденін	5	10	40	1:1
12	Бензиламінопурин	2,5	5,0	10	1:1
13	ІМК	0,5	1,0	2,0	1:1

***Примітка:** 1 мг/мл.

Живцювання проводять одним із двох способів (рис. 14):

- поділом стебла;
- поділом куща на окремі пагони.

поділ стебла

поділ куща на окремі пагони

Рис. 14. **Способи живцювання хости.**

За першого способу живцювання повторне субкультивування проводять через 25–35 діб, за другого – через 45–60 діб, збільшуючи при цьому вміст сахарози до 40 г/л.

Перший спосіб передбачає розділення на сегменти наземної частини пагона. Залежно від товщини пагона його можна поділити на 2–4 частини. Зняте таким чином апікальне домінування обумовлює пробудження значної кількості бічних бруньок. Цей спосіб більш доцільний за потреби швидкого нарощування кількості рослин в асептичних умовах.

Для стимуляції в потомстві ризогенезу останній пасаж перед укоріненням краще проводити другим методом – поділом куща на мікропагони. Окремі пагони мають добре розвинені апікальні бруньки, які є джерелами ендогенних ауксинів, що значно покращує утворення кореневої системи у розсади ще в асептичних умовах.

Під час поділу рослин на сегменти (живці) важливо уникати травмування бруньок, тобто рух ланцета має бути між бруньками, як це зображено на рисунку 15. Травмовані бруньки можуть бути джерелами калюсоутворення, а калюсогенез, як відомо, є джерелом соматичної мінливості. У випадку, коли травмовані бруньки розвиваються шляхом прямого морфогенезу, вони відстають у рості, а це, за нашими спостереженнями, зумовлює асинхронність розвитку регенерантів.

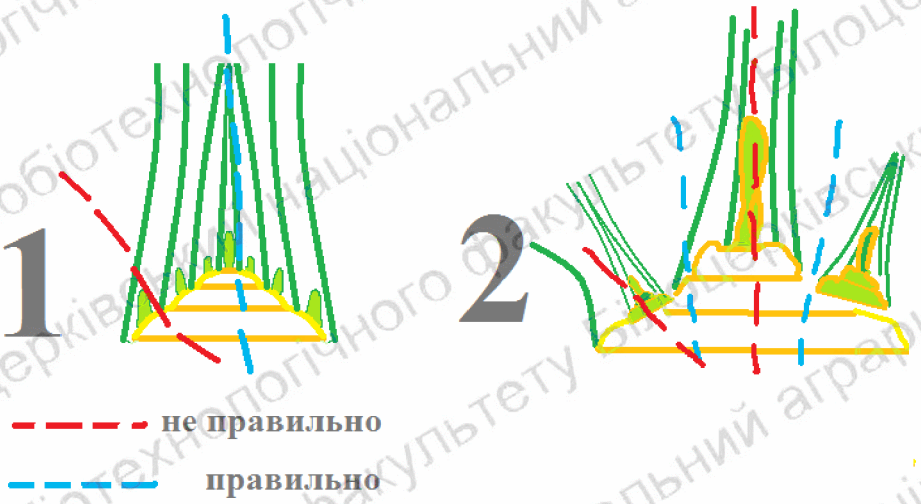


Рис. 15. **Рух ланцета під час поділу рослин хости:**
1) поділом стебла; 2) поділом куща на окремі пагони.

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього змінюють уміст гормонів: зменшують концентрацію БАП з 2,5 до 0,5 мг/л та збільшують уміст ІМК кислоти з 0,5 до 3,0–4,0 мг/л. Також додають активоване вугілля та зменшують уміст сахарози до 10 г/л. Якщо через тривале культивування (більше 45–60 діб) є загроза переростання розсади, вміст мінеральної частини зменшують удвічі.

IV. Постасептичну адаптацію проводять у парниках за умов вологої камери. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи розсаду перші два тижні постасептичного культивування вкривають агроволокном.

Як субстрат використовують торф із pH близьким до 6,0. У перший період після садіння слідкують за появою мікрофлори, яка знищує ніжні рослини. Як захід запобігання її поширення – розсаду обробляють фунгіцидами. За 2–3 три місяці розсада формує 7–10 листків і стає придатною до висадки у відкритий ґрунт (рис. 16).

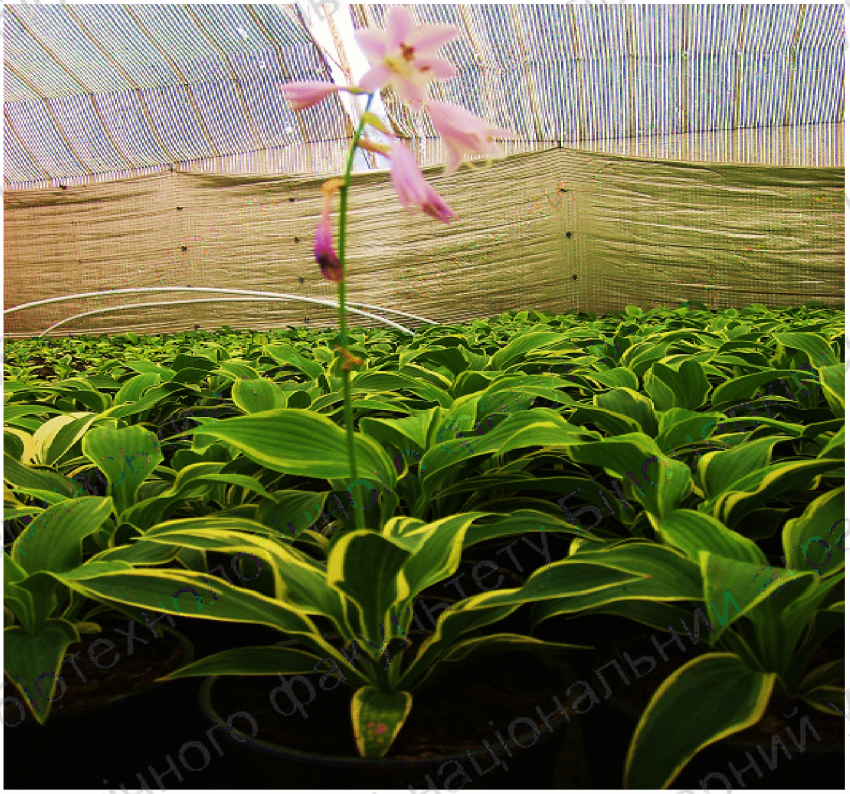


Рис. 16. **Рослини хости після постасептичної адаптації.**

2.2. *Агапантус*

I. Як донори первинних експлантів краще використовувати рослини-сіянці, що дозволяє зменшити ендофітне контамінування. Однак це є ризикованим з точки зору втрати генетичної константності сорту, тому зазвичай первинними експлантами є бутони, які не розкрилися. З них ізолюють основи суцвіть та нерозкриті квітки.

Як деконтамінуючі речовини доцільно застосовувати розчин гіплохлориту натрію та перманганату калію.

Перед застосуванням їх експланти витримують у розчині фунгіцидів (Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к. – Bayer Garden або Максим Форте 050 FS, т.к.с. – Syngenta).

За появи ознак бактеріального контамінування рослини повторно обробляють розчином антисептиків, а до живильного середовища додають антибіотики левоміцитин (*Chloramphenicol*) або гентаміцину сульфат і (або) нітрат срібла. Експланти на такому середовищі культивують не більше двох–трьох тижнів, оскільки вказані контамінанти пригнічують їх розвиток.

За проліферації експлантами первинних листків (рис. 17) їх пересаджують на свіже живильне середовище. До утворення повноцінних регенерантів пересадки проводять із проміжками не більшими, ніж три тижні. Це пов'язано з тим, що поверхневі тканини відразу відмирають, погіршуючи у такий спосіб контакт із середовищем.

II. Для розмноження використовують кущі, які можна ділити на окремі пагони. Недопустимим є розділення пагона на шматки вздовж стебла. Натомість необхідно проводити поділ так, щоб вберегти від травмування точки росту (рис. 18).

Для розмноження застосовують живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга з додаванням 1,5 мг/л БАП та 0,3 мг/л ІМК. Повторне субкультивування проводять через 80–90 діб.

Рис. 17. **Відокремлення мікропагонів від первинних експлантів.**

Рис. 18. **Поділ конгломерату на пагони.**

III. Отримані під час поділу конгломератів пагони висаджують для вкорінення на живильне середовище Мурасіге і Скуга з додаванням активованого вугілля. Кількість ІМК збільшують до 2 мг/л, натомість вміст БАП зменшують до 0,1 мг/л. Для сортів, які важко вкорінюються, проводять проміжне культивування на безгормональному середовищі. Після цього їх ділять на мікропагони, які висаджують на середовище із підвищеним умістом ауксинів.

IV.Укорінення проводять в парниках на субстраті, що складається із торфу та перліту (3:1). Кислотність субстрату повинна бути близькою до нейтральної.

2.3. Туя західна

I. Вибір рослини-донора. Ізоляція і стерилізація експлантів, створення умов для їх росту на живильному середовищі. *Первинний експлант.* Залежно від можливості розщеплення корисних ознак у потомстві для МКР туї західної використовують меристеми або проростки насіння.

Порядок стерилізації:

- обробка розчином фунгіциду – 20 хв;
- промивання у стерильній воді;
- обробка 70 % розчином етанолу – 5 с;
- обробка 20 % розчином гіпохлориту натрію або 0,07 % розчином препарату Бланідас 300;
- 3–4-кратне промивання у стерильній воді.

II. Умови культивування. Середовище Мурасіге і Скуга, що містить 30 г/л сахарози, 7 г/л агару, 1 мг/л ІОК, 20,0 мг/л аденіну, 15 мг/л вітаміну С. Температура + 21...+23 ^{0}С. Освітленість – 1800 лк. Фотоперіод – 16 год. Для тривалого субкультивування проводять відбір експлантів з ювенільною хвоєю.

III. Вторинний експлант: мікропагони висотою менше 3–4 см, що мають 2–3 міжвузля.

Укорінення розмножених пагонів проводиться на рідкому живильному середовищі Мурасіге і Скуга, що містить 30 г/л сахарози, 2 мг/л ІОК кислоти, 20,0 мг/л аденіну, 15 мг/л вітаміну С. Температура + 21...+23 ^{0}С. Освітленість –1800 лк. Фотоперіод – 16 год.

IV. Адаптація рослин-регенерантів до умов *in vivo.* Мікропарники (вологі камери) з автоклавованим субстратом в умовах підвищеної вологості та освітленості. Склад субстрату: суміш перліту та моху сфагнуму (1:1). Перші два тижні волога камера, потім вологість поступово впродовж місяця знижують. Після цього адаптовані рослини переносять у відкритий ґрунт.

2.4. Картопля

Основою насінництва картоплі є біотехнологічні методи, що передбачать оздоровлення та прискорене розмноження тестованого безвірусного матеріалу.

У технології оздоровлення сортів картоплі виділяють такі етапи: добір материнських рослин у полі (клонів) – термотерапія бульб – виділення меристеми – регенерація рослин із меристем – МКРР *in vitro* – вирощування рослин у культиваційних спорудах та у полі.

I. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування. На цьому етапі застосовують наступні прийоми: добір кращих кущів, термо- або хеміотерапія, ізоляція та культивування меристем.

Відбори бульб проводять за основними сортовими морфологічними ознаками та тестують на наявність латентної вірусної інфекції.

Термотерапія бульб. Для термотерапії відбирають бульби, які пройшли період спокою, типові для сорту, що не мають поверхневих ушкоджень та грибної інфекції. Бульби ретельно миють і розміщують у кюветах, наповнених піском. Вони піддаються термотерапії у затемненому термобоксі та автоматично регульованій температурі в межах +37...+39 °С. Вологість повітря підтримують не нижче 75 %, світло в боксі вмикають лише під час догляду за бульбами. У цих умовах на бульбах утворюються довгі етіольовані паростки. Тривалість та параметри режиму термотерапії визначають як видовим складом вірусів, так і біологією сорту. Зазвичай вона складає від 2 до 12 тижнів.

Виділення меристем. Для виділення меристем використовують зрізані верхівки паростків (довжиною 2–3 см) із бульб, що пройшли термотерапію. Їх стерилізують у розчині діоциду або гіпохлориту натрію. Для цього паростки опускають у розчин на 3–5 хв, потім тричі промивають стерильним бідистилятом.

Ізолюють меристеми від паростків під бінокулярним стереомікроскопом із масштабною сіткою та збільшенням не менше, ніж у 24 рази. Для виділення меристем використовують добре загострені великі медичні голки (діаметром близько 2 мм і довжиною 10−15 см).

Паросток підносять до столика мікроскопа, затиснувши пальцями або стерильним пінцетом, відламують покривні листки верхівки бруньки. Останні 3–4 зачаткові листки відламують під мікроскопом за допомогою ін'єкційних медичних голок, звільняючи меристему від покривів. Меристему розміром 100–200 мк з одним примордіальним листком відокремлюють двостороннім підрізанням голкою. На її вістрі меристему переносять на агаризоване живильне середовище у пробірки уколом голки в агар та плавним розрізуванням голкою агару на ½ діаметра пробірки (рухом від центру до стінки) залишають у пробірці.

Пробірки поміщають у спеціальні камери із регульованим світловим та волого-температурним режимом. Температура культивування меристем становить +24...+25 °С, освітленість 4−12 тис. лк з фотоперіодом 16 год. Регенерація з меристем рослин *in vitro* становить 2−8 місяців. Упродовж цього періоду меристемні експланти через кожні 10−15 діб пересаджують на нове середовище. При цьому, залежно від стану експлантів, кількісно і якісно змінюють уміст гормонів: ІОК, кінетин та гіберелін.

Отримані рослини розмножують і одночасно трикратно перевіряють на зараженість вірусами, застосовуючи метод імуноферментного аналізу та полімеразно-ланцюгову реакцію.

ІІ. Прискорене розмноження *in vitro*. Залежно від потреб виробництва в асептичних умовах отримують розсаду або мікробульби. Для нарощування необхідної кількості матеріалу проводять живцювання. Рослини в асептичних умовах бокса виймають із пробірок, розрізають на частини, кожна з яких повинна містити відрізок стебла з листком та пазуховою брунькою (рис. 19). Частина стебла над листком має бути у 2−3 рази коротша частини стебла, розміщеної нижче листка. Живці висаджують на живильне середовище, розроблене в Інституті картоплярства НААН.

Склад середовища (в мг/л) такий: макросолі: NH_4NO_3 – 1250; KNO_3 – 1100; $Ca(NO_3)_2x4H_2O$ – 440; KH_2PO_4 – 970; мікросолі за прописом Мурасіге і Скуга, однак кількість $MgSO_4x7H_2O$ збільшено до 770 мг/л. Органічні добавки: B_6 – 3,0, B_1 – 1,6, аскорбінова кислота – 1,6; кінетин – 0,25; аденін – 0,25; ІОК – 1,0; агар – 700, сахароза – 1000. Кожне подальше живцювання рослин проводять через 30 діб.

Живці садять у пробірки із живильним середовищем на глибину міжвузля. Через 18–22 діб рослини відростають, їх використовують для повторного живцювання до одержання необхідної кількості рослин, які використовують для одержання мікро-, мінібульб і розсади. Використання методу живцювання рослин у пробірках дозволяє впродовж 3–4 місяців отримати 2–3 тис. рослин, придатних для пересадки в ґрунт.

Тобто за 8–10 місяців коефіцієнт розмноження однієї рослини становить близько 20 тис.

Рис. 19. **Поділ рослин картоплі на живці.**

Для отримання мікробульб у пробірках використовують живильні середовища з високим рівнем мінерального та вуглеводного живлення і регульований фоторежим. Важливим фактором столоно- і бульбоутворення є підвищена концентрація сахарози у середовищі (4−8 %) та фотоперіод 16 год впродовж перших 10−15 діб, а потім 35−45 діб короткоденний фотоперіод 4−10 год. Більшість сортів утворюють бульби у пробірках за 55−60 діб.

Вирощування темнових мікробульб методом культури одного вузла. Регулювання температури культивування у пробірковій культурі дозволяє впливати на особливості реалізації генетичної програми, властивої певному виду рослин. За температури +18...+26 °С із бруньки живця розвиваються пагони і лише через 30–50 діб починається столоно- та бульбоутворення, а за температури культивування +12...+16 °С із бруньки живця відразу утворюється столон та бульба.

Характерно, що короткотривале витримування живців упродовж 1−2 діб при низьких позитивних температурах (преінкубація) з подальшим температурним режимом +18...+26 °С сприяє аналогічному розвитку живців, як і за постійної температури культивування +12...+16 °С. Застосування цього методу дозволяє зменшити затрати на електроенергію та амортизацію обладнання, оскільки освітлювальний період скорочується до 7 діб у ранньостиглих та до 10 діб у середньостиглих сортів.

Перед висадкою зібрані темнові мікробульби витримують впродовж тижня на розсіяному світлі.

В асептичних умовах раціональними є наступні модифікації живильного середовища:

- заміна кінетину на 20 мг/л аденіну, або за умови занесення до “списку дозволених до використання...” − препарату Д-9;
- заміна агару на крохмаль (5 г/л).

Виробництво розсади для одержання мінібульб. Розсаду одержують як дорощуванням рослин *in vitro,* так і живцюванням їх *in vivo* на субстратах у вологих камерах та укоріненням верхівок і пазухових пагонів, або за допомогою інших методів. Як субстрати після встановлення pH на рівні 6,0 використовують перліт, мох сфагнум, гідрогелі, пластагар. Джерело елементів живлення – розчин мінеральних солей за приписом Мурасіге і Скуга.

2.5. Малина

I. Добір рослин–донорів експлантів. Найкращий період для ізоляції експлантів – це пробудження бруньок. За візуальними ознаками, а за потреби інструментальним аналізом, відбирають кущі, вільні від вірусних хвороб. Відібрані рослини відмивають від субстрату, ізолюють шматки пагонів із бруньками та занурюють у розчин системного фунгіциду Превікур Енерджі 840 SL (1 – 2,0 мл на 100 мл дистиляту).

Після замочування у фунгіциді об'єкти промивають автоклавованим дистилятом. Для подальшої стерилізації застосовують свіжий розчин гіпохлориту натрію і дистильованої автоклавованої води у співвідношенні 1:3. Експозиція обробки експлантів становить 20 хв. Потім стерильний рослинний матеріал 2–3 рази промивають в автоклавованому дистиляті до зникнення слідів деконтамінуючого розчину. Після стерилізації та промивання експланти переносять у стерильні чашки Петрі, видаляють відмерлі або зі слідами опіків тканини. Бруньки або меристеми висаджують на поживне модифіковане середовище (табл. 9) з додаванням 2–2,5 мл/л PPM.

Відмінністю середовища для малини є високий уміст антиоксиданту (аскорбінова кислота), речовин з цитокініновою активністю (бензиламінопурину і аденіну) та заліза.

У разі застосування замість $FeSO_4x7H_2O$ + $Na_2ЕДТАx2H_2O$ препарату Ferrilene 4.8 Orto – Orto його додають 183,4 мг/л.

Для деконтамінації у живильне середовище додають 2,5 мл/л біоциду PPM, вміст агару зменшують до 6,5 г/л. Експланти повністю занурюють у живильне середовище. Це роблять для кращого контакту рослинних тканин із PPM. Через 2−3 тижні деконтаміновані об'єкти висаджують у живильне середовище, але щоб брунька знаходилася на поверхні середовища.

Таблиця 9 – **Живильне середовище для розмноження та вкорінення малини**

Компонент	Кількість, мг/л		Компонент	Кількість, мг/л	
	розмн.	укор.		розмн.	укор.
NH_4NO_3	1250	625	$FeSO_4x7H_2O$	55,6	55,6
KNO_3	1100	550	$Na_2ЕДТАx2H_2O$	74,6	74,6
$Ca(NO_3)_2$ x $4H_2O$	440	220	Тіамін-HCl	1,6	1,6
$MgSO_4x7H_2O$	770	385	Піридоксин-HCl	0,5	0,5
KH_2PO_4	970	485	Вітамін С	6,0	6,0
H_3BO_3	6,2	3,6	Нікотинова кислота	1,0	1,0
$MnSO_4xH_2O$	22,3	11,15	Мезоінозит	100	100
$CoCl_2x6H_2O$	0,025	0,0125	Гліцин	0,5	0,5
$CuSO_4xH_2O$	0,025	0,0125	Аденін	0,2	0,1
$ZnSO_4x7H_2O$	8,6	4,3	ІМК	0,1	2,0
$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25	0,125	Бензиламінопурин	1,5	0,1
KJ	0,83	0,415	Сахароза	30000	10000
			Агар	7000	7000
pH 5,6					

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище з умістом компонентів, представлених у таблиці 10. Його готують із маточних розчинів аналогічно протоколам по хості.

Таблиця 10 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	Кількість (мл) у розрахунку на		
		1 л	3 л	6 л
1	Макросолі	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	10	30	60
4	Fe-хелат або Ferrilene 4.8 Orto – Orto	50	150	300
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін B_6 (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	6,0	18,0	36,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	2,0	6,0	12,0
12	Бензиламінопурин (1:1)	1,5	4,5	9,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	0,1	0,3	0,6

Живцювання проводять шляхом поділу конгломерату пагонів (рис. 20). Для отримання конгломератів уміст БАП збільшують, а для отримання регенерантів із одним пагоном – зменшують.

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього змінюють середовище (табл. 11), зменшуючи уміст мінеральної частини та цитокінінів.

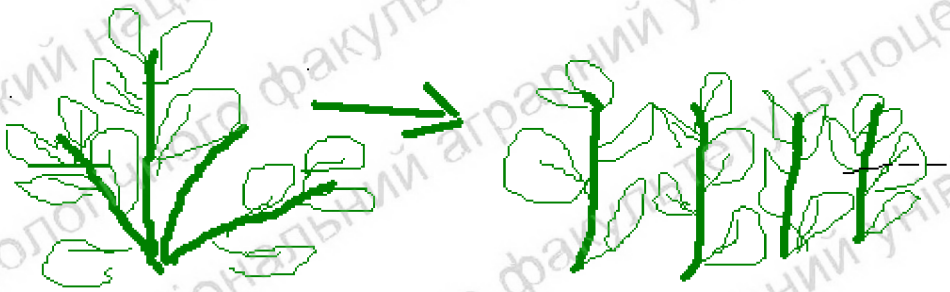


Рис. 20. **Спосіб живцювання малини *in vitro.***

Таблиця 11 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для укорінення)

№ п/п	Інгредієнт середовища (маточний розчин)	Кількість (мл) у розрахунку на		
		1 л	3 л	6 л
1	Макросолі	12,5	37,5	75
2	Мікросолі	0,5	1,5	3
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	5	15	30
4	Fe-хелат або *Ferrilene 4.8* Orto–Orto	50	150	300
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін B_6 (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	6,0	18,0	36,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	0,5	1,5	3,0
12	Бензиламінопурин (1:1)	1,0	3,0	6,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	2,0	6,0	12,0

IV. Постасептична адаптація регенерантів віком не менше 35–45 діб проходить у парниках за умов вологої камери із туманоутворювачем.

Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи касети із розсадою перші два тижні постасептичного культивування висаджують у прозорі контейнери, кришки яких поступово відкривають. Як субстрат використовують перліт, преліт-вермикулітну суміш або торф із pH близько до 6,0. У перші періоди слідкують за появою мікрофлори, яка може знищити ніжні рослини. За перших ознак інфікування грибною інфекцією розсаду обробляють фунгіцидами (Превікур Енерджі 840 SL).

За 1,5 місяці розсада формує 5−7 листків і стає придатною до висадки у відкритий ґрунт (рис. 21). Завдяки ювенілізації *in vitro* адаптовані регенеранти здатні до 1−2 живцювань, але вже в умовах закритого ґрунту. Це дозволяє знизити собівартість посадкового матеріалу.

2.6. Ожина

I. Добір рослин−донорів експлантів та введення в асептичні умови проводять аналогічно порядку дій на малині (див. підрозділ 2.5. Малина).

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище із вмістом компонентів, представлених у таблиці 12.

Для приготування середовища застосовують заздалегідь приготовлені маточні розчини аналогічно описаним у протоколі для хости (підрозділ 2.1). Проте у разі використання замість Fe-хелату препарату Ferrilene 4.8 Orto–Orto його додають у концентрації 91,7 мг/л. У середовище додають маточні розчини згідно з таблицею 13.

Живцювання проводять одним із двох способів: 1) поділом стебла на одно-двовузлові живці; 2) поділом конгломерату пагонів. Для отримання конгломератів уміст БАП збільшують, а для отримання регенерантів із одним пагоном − зменшують.

регенеранти після 30 діб адаптації

регенерант після 45 діб адаптації

регенерант після постасептичного живцювання

Рис. 21. **Адаптовані регенеранти малини, сорт Брусвяна.**

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього змінюють уміст гормонів: зменшують вміст БАП із 0,5 до 0,1 мг/л та збільшують вміст ІМК із 0,1 до 1,0–2,0 мг/л. Якщо є загроза переростання розсади більше розмірів культуральних ємностей унаслідок тривалого періоду культивування (більше 45–60 діб), уміст мінеральної частини (окрім хелату заліза, концентрацію якого не змінюють) зменшують удвічі.

Таблиця 12 – **Живильне середовище для розмноження та вкорінення ожини**

Компонент	Кількість, мг/л		Компонент	Кількість, мг/л	
	розмн.	укор.		розмн.	укор.
NH_4NO_3	1250	1250	Ferrilene 4.8 Orto–Orto	137,55	-
KNO_3	1100	1100	AgNO3	1,0	1,0
$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	440	440	Тіамін-HCl	1,0	1,0
$MgSO_4x7H_2O$	770	770	Піридоксин-HCl	0,5	0,5
KH_2PO_4	970	970	Вітамін С	1,6	1,6
H_3BO_3	6,2	6,2	Нікотинова к-та	1,0	1,0
$MnSO_4xH_2O$	22,3	22,3	Мезоінозит	100	100
$CoCl_2x6H_2O$	0,025	0,025	Гліцин	0,5	0,5
$CuSO_4xH_2O$	0,025	0,025	Аденін	0,2	0,1
$ZnSO_4x7H_2O$	8,6	8,6	ІМК	0,1	4,0
$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25	0,25	БАП	0,5	0,2
KJ	0,83	0,83	Сахароза	30000	10000
$FeSO_4x7H_2O$	-	27,8	Агар	7000	7000
$Na_2ЕДТАx2H_2O$	-	37,3	*Активоване вугілля	1000	1000
pH 5,6					

***Примітка:** у разі введення активоване вугілля не додається.

IV. Постасептичну адаптацію проводять у два етапи:

1. Способом фотоавтотрофного мікроклонального розмноження. Для цього вихідні материнські рослини живцюють на перліт-вермикулітний субстрат. Живлення забезпечують розчином мінеральних речовин за Мурасіге-Скугом. Боротьбу з бактеріями проводять додаванням нітратного срібла до розчину, а з грибною інфекцією − обприскуванням раз у п’ять діб розчином фунгіциду Превікур Енерджі.

Таблиця 13 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	Кількість (мл) у розрахунку на		
		1 л	3 л	6 л
1	Макросолі	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	10	30	60
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto–Orto	35	105	210
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін B_6 (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	3,0	9,0	18,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Іноситол	10	30	60
11	Аденін (1:1)	1	3	6
12	Бензиламінопурин (1:1)	0,5	1,5	3,0
13	Індолілмасляна кислота (1: 1)	1	3	6
14	Нітрат срібла	1,5	4,5	9,0
15	Активоване вугілля, г	1,0	3,0	6,0

2. Після культивування фотоавтотрофним способом подальшу адаптацію проводять у парниках за умов вологої камери. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи розсаду перші два тижні постасептичного культивування вкривають агроволокном.

У якості субстрату використовують LafloraKKS-1 на основі фрезерного торфу із pH близько 6,0. У перші періоди слідкують за появою мікрофлори, яка може знищити ніжні рослини.

При появі перших ознак інфікування розсаду обробляють фунгіцидами. За 2–3 місяці розсада формує 5–7 листків і стає придатною до висадки у відкритий ґрунт або горщики об'ємом 0,8–2 л (рис. 22).

Рис. 22. **Адаптовані регенеранти ожини в Р9.**

2.7. Актинідія

Відомо близько 30 видів (за https://uk.wikipedia.org/wiki/Актинідія) актинідії. Цей протокол розроблено та успішно апробовано на таких видах актинідії: А. аргута, А. коломікта, А. китайська (рис. 23) та А. делікатесна (ківі).

І. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування. Нами розроблено і рекомендується для практичного застосування підготовчий етап вирощування маточних 1–2–річних рослин в умовах закритого ґрунту депозитарію. Їх вирощують за умови розсіяного світла, без природного ультрафіолетового опромінення та з інтенсивним хімічним захистом від потенційних контамінантів, до яких відноситься сапрофітна непатогенна мікрофлора, що в майбутньому може потрапити з рослинним матеріалом у живильне середовище.

Рис. 23. **Регенерація бруньки *Actinidia chinensis*.**

Первинна обробка, особливі умови вирощування в депозитарії зменшують забруднення первинних експлантів та зменшують виділення ними у живильне середовище фенолоподібного ексудату.

Як експланти використовують бруньки, що відновили ріст. Ізоляцію проводять так, щоб біля бруньки залишалася невелика (розміром 0,2–0,5 мм) «п'ятка». Перед деконтамінацією ізольований первинний матеріал замочують в антиоксидантому розчині (перші 60 хв – у розчині аскорбінова кислота 200 мг/л + цистеїн 5 мг/л, наступні 60 хв – у розчині полівінілпіролідону 10 г/л).

Для боротьби із глибинним контамінуванням бруньки переносять у розчин системного фунгіцида Превікур Енерджі 840 SL. Після цих попередніх обробок застосовують 20–хвилинну обробку розчином натрієвої солі дихлорціануронової кислоти (0,7 г препарату Бланідас 300 на 100 мл автоклавованого дистиляту). Промивання матеріалу проводять тричі в автоклавованому дистиляті. Бруньки звільняють від верхніх листків. Їх висаджують на живильне середовище, аналогічне представленому протоколу по МКРР малини (див. підрозділ 2.5. Малина).

У разі рецидивів інфекції експланти повторно обробляють згідно зі вказаною схемою. У живильне середовище додають біоцид 2 мл/л PPM™(Plant Preservative Mixture). Оскільки PPM має контактну дію, то рослинний матеріал на 2–3 тижні занурюють повністю у препарат.

II і III. Розмноження та ризогенез *in vitro*. Для культивання використовують живильні середовища аналогічно протоколу по малині.

Для розмноження використовують варіант середовища із надлишком БАП (рис. 24), а для індукції ризогенезу – ауксину (ІМК).

Рис. 24. **Гормональна детермінація онтогенезу рослин *A. arguta in vitro*, сорт Оригінальна,** 30-та доба асептичного культивування:

1. БАП – 1,5 мг/л; 2. ІМК – 2 мг/л.

Також для ризогенезу можна застосовувати середовище Куаріна і Лепувра з половинним умістом мінеральних елементів та додаванням ауксину ІМК. Поділ 30–добових маточних рослин на живці проводять шляхом розділення конгломерату пагонів, більші пагони ділять на одно-двовузлові живці.

IV. Постасептична адаптація. Основними вимогами до постасептичної адаптації актинідії є підтримання рівня pH (5,5) субстрату та вологості (рис. 25). Готують субстрат на основі верхового торфу. До нього додають мінеральну частину середовища, що застосовувалося *in vitro*.

Низька вологість, особливо у поєднанні із високим pH, викликає фізіологічні опіки рослин, які можна прийняти за ураження грибною інфекцією. Якщо за низької вологості збереглися бруньки, то при підвищенні вологості до 100 % регенеранти відновлюються (рис. 26). За 2−3 тижні після висадки вологість поступово знижують, через місяць рослини стають готовими до реалізації або пересаджування у більші ємності (рис. 27).

2.8. Алича, слива, персик, підщепи персика

Даний протокол успішно застосовується на підщепах Міраболано 29С, GF-677 (рис. 28), Спутнік, персиках (сорти Пам'яті Гришка, Щедрий та ін..), сливі (сорт Трудівниця Млієва).

I. Добір рослин-донорів експлантів. За наявності придбаних у спеціалізованих лабораторіях сертифікованих безвірусних рослини *in vitro* «класу М 0» потреби у цьому етапі немає. Однак, якщо є необхідність отримати вихідний асептичний матеріал, у період відновлення вегетації необхідно ізолювати первинні експланти. Найкращий період для цього – пробудження бруньок: зелений конус, поява кінчиків перших листків.

Такі донори − це переважно пробуджені бруньки, із яких почали з'являтися молоді листки. З бруньок знімають криючі луски, оскільки в них знаходиться значна кількість контамінантів. Якщо вказаний період упущений, як експланти використовують живці зелених пагонів довжиною 5−7 см із невеликими бруньками у пазухах листків.

Застосування менших пагонів, особливо «жировиків», призводить до інтенсивного виділення фенольного ексудату, а в старших за віком пагонів відмічається інтенсивне контамінування ендогенною мікрофлорою.

pH субстрату 6,5; вологість 75 %

pH субстрату 5,5; вологість 100 %

Рис. 25. **Вплив вологості повітря та кислотності субстрату на особливості постасептичної адаптації актинідії аргути.**

Рис. 26. **Відновлення рослин актинідії аргута після низької вологості.**

Рис. 27. **Адаптовані протягом одного місяця рослини актинідії аргута.**

Підщепа GF-677 Персик, сорт Пам'яті Гришка

Рис. 28. **Ріст регенерантів на модифікованому середовищі.**

Для зменшення утворення фенольного ексудату донори експлантів не менше як за місяць до їх ізоляції заносять у приміщення (теплиця, депозитарій) зі штучним освітленням. Для зниження заселеності контамінантами проводять обробку фунгіцидами, у випадках бактеріального забруднення – антибіотиками, наприклад, препаратом Казумін (20–30 г/л).

Для стерилізації застосовують розчин препарату Бланідас 300 (0,7–0,8 г на 100 мл автоклавованої дистильованої води). Експозиція обробки – 20 хв. Потім експланти 2–3 рази промивають у автоклавованій дистильованій воді. Після промивки у них видаляють некротизовані та зі слідами опіків ділянки.

У випадку, якщо прогнозується сильна заселеність ендогенною мікрофлорою, етап доповнюється такими заходами:

- перед обробкою розчином Бланідас 300 експланти впродовж години витримують у розчині фунгіциду Превікур Енерджі 840 SL (1,0–1,5 мл на 100 мл дистиляту);
- додають у живильне середовище біоцид (часто застосовується як консервант) PPM^{TM} 1,5–2,0 мл/л. За його використання експланти на 2–3 тижні занурюють повністю в живильне середовище;

- якщо експланти за повного занурення мають ознаки гіпоксії, PPM™ у складі живильного середовища замінюють на 3−5 г/л $AgNO_3$.

Висаджують експланти на живильне середовище. У перші один−два субкультивування вміст цитокінінів збільшують в 1,5−2,0 рази. Нами застосовується середовище з макроелементами за Кворіном-Лепуавром, мікроелементами за Мурасіге-Скугом.

Хід приготування маточних розчинів подібний протоколу МКРР хости (див. підрозділ 2.1. Хоста) за рядом змін, а саме: маточний розчин макросолей за Кворіном і Лепувром (табл. 14), маточний розчин кальцію за Кворіном і Лепувром (табл. 15).

Таблиця 14 − **Макросолі за QL** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л)

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість, г/л маточного розчину
1	NH_4NO_3	16,00
2	KH_2PO_4	10,8
3	KNO_3	72,0
4а	$MgSO_4$ безводний або х 2,047	7,12
4б	$MgSO_4x7H_2O$	14,39

***Примітка:** молярна маса $MgSO_4$ безводний ~ 120,37; молярна маса $MgSO_4x7H_2O$ ~ 246,37; співвідношення цих молярних мас становить 2,047.

Таблиця 15 − **Кальцій* за QL** (розчиняти у колбі об′ємом 1 л)

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість, г/л маточного розчину
1	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	33,352

***Примітка:** готується окремо від макросолей, тому що в маточних розчинах разом з ними випадає в осад.

II. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для введення в асептичні умови, підтримання колекції використовують середовище, наведене у таблиці 16.

Таблиця 16 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	Кількість (мл) у розрахунку на		
		1 л	3 л	6 л
1	Макросолі QL	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$ (1:40) QL	25	75	150
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto–Orto	30	90	180
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	4.8	9,6
6	Вітамін B_6 (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С (аскорбінова кислота)	3,0	9,0	18,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол (1:10)	10	30	60
11	Аденін (1:1)	0,1	0,3	0,6
12	Бензиламінопурин (1:1)	0,25-0,5	0,75-1,5	1,5-4,5
13	ІМК або НОК (1: 1)	0,1	0,3	0,6
	pH 5,7			

Для отримання високих коефіцієнтів шляхом утворення конгломератів із 5–9 мікропагонів субкультивування проводять на середовищі для розмноження, яке розписано у протоколі МКР для малини (табл. 10).

Живцювання проводять одним із двох способів: поділом стебла; поділом куща (конгломерата) на окремі пагони.

III. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього готують нижче вказане середовище (табл. 17).

Таблиця 17 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ в мл** (варіант для укорінення)

№ п/п	Інгредієнт середовища	Кількість (мл) у розрахунку на		
		1 л	3 л	6 л
1	Макросолі QL	12,5	32,5	75
2	Мікросолі	0,5	1,5	3,0
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$ (1:40) QL	12,5	32,5	75
4	Fe-хелат або Ferrilene 4.8 Orto–Orto	25	75	150
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	4,8	9,6
6	Вітамін B_6 (піридоксин)	1,0	3,0	6,0
7	Вітамін С	1,0	3,0	6,0
8	Нікотинова кислота	1,0	3,0	6,0
9	Гліцин	0,5	1,5	3,0
10	Інозитол (1:10)	10	30	60
11	Аденін	0,1	0,3	0,6
12	Бензиламінопурин	0,1	0,3	0,6
13	Індолілмасляна кислота	1,5	4,5	9,0
14	Активоване вугілля, г	1,0	3,0	6,0

IV. Постасептичну адаптацію проводять в умовах вологої камери. Протягом 2–3 тижнів регенеранти переважно нарощують кореневу систему і лише потім спостерігається ріст пагона (рис. 29). Використовують торфовий субстрат із pH до 6,0 од. Починаючи із другого тижня, вологість поступово знижують.

Рис. 29. **Адаптований за 15 діб регенерант аличі (Міраболано 29С).**

2.9. Павловнія

Останнім часом в Україні набуває поширення культура павловнія, а отже, й біотехнологічний метод розмноження цієї рослини з використанням культури тканин [6, 7]. Мікроклональне розмноження (далі МКР) *in vitro* деревних видів рослин достатньо складне, але при належному фаховому рівні підготовки персоналу, налагодженні технології є швидким метод виробництва у великих об'ємах якісного однорідного матеріалу. У 1998 році вчений Бергманн порівняв розвиток посадкового матеріалу роду Павловнія у тепличних умовах і встановив, що одержані мікроклональним розмноженням рослини розвиваються краще, ніж сіянці [5]. Останні розвивалися повільніше. Також серед сіянців віком до трьох років було виявлено значну кількість випадів.

Посадковий матеріал, отриманий МКР, має низку інших переваг:

- вільний від вірусів та інших патогенів;
- однорідний;
- після *in vitro* за рахунок ювенілізації саджанці в перший рік мають швидші темпи росту [8].

Бергманн зі співавторами у своїх дослідженях показали, що варіабельність клонів, навіть в межах одного генотипу, досить висока. Це

зумовлює коригування технології і, насамперед, складу живильного середовища для оптимізації процесу МКР [9]. Однак є й загальні закономірності, на яких ми зупинилися більше у роботі.

Живильні середовища для культивування павловнії in vitro

Залежно від етапу мікроклонального розмноження павловнії, застосовуємо один із варіантів штучного живильного середовища (табл. 18).

Таблиця 18 – **Компонети штучних живильних середовищ**

Компонент	Кількість, мг/л			Компонент	Кількість, мг/л		
	В*	М*	Р*		В*	М*	Р*
Макросолі							
NH_4NO_3	1250	400		KH_2PO_4	970		270
$MgSO_4x7H_2O$	770	360		KNO_3	1100		1800
$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	440	834					
Мікросолі							
H_3BO_3	6,2			$CuSO_4xH_2O$	0,025		
$MnSO_4xH_2O$	22,3			$ZnSO_4x7H_2O$	8,6		
$CoCl_2x6H_2O$	0,025			$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,25		
KJ	0,83						
Fe-хелат							
$FeSO_4x7H_2O$	27,8			$Na_2ЕДТАx2H_2O$	37,3		
Вітаміни							
Вітамін В1	1,6			Вітамін В6	1,0		
Вітамін С	1,6			Вітамін РР	1,0		
Фітогормони							
БАП	1,5	-	-	ІМК	0,5	0,3	0,8
Кінетин	-	0,8	0,3				
Інші органічні речовини							
Мезоінозит	100			Гліцин	1,0		
Сахароза	30000			Агар	7000		

***Примітка:** скороченням «В», «М», «Р» відповідають етапи «введення в асептичні умови», «мультиплікація», «ризогенез».

Змінюються по етапах такі складові:

- макросолі;
- кальцію нітрат;
- фітогормони.

Середовище варять із попередньо підготовлених маточних розчинів. Маточні розчини макросолей, кальцій нітрату (табл. 19, 20, 21), Fe-хелату (див. підрозділ 2.1. Хоста) містять збільшені у 40 разів концентрації необхідних компонентів. Такі маточні розчини у кількості 25 мл додають до 1 л середовища.

Таблиця 19 − **Макросолі** (для введення і мультиплікації)

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість на 1 л маточного розчину, г
1	NH_4NO_3	50,000
2	KNO_3	74,000
3	$MgSO_4x7H_2O$	30,800
4	KH_2PO_4	38,800

Таблиця 20 − **Макросолі для ризогенезу**

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість на 1 л маточного розчину, г
1	NH_4NO_3	16,00
2	KH_2PO_4	10,8
3	KNO_3	72,0
4а	$MgSO_4$ безводний або х 2,047	7,12
4б	$MgSO_4x7H_2O$	14,39

***Примітка:** молярна маса $MgSO_4$ безводний ~ 120,37; молярна маса $MgSO_4x7H_2O$ ~ 246,37; співвідношення цих молярних мас становить 2,047

Таблиця 21 – **Маточні розчини кальцій нітрату* залежно від етапу МКР**

№ п/п	Варіант	Хімічна формула компонента	Кількість на 1 л маточного розчину, г
1	для введення та мультиплікації	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	44,000
2	варіант для ризогенезу		33,352

***Примітка:** готується окремо від макросолей, тому що в маточних розчинах разом з ними випадає в осад.

Змінюються по етапах такі складові:

- макросолі;
- кальцію нітрат;
- фітогормони.

Гормони, вітаміни, гліцин готують кожен окремо, розчиняючи в розрахунку 1 мг компнонента на 1 мл дистиляту. Наприклад, 100 мг вітаміну С в 100 мл дистиляту. Для БАП і кінетину як розчинник використовують спочатку КОН (2–3 мл 1 М розчинину на 100 мг гормона), потім додають дистилят та 2–3 мл етилового спирту. Спирт запобігає випаданню осаду. ІМК розчиняють в етанолі, а отриманий розчин стабілізують 1–3 мл 1 М розчинину КОН на 100 мг.

І. Введення в асептичну культуру. Для отримання стерильних рослин як основний антисептик використовуємо препарат Бланідас 300 (0,7 г на 100 мл води), та у разі ендогенного контамінування як допоміжний – препарат PPM (1,5–2,5 мл на 1 л живильного середовища) [8]. Оптимальний період відбору експлантів грудень-січень. Для цього з відібраних за господарськими ознаками здорових рослин зрізують однорічні гілки і ставлять їх у теплому місці у воду. Воду міняють раз у три дні. Ці гілки знаходяться в стані вимушеного (не глибокого) спокою, тому через 2–3 тижні на них пробуджуються бруньки. Якщо необхідно ізолювати експланти в серпні-

жовтні, стеблові живці обробляють гібереловою кислотою ($ГК_3$ або сумішшю $ГК_4$+$ГК_7$). Через 7–10 діб бруньки пробуджуються (рис. 30).

Рис. 30. **Живці з пробудженими бруньками з материнських рослин після обробки гібереліном.**

З бруньок ізолюють криючі луски і занурюють у розчин антисептика на 20 хв. Потім двічі промивають у стерильній воді. У ламінарному боксі видаляють криючі луски, в яких часто міститься ендогенна мікрофлора. Потім залежно від потреб переносять на живильне середовище бруньку або меристему.

Якщо у середовище інтенсивно виділяються фенолоподібні речовини, то у складі середовища акусин ІМК (0,5 мг/л) замінюють на суміш індолілмасляної та нафтилоцтової кислот (ІМК 0,4 мг/л + НОК 0,1 мг/л). Протягом перших трьох субкультивувань уміст БАП зменшують до 0,75–1,0 мг/л.

II. Мультиплікація. Живильне середовище для розмноження готують із маточних розчинів згідно з таблицею 22.

Для павловнії середній інтервал часу між субкультивуваннями становить 15–30 діб (рис. 31).

Таблиця 22 – **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл** (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	Кількість (мл) у розрахунку на			Розведення в маточному розчині
		1 л	2 л	4 л	
1	Макросолі	25	50	100	1:40
2	Мікросолі	1	2	4	1:1000
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	25	50	100	1:40
4	Fe-хелат	25	50	100	1:20
5	Вітамін B_1 (тіамін)	1,6	3,2	6,4	1:1*
	Вітамін B_6	1,0	2,0	4,0	1:1
6	Вітамін С	3,0	6,0	12,0	1:1
7	Нікотинова кислота	1,0	2,0	4,0	1:1
8	Гліцин	0,5	1,0	2,0	1:1
9	Інозитол	10	20	40	1:10
10	Аденін	5	10	40	1:1
11	Кінетин	0,8	1,6	3,2	1:1
12	ІМК	0,3	0,6	1,2	1:1

***Примітка**: 1 мг/мл.

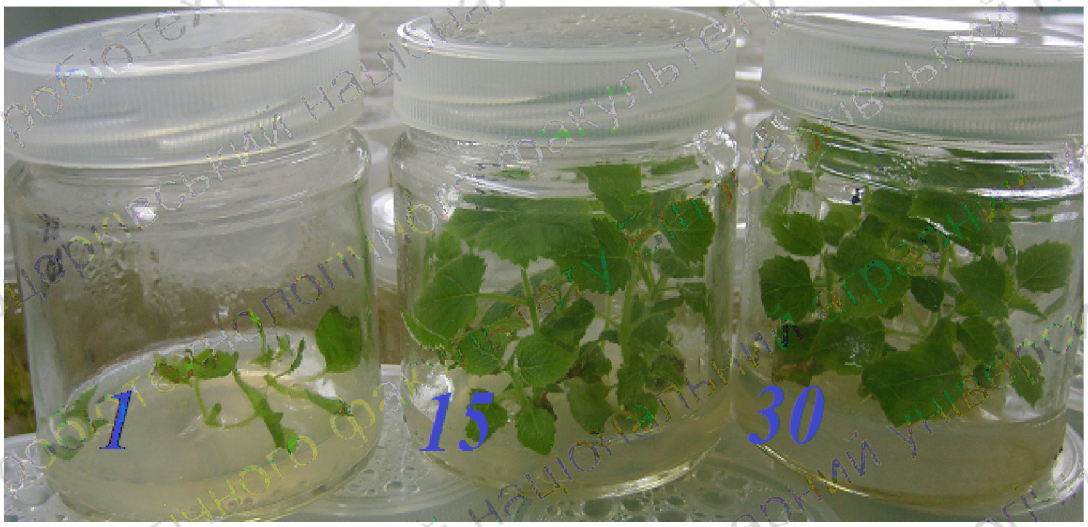


Рис. 31. **Стан регенерантів павловнії *in vitro*, діб.**

Після 15–20 діб культивування пагони регенерантів особливо не змінюються в розмірах.

Водневий показник живильного середовища впливає на засвоєння елементів живлення, ріст і розвиток регенерантів (рис. 32).

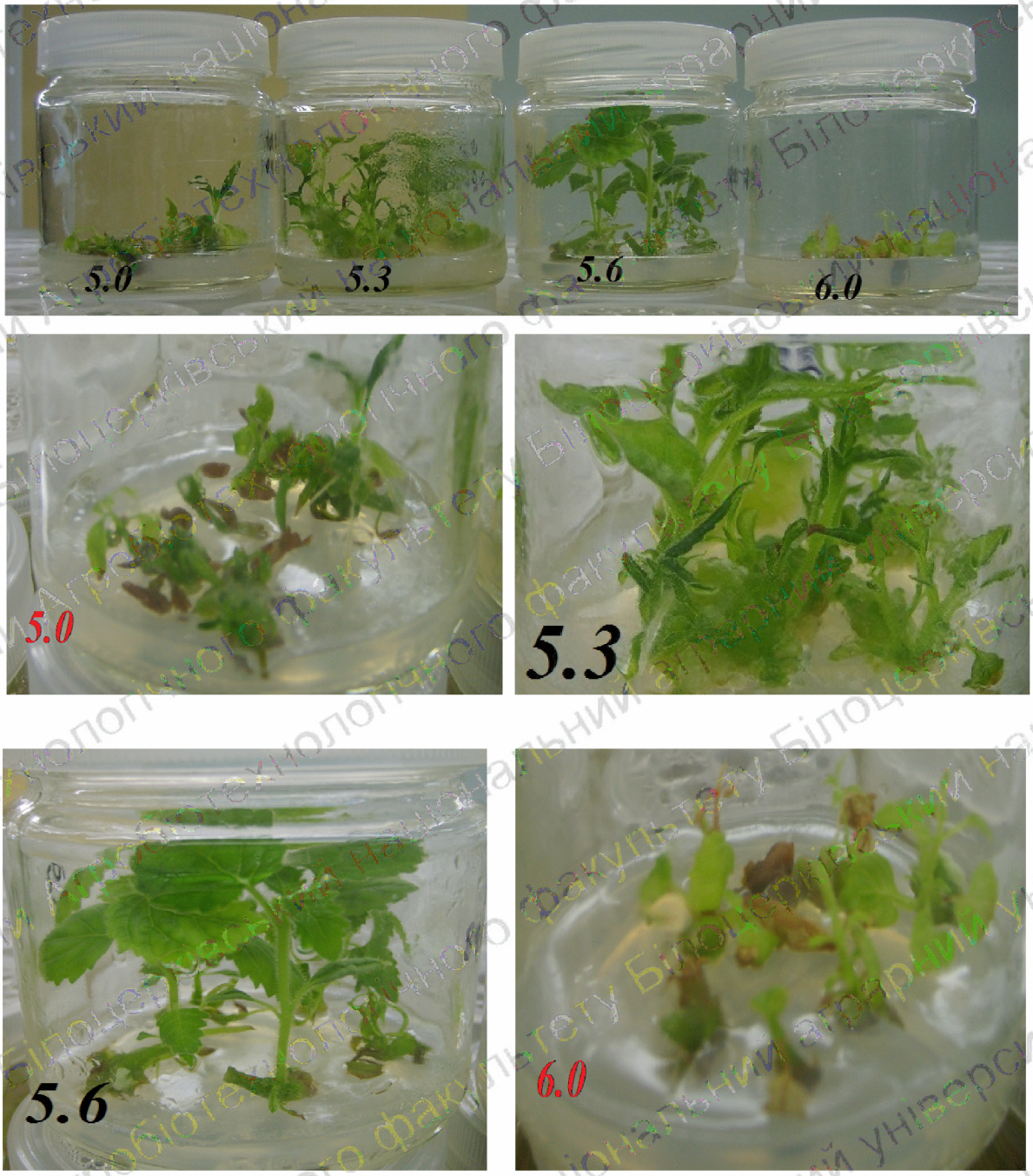


Рис. 32. **Вплив pH на розвиток регенерантів павловнії.**

Оптимальним є pH 5,5–5,8 од. При pH живильного середовища 5,3, особливо 5,0 од., у регенерантів наявні типові ознаки нестачі фосфору та калію внаслідок ускладнення їх засвоєння. Регенеранти з темно-зеленими листками відстають у рості.

Для швидкого накопичення значної кількості рослин прямим морфогенезом (тобто із бруньок, а не з калюсних клітин) використовують один із шляхів живцювання (рис. 33): 1) поділом конгломерату мікропагонів; 2) одновузловими живцями.

Рис. 33. **Розвиток регенерантів павловнії за різних шляхів живцювання:**

1 – поділом конгломерату пагонів; 2 – одновузловими живцями.

Перший спосіб живцювання досягається застосуванням цитокініну БАП. Однак має два недоліки: 1) за утворення конгломерату відбувається часткове калюсоутворення, і таким чином, виникає потенційна можливість прояву мутагенезу (рис 34); 2) наявність БАП у живильному середовищі перешкоджає нормальному коренеутворенню. Міцні пагони, придатні для отримання одновузлових живців, отримують за невеликих концентрацій іншого цитокініну – кінетину на фоні ауксину ІМК.

конгломерат пагонів з калюсним утворенням в базальній частині регенерантів

регенеранти з гіпергідратованими тканинами

Рис. 34. **Прояв надлишку БАП при культивуванні павловнії *in vitro*.**

Передозування БАП чи кінетину є фітотоксичним і призводить до появи регенерантів з гіпергідратованими (вітрифікованими) тканинами (рис. 34). Фітотоксичний ефект цитокінінів може накопичуватися з покоління у покоління [10]. Тому після 3−4 пасажування кількість цитокініну зменшують. Для зняття фітоксичного впливу цитокінів, у випадку масової появи вітрифікованих регенерантів, роблять проміжне живцювання із додаванням гіберелової кислоти ($ГК_3$) або суміші $ГК_4$+$ГК_7$ (рис. 35).

Рис. 35. **Відновлення рослини на середовищі із ГК$_3$ після фітотоксичного впливу надлишку БАП.**

III і IV. Ризогенез та постасептична адаптація. У павловнії *in vitro* корінь дуже ламкий. Тому найчастіше за масового розмноження висаджують рослини, обламуючи коріння.Також враховують надзвичайну ламкість стебла регенерантів у зоні кореневої шийки та опушеність, що вимагає обережного поливу на перших етапах росту в умовах закритого ґрунту. Ризикованим є полив перші 15 діб туманоутворюючими установками. Це пов'язано з повстистим листям, на якому наявне інтенсивне опушення із солодкими виділеннями. За умов туману на таких листках можуть поселятися сапрофітні і патогенні мікроорганізми.

Як субстрат найчастіше використовують торфосубстрати (рис. 36), кокосовий ґрунт або перліт. Вирощування на субстратах з домішками органічних речовин, особливо за недотримання технології (контроль грибної інфекції, кислотності), є ризикованим унаслідок втрати розсади через

ураження комплексом збудників, які викликають фузаріозне в′янення та чорну ніжку (рис. 37). Частково стримувати поширення грибів можна шляхом зниження вологості субстрату та обробкою кожні 5 діб розчином препарату Превікур Енерджі 840 sl в.р.к (2−3 мл/л).

Рис. 36. **Висадка регенерантів павловнії на торф'яний субстрат.**

Рис. 37. **Загибель експланта на торф'яному субстраті внаслідок ураженням комплексом збудників.**

Застосування як субстрату агроперліту (рис. 38) дозволяє уникнути зазначених вище проблем. Агроперліт – це крупна фракція спученого перліту (2,5–5мм), а перліт – це вулканічне скло (пісок), до складу якого входять хімічні елементи: SiO_2 – 70–75 %, Al_2O_3 – 12–14 %, Na_2O – 3–5 %, K_2O – 3–5 %, Fe_2O_3 – близько 1,0 %, а також CaO і MgO у невеликих кількостях. Тобто, по хімічному складу – це пісок. Єдиною відмінністю перлітової породи є вміст у ній 2–5 % зв'язаної води, яка при нагріванні до високих температур розпирає основну породу, завдяки чому утворюється спучений перліт, у структурі якого є багато вільного місця для повітря і води. Завдяки цим властивостям, а також хімічному складу, перліт, як і будь-яке скло, інертний, хімічно та біологічно стійкий. Завдяки своїй структурі він може вбирати до 400 % води від своєї маси і добре її утримувати. При цьому воду він з легкістю віддає назад [11].

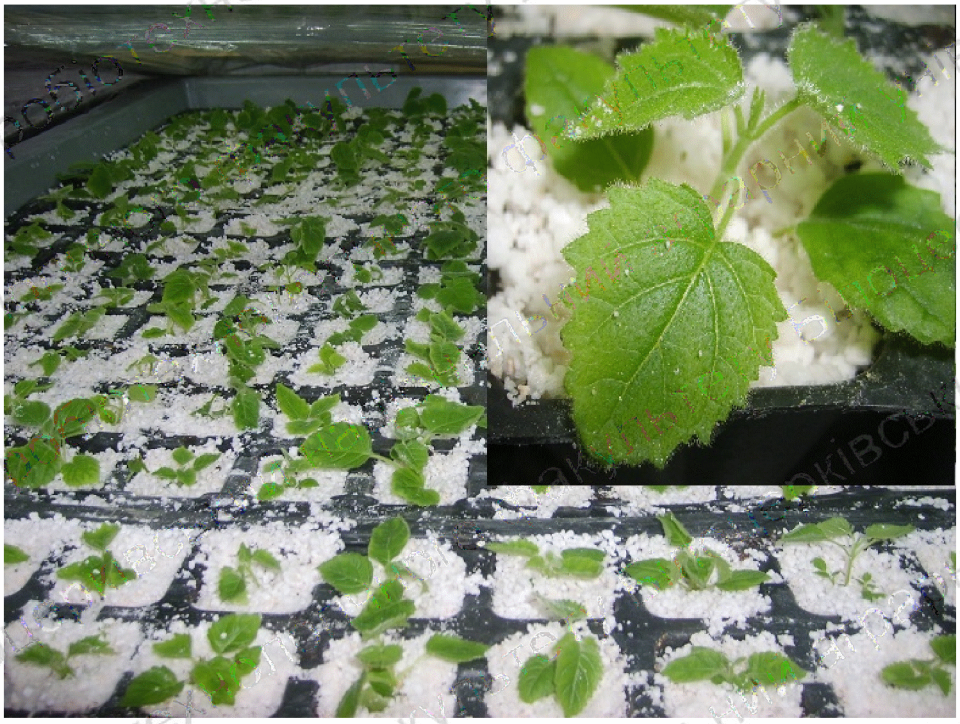


Рис. 38. **Висадка павловнії *in vitro* на перліт.**

Оскільки у перліті майже немає елементів живлення, використовують спрощений варіант живильного середовища (див. варіант для розмноження).

Для цього беруть лише мінеральну частину і додають нітрат срібла (табл. 23). За використання цього субстрату уникають надмірних поливів, особливо поверхнево (не підтопленням). Це пов'язано із загрозою появи синьо-зелених водоростей. Самі водорості не є небезпечними для рослин, але продукти їх гниття пригнічують ріст розсади.

Таблиця 23 – **Об'єми маточних розчинів для приготування поживного розчину у розрахунку на 1 л**

№ п/п	Інгредієнт середовища	Обєм, мл	Розведення в маточному розчині
1	Макросолі	25	1:40
2	Мікросолі	1	1:1000
3	$Ca(NO_3)_2x4H_2O$	25	1:40
4	Fe-хелат	30	1:20
5	$AgNO_3$	3–5	1:1

За постасептичної адаптації павловнії так само, як і в природних умовах, властиві швидкі темпи росту як пагона, так і кореневої системи (рис. 39). Якщо на п'яту добу у базальній частині відмічається утворення напливу, то на десяту вже є кілька коренів. За два тижні регенеранти придатні для пересадки в більші ємності, або у відкритий ґрунт за умови крапельного поливу та мульчування.

Ювенілізація рослин павловнії *in vitro* передається на декілька поколінь при постасептичному живцюванні. Після висадки регенерантів, вироджених «на агарі», їх можна ще 2–3 рази переживцювати (рис. 40). Після 4–5 живцювань втрачається ювенільність, а отже, і регенераційні властивості, у т.ч. утворення адвентивних коренів.

За другого-третього живцювань саджанцям властиві перші порівняно великі листки (рис. 41). Такі регенеранти мають кращі адаптаційні властивості і меншу собівартість.

Рис. 39. **Ризогенез *ex vitro* павловнії (перше постасептичне живцювання).**

Рис. 40. **Укорінення живців павловнії на 6-у добу за другого постасептичного живцювання.**

Рис. 41. **Саджанці отримані за другого постасептичного живцювання в Р9 через 15 діб після живцювання.**

2.10. Часник

Часник − популярна і корисна овочева культура, на яку є постійний попит. Донедавна Україна масово імпортувала часник, хоч більшість території країни придатна для його вирощування. Одним зі стримуючих факторів нарощування об'ємів вирощування часнику є обмаль вітчизняних високопродуктивних пластичних сортів, а також відсутність налагодженої системи розсадництва.

Виробництво садивного матеріалу ведеться часто на аматорському рівні з розмноженням низьких репродукцій сумнівної якості, спричиняючи різке зниження його врожайності. На сьогодні гостро стоїть проблема отримання з накопиченням під час репродукування збудників хвороб, у т.ч. фузаріоза та вірусів. За вегетативного розмноження при недотриманні технологічних вимог кількість патогенів не лише передається з покоління в покоління, а ще й збільшується відсоток ураженого матеріалу та видовий склад вірусів.

Поширенню вірусів сприяють комахи (найчастіше попелиці), нематоди та часто заходи по догляду. Наприклад, при прополюванні сік із вірусної травмованої рослини може потрапляти на здорову при її травмуванні. Також неприпустим є обрізування сікатором не висохлого листя, що може призвести до 100 % інфікування у перший рік.

Часник уражують більше 10 вірусів. До того ж, значну загрозу для часнику складають не лише типові для цієї культури віруси, а й ті, які уражують інші рослини родини Цибулевих, зокрема, ріпчасту цибулю, цибулю порей, цибулю шалот, а також представників інших ботанічних родин. Небезпечними для часнику є вірус жовтої карликовості цибулі, вірус мозаїки часнику, вірус жовтої смугастості часнику [12].

Вірус – це дрібні неклітинні частки, що складаються з нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) і білкової оболонки. Вони є внутрішньоклітинними паразитами: розмножуючись тільки у живих клітинах, вони використовують ферментативний апарат господаря і переключають його клітини на синтез зрілих вірусних часток – віріонів. Віруси поширені всюди і спричиняють хвороби рослин, тварин і людини. Розміри вірусів коливаються від 20 до 300 нм. У середньому віруси у 50 разів менші за бактерії. Їх неможливо побачити в оптичний мікроскоп, тому що їх розмір менший за довжину світлової хвилі. Віруси складаються з таких компонентів: 1. Віріон, або серцевина, – генетичний матеріал (ДНК або РНК). Генетичний апарат вірусу несе інформацію про декілька типів білка, що необхідні для утворення нового вірусу: ген, що кодує обернену транскриптазу та ін. 2. Білкова оболонка, яку ще називають каспидом. Оболонка часто побудована з ідентичних повторюваних субодиниць – капсомерів. Капсомери утворюють структури з високою симетрією.

Часто запитують: «Маємо 0,5 тонни посадкового матеріалу часнику. Як його оздоровити від вірусів?». На жаль, це майже неможливо. Необхідно використати інший посадковий матеріал, розмножений з безвірусного матеріалу зі збереженням від повторного інфікування.

Якщо з грибними хворобами можна боротися агротехнічними та хімічними методами з використанням фунгіцидів, то дієвих речовин, які знищують віруси у рослині, не існує. Рослинний організм, на відміну від тваринного, не має імунної системи, яка за допомогою антитіл знищує вірусні субодиниці. Фітовірус можна знищити знищивши господаря. Що ж робити?

Основним методом боротьби з вірусними хворобами є отримання і використання здорового, вільного від вірусів садивного матеріалу. У культурі тканини оздоровлений (вільний від фіто- та ентомопатогенів) садивний матеріал можна отримувати і прискорено розмножувати. Звільняють той чи інший сорт або вид від вірусної інфекції добором здорових рослин, термо- та хемотерапією у поєднанні з культурою меристем. Вони застосовуються як окремо, так і в комплексі. Для оздоровлення рослин використовують культуру апексів (культуру апікальних меристем), оскільки у стеблові апекси віруси проникають повільніше, ніж в інші частини рослини. Меристемні клітини, порівняно з паренхімними, є невеликими за розмірами. В апексі відсутні розвинуті провідні судини, що унеможливлює швидкий дальній транспорт вірусів.

Ізолюючи такий апекс, у більшості видів рослин на поживні середовища висаджують невелику частину меристеми 0,5–0,2 мм. Невеликий розмір експланта для мікроклонального розмноження, його поверхнева стерилізація, асептичне перенесення на живильне середовище і субкультивування в умовах, що виключають інфікування, оздоровлюють отримані рослини від нематод, грибних і бактеріальних патогенів. Стосовно ефективності оздоровлення і розміру експланта існує наступна закономірність: чим меншою є величина меристеми, тим більша ймовірність отримання безвірусних рослин.

Біотехнологи уже давно навчилися вирощувати рослини з апікальної меристеми, що складається з конуса наростання й одного або двох листкових зачатків. Можна створити умови і для одержання рослини з тканини лише

конуса наростання (без листкових зачатків). Проте відомо, що чим більший розмір меристемного експланта, тобто чим більше листкових зачатків і тканини стебла він має, тим легше проходить процес морфогенезу, що закінчується одержанням цілої, нормальної пробіркової рослини. Водночас вільна від вірусних часточок зона відрізняється за розмірами для різних вірусів. Обираючи розмір меристемного експланта, необхідно враховувати можливості прийнятого методу одержання максимальної кількості рослин за максимального відсотка безвірусних. Тому перевага надається використанню експланта гранично малого розміру (0,075–0,1мм), і розробляються оптимальні умови для одержання нормальної пробіркової рослини. Іноді надають перевагу поєднанню термотерапії і культури меристем [10].

Нами відпрацьована наступна технологія оздоровлення сортів часнику. На першому етапі проводимо добір та випробування клонів (рис. 42, 43).

Рис. 42. **Добір типових для сорту цибулин з високими урожайними показниками.**

Рис. 43. **Випробування відібраних клонів.**

Другим кроком є закладка матеріалу в термостат для термотерапії (рис. 44).

Рис. 44. **Термостат для термотерапії.**

Це дозволяє зменшити активність вірусів та теоретично збільшити безвірусну зону. Процес термотерапії триває 4–6 тижнів. Температура в перший тиждень поступово збільшують від +30 до +38 ^{0}С.

Після термотерапії зубки обробляють антисептиком (наприклад, Бланідас 300), виокремлюють бруньку (рис. 45) і переносять на предметний столиком мікроскопа, ізолюючи меристему (рис. 46–48).

Ізольовані меристеми висаджуються на штучні живильні середовища з мінеральними та біологічно активними речовинами. Протягом 1–2 місяців з них регенеруються мікророслини (рис. 49, 50). Їх розмножують та тестують (методи ПЛР) на наявність вірусних часток. За результатами тестування залишають безвірусні клони. Пізніше тестування проводять повторно за вирощування рослин у ґрунті.

Із безвірусних вихідних рослин можна отримати розсаду або мікроцибулини (рис. 51, 52). Останні є технологічно кращими, оскільки їх можна накопичувати протягом тривалого часу. Культивування експлантів успішно проводиться на середовищі Данстена і Шорта (BDS) за [13, с.57].

Рис. 45. **Виокремлення бруньки із зубка часнику, що пройшов термотерапію.**

Рис. 46. **Відокремлення останніх криючих листків бруньки.**

Рис. 47. **Брунька під мікроскопом.**

Рис. 48. **Меристема на вістрі інструмента.**

Рис. 49. **Морфогенез меристемного експланта.**

Рис. 50. **Регенерант із меристеми.**

На етапах введеняя та мультиплікації кількість сахарози становить 2–3 %, а за отримання мікроцибулин її вміст збільшують до 6–8 %. Розчин макросолей і Са готують згідно з таблицями 24 і 25.

Рис. 51. **Початок утворення мікроцибулин.**

Рис. 52. **Дозріла мікроцибулина.**

Таблиця 24 – **Кількість макросолей – BDS для приготування маточного розчину (1:40)**

№ п/п	Компонет	Кількість, г/л	Компонет	Кількість, г/л
1	KNO_3	101,2	NH_4NO_3	12,8
2	$MgSO_4$	9,88	$(NH_4)_2SO_4$	5,36
3	NaH_2PO_4	6,88	$NH_4H_2PO_4$	9,2

Таблиця 25 – **Маточний розчин Са – BDS (1:40)**

№ п/п	Компонет	Кількість, г/л
1	$Ca(NO_3)_2xH_2O$	101,2

ЛІТЕРАТУРА

1. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А.Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.

2. Miyazaki J., Tan B. H., Errington S. G. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of Petunia hybrida using Plant Preservative Mixture (PPMTM): PCTOC. 2010. 102(3). P. 365–372.

3. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості використання форми і кількості заліза за вирощування in vitro ожини і малини. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агрономія і біологія. 2015. 9. С. 46–51.

4. Feng Liu, Li–Li Huang, Yang-Li Li, Poula Reinhoud, Maarten A. Jongsma, Cai–Yun Wang. Shoot organogenesis in leaf explants of Hydrangea macrophylla ‘Hyd1’ and assessing genetic stability of regenerants using ISSR markers. Plant Cell Tiss Organ Cult (2011). 104. P:111–117.

5. Общая информация о павловнии. URL: http://denovaagro.com/nasha-produktsiya/dekorativnye-rasteniya/pavlovniya-paulownia/obshhaya-informatsiya-o-pavlovnii.

6. Мацкевич О.В., Лісовий М.М. Особливості розмноження гібриду павловнії (*Paulownia*) *in vitro.* Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез VI Міжнародної Науково-практичної конференції, присвяченої до 120–річчя НУБІП України (14–16 листопада 2017 року, м. Київ). Компринт. С. 218–219.

7. Лісовий М.М., Григорюк Б.П., Мацкевич О.В. Біотехнологічні, фізіологічні та екологічні особливості розмноження гібриду павловнії (Paulownia) в культурі *in vitro.* Матеріали всеукраїнської наукової конференції «Іноваційні агротехнології» (28 бер). Умань, 2018. С. 16–17.

8. Подгаєцький, А. А., Мацкевич В. В., Врублевський А. Т. Використання біоциду PPM як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об’єктів. Вісник Сумського

національного аграрного університету. Серія: Агрономія і біологія, 9. 2016. С. 156–160.

9. Ben A. Bergmann, Heung-Kyu Moon *In vitro* adventitious shoot production in Paulownia. Plant Cell Reports (1997), 16. P. 315–319.

10. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин. Біла Церква: БНАУ, 2010.

11. Перліт. Застосування: в садівництві URL: http://www.perlit.in.ua/applications/agroperlit.

12. Хвороби та шкідники часнику. Каталог. URL: http://www.ukrup.com.ua/uk/khvoroby-shkidnyky-chasnyku-povnyy-kataloh/.

13. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Київ: Наукова думка, 2005. 271 с.

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ОКРЕМИХ ВИДІВ РОСЛИН (ПРОТОКОЛИ ТЕХНОЛОГІЙ)

Науково-практичний посібник

Мацкевич Вячеслав Вікторович
Подгаєцький Анатолій Адамович
Філіпова Лариса Миколаївна

Редактор – **Вергелес І. М.**
Комп'ютерне верстання: **Філіпова Л. М., Мацкевич В. В.**

Білоцерківський національний аграрний університет
РВІКВ, Сектор оперативної поліграфії БНАУ,
площа Соборна, 8/1, м. Біла Церква.

Здано до складання 29.03.2019. до друку 22.04. 2019.
Формат 60х84 $^{1}/_{16}$. Папір офсетний №1. Гарнітура Times New Roman.
Друк офсетний. Ум. друк. арк. 4,94. Тираж 300. Зам.