

**В.В. Мацкевич, Н.В. Кравченко, А.А. Подгасцький,
О.В. Мацкевич, О.П. Шита, М.О. Гнітецький**

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН



Навчально-методичний посібник

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ АГРОТЕХНОЛОГІЙ ТА ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ФІТОФАРМАКОЛОГІЇ

**В.В. МАЦКЕВИЧ, Н.В. КРАВЧЕНКО, А.А. ПОДГАСЦЬКИЙ,
О.В. МАЦКЕВИЧ, О.П. ШИТА, М.О. ГНІТЕЦЬКИЙ**

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

Навчально-методичний посібник

Суми
Редакційно-видавничий відділ СНАУ
2023

УДК 378.6:63(477.52) (06)

М59

*Рекомендовано до видання навчально-методичною радою факультету
агротехнологій та природокористування СНАУ
(протокол № 10 від 17 квітня 2023 р.)*

Рецензенти:

Іщук Л.П., доктор біологічних наук, професор кафедри лісового господарства БНАУ
Скляр В.Г., доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри екології та ботаніки СНАУ

**Мацкевич В.В., Кравченко Н.В., Подгасцький А.А., Мацкевич О.В.,
Шита О.П., Гнітецький М.О.**

**«Мікроклональне розмноження рослин» / Мацкевич В.В., Кравченко
Н.В., Подгасцький А.А. та ін. – Суми, 2023 – 215 с.**

ISBN 978-617-593-062-5

М59

Навчально-методичний посібник містить навчальний матеріал
рекомендований студентам 2-3 курсів, аспірантам університету спеціальності
162 «Біотехнології та біоінженерія», 201 «Агрономія», 205 «Лісове
господарство», 206 «Садово-паркове господарство», 101 «Екологія» денної
та заочної форми навчання. Спрямоване на отримання навичок, розуміння та
базових знань з питань мікроклонального розмноження рослин на різних
культурах. Особлива увага приділена генетичним та фізіологічним основам
мікроклонального розмноження, детермінантам онтогенезу *in vitro*,
оздоровленню рослин та етапам мікроклонального розмноження рослин.
Посібник складається з 3 частин: теорії та практикуму, прописів протоколів
при роботі з різними культурами.

УДК 378.6:63(477.52) (06)

© Колектив авторів

© Редакційно-видавничий відділ СНАУ, 2023

ISBN 978-617-593-062-5

Зміст

ЧАСТИНА ПЕРША: ТЕОРІЯ

I.	МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ, ЯК СКЛАДОВА	8
	БІОТЕХНОЛОГІЇ (ВСТУП)	
II	ГЕНЕТИЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ	13
	МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ	
2.1.	Онтогенез рослинного організму	13
2.2.	Тотипотентність, диференціація та дедиференціація	14
2.3.	Феномен ювенілізації в умовах <i>in vitro</i>	18
III.	ДЕТЕРМІНАНТИ ОНТОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i>	20
3.1.	Гормональні детермінанти	21
3.2.	Ауксини	24
3.3.	Цитокініни	27
3.4.	Правило Скуга - Мілера	30
3.5.	Гібереліни	33
3.6.	Етилен та абсцизова кислота	36
3.7.	Нововідкриті гормони	38
3.8.	Трофічні детермінанти	40
3.8.1.	Мінеральні макроелементи	40
3.8.2.	Мезоелементи	44
3.8.3.	Мікроелементи метали	47

3.8.4.	Мікроелементи не метали та специфічні мінеральні елементи	47
3.9.	Органічні компоненти середовищ	51
3.9.1.	Первинні метаболіти та їх синтетичні аналоги	52
3.9.2	Вторинні метаболіти	54
3.10.	Гелеутворювачі	57
3.11.	Детермінанти ендегенної природи	59
3.11.1.	Генотип рослин	59
3.11.2.	Фізіологічний стан донорів та первинних експлантів	60
3.12.	Детермінанти фізичної природи	62
3.12.1.	Світло	62
3.12.2.	Температура, осмотичний тиск, та інші фізичні фактори	65
IV.	ОЗДОРОВЛЕННЯ	67
4.1.	Особливості боротьби з вірусами	67
4.2.	Отримання безвірусних первинних експлантів	69
4.2.1.	Термо- та хемотерапія	70
4.2.2.	Культура меристем	70
4.2.3.	Експертиза якості оздоровлення. ПЛР	73
V.	ЕТАПИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ	77
5.1.	Підготовчий етап	77

5.2.	Отримання асептичної морфогенної культури на першому етапі мікроклонального розмноження	78
5.3.	II мультиплікація (живцювання)	79
5.4.	III індукція ризогенезу	82
5.5.	Постасептична адаптація	83
VI.	РІЗНОВИДИ МКР	85
6.1.	Методи з непрямим морфогенезом	85
6.2.	Штучне насіння	86
6.3.	Погружні культури	88
6.4.	Фотоавтотрофний метод	92
VII.	ЮРИДИЧНІ ТА ЕКОНОМІЧНІ АСПЕКТИ МКР	95
7.1.	Юридичне регламентування розмноження рослин	95
7.2.	Регламентування якості	97
<u>ЧАСТИНА ДРУГА: ПРАКТИКУМ</u>		
I.	ФІТОБІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ МЕНЕДЖМЕНТ	101
1.1.	Типи лабораторій.	101
1.2.	Основні структурні підрозділи лабораторії мікроклонального розмноження	102
II.	АСЕПТИКА	106
2.1.	Основні теоритичні відомості	106
2.2.	Антисептика, дезінфекція	108

2.3.	Стерилізація живильного середовища	109
2.4.	Стерилізація інструментів та дезінфекція лабораторного простору	112
2.5.	Асептика ламінарного боксу	117
III.	ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ	119
3.1.	Підготовка донорів та початкові роботи з первинними експлантами	119
3.2.	Деконтамінація рослинних об'єктів	120
IV	ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА	122
4.1.	Компоненти живильних середовищ	122
4.2.	Приклад приготування живильного середовища	122
4.2.1.	Перерахунок гідратів	122
4.2.2.	Приготування маточних розчинів	125
4.2.3.	Приклад приготування живильного середовища	127
V.	ВИДІЛЕННЯ МЕРИСТЕМ	129
VI	МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ	132
6.1.	Непрямий морфогенез	132
6.2.	Прямий морфогенез, живцювання	137
VII	ПАТОФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН <i>IN VITRO</i>	138
7.1.	Типи факторів, які викликають патології	138
7.2.	Патологічні фізіологічні зміни викликані факторами ендогенної природи	139

7.3.	Абіотичні фактори патофізіології рослинних об'єктів <i>in vitro</i>	142
8.	ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ	147

ЧАСТИНА ТРЕТЯ

	ПРИКЛАДИ ПРОТОКОЛІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОКРЕМИХ ВИДІВ РОСЛИН	152
I.	ХОСТА	152
II.	КАРТОПЛЯ	161
III.	ЧАСНИК	165
IV.	МАЛИНА	172
V.	ОЖИНА	179
VI.	АКТИНІДІЯ	183
VII.	ПАВЛОВНІЯ	189
VIII	МИГДАЛЬ	200
IX	ФУНДУК	204
	Список використаних джерел	210

I. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ, ЯК СКЛADOVA ФІТОБІОТЕХНОЛОГІЇ (ВСТУП)

Мікроклональне розмноження (далі МКР) є частиною технологій з використанням біологічних об'єктів, а саме рослинних клітин, тканин та органів.

Залежно від іноваційних та комерційних потреб МКР може бути, як окремою галуззю так і складовою біотехнологічної науки, виробництва. Це наприклад, технології діагностики та оздоровлення, розмноження методами прямого і не прямого морфогенезу, які застосовуються самостійно. МКР також інтегрована в комплекси із іншими біотехнологічними напрямками. Це зокрема і поєднання з технологіями пов'язаними зі створенням рослин зі зміненим геномом, тобто трансгенна і нетрансгенна селекція забезпечує масштабне і швидке впровадження у виробництво нових сортів, гібридів та форм.

Метою навчальної дисципліни «Мікроклональне розмноження» є набуття студентом знань щодо життєвих процесів у рослині та їх детермінант, а також умінь і навичок щодо шляхів регулювання ними для досягнення бажаних виробничих потреб у галузях, пов'язаних з рослинними об'єктами.

Згідно вимог освітньо-професійних програм «Біотехнології та біоінженерія», «Агрономія», «Садово-паркове господарство», «Лісове господарство» здобувачі набувають здатності отримувати наступні компетентності:

- знання та розуміння предметної області та розуміння професійної діяльності;
- здатність застосовувати знання у практичних ситуаціях;
- прагнення до збереження навколишнього середовища;
- навички здійснення безпечної діяльності;
- здатність розмножувати та вирощувати посадковий матеріал сільськогосподарських, декоративних та лісових рослин у асептичних та постасептичних умовах;

- здатність оцінювати, інтерпретувати та синтезувати теоретичну інформацію і практичні, виробничі й дослідні дані у галузях аграрного бізнесу, науки пов'язаних з масштабним виробництвом високоякісного садивного матеріалу із заданими спадковими ознаками.

Біотехнологія – це технологічні процеси з використанням біологічних об'єктів. Це можуть бути клітини, тканини, окремі органи, чи цілісні організми, якщо біологічні об'єкти є рослинного походження, то тоді це біотехнологія рослин, або **фітобіотехнологія**, в ній ще виокремлюють напрямки біотехнології деревних видів - **дендробіотехнологія**.

Основою біотехнології рослин є метод культивування ізолюваних клітин, тканин та органів *in vitro*. Він дозволяє використовуючи ізолюваний стан об'єктів культивування в умовах *in vitro* керувати диференціацією та морфогенезом рослини, спрямовувати їх на досягнення визначених цілей, проводити генетичну трансформацію.

In vitro – вирощування рослинних об'єктів “у склі” (наприклад, у пробірці, колбі, біореакторі) на штучних поживних середовищах в асептичних умовах. *Власне “скло” в сучасних технологіях все частіше замінюють на інші прозорі матеріали (рис. 1), наприклад поліпропілен. Перехід на вказані матеріали має низку переваг: зменшення ваги; відсутність потреби у зворотньому трафіку використаної тари (культуральних ємностей), спрощення утилізації.*



Рис. 1. Культуральні ємності виготовлені з різних матеріалів:

1 - скло; 3, 4- різні види пластику; 4 - поліетиленова плівка.

У біотехнології існують дві групи методів:

1. Селекційні (соматична гібридизація, соматичний мутагенез, генетична інженерія та інші).
2. Методи прискореного розмноження, в тому числі мікроклональне розмноження.

Мікроклональним розмноженням (МКР) називають масове, вегетативне розмноження рослин у культурі тканин і клітин, за якого регенеровані рослини генетично ідентичні вихідному екземпляру.

Основою МКР є **тотипотентність**. Це тотожність за генотипом усіх клітин багатоклітинного організму та здатність окремої клітини давати початок цілому новому організму шляхом поділу зі збереженням генетичної ідентичності.

Переваги комерційного мікроклонального розмноження:

1. Високі коефіцієнти розмноження, які за виключенням невеликої кількості видів досягаються лише МКР. Звичайними методами вегетативного розмноження отримують від однієї материнської рослини, від десятків до декількох сотень клонів тоді, як за МКР може бути до декількох десятків мільйонів регенерантів.

2. Можливість вегетативно розмножувати види, які в природі розмножуються лише генеративним способом.

3. За отримання асептичних культур та якісної діагностики отримують вільні від збудників клони, тобто оздоровлюють той чи інший сорт, форму, гібрид.

4. Можливість розмножувати і вирощувати рослинні об'єкти, які не ростуть у нашому кліматі. Наприклад, рослини або калюсні культури женьшеню.

5. Розмноження відбувається не залежно від сезону.

6. Порівняно зі звичайними методами вихідних рослин для розмноження потрібно менше у десятки разів.

7. Значно менші площі, потрібні для отримання, відбору і вирощування рослин на початкових етапах розмноження.

8. Контроль, регулювання та можливість оптимізації умов вирощування.

9. Збереження генетичної ідентичності отриманих клонів.

10. Покращення регенеративних властивостей, ювенілізація посадкового матеріалу.

11. Спрощення процедури проходження митного контролю у випадку пересилки матеріалу *in vitro*, або відмитого і упакованого у форматі “голий корінь”.

У науковому та комерційному МКР користуються низкою специфічних термінів. Зокрема, найбільш часто вживані такі терміни: клон, експлант, субкультивування, *in vitro*, *ex vitro*, пасаж, коефіцієнт розмноження.

Клон (грец. klon – «гілка») потомство отримане в результаті вегетативного розмноження генетично ідентичне материнському організмові. **Клонування** - це система методів, що застосовуються для отримання клонів.

Для швидкого розмноження клонуванням рослинного об'єкта взятого з польових умов, з природних умов (*in situ*), або змінених *in vitro* трансгенними і не трансгенними методами необхідна жива частина організму, тобто **експлант** який містить генетичну інформацію про весь організм і здатний відтворити рослинний об'єкт: групу клітин, тканину, орган і організм уцілому. В рослині найменшою такою одиницею є клітина. В її органоїдах а саме в ядрі, хлоропластах та мітохондріях містяться нуклеїнові кислоти - носії генетичної інформації про весь організм.

Експланти, які ізолюються з материнських рослин, які ростуть у нативних умовах для введення *in vitro* називають **первинними експлантами**.

Як первинний експлант у МКР найчастіше використовують верхівкові меристеми, тому такий метод ще називають **«культурою меристем»**.

Меристеми – це загальна назва для тканин рослин, які складаються з клітин, що інтенсивно діляться й зберігають фізіологічну активність протягом усього життя, забезпечуючи безперервне наростання маси рослини та надаючи матеріал для утворення спеціалізованих тканин.

Можливі випадки, коли в клітину-експлант донора переносять синтетичну нуклеїнову кислоту, або генетичний матеріал з іншого донора. Зокрема, в дослідженнях з клонування вимерлих видів тварин, рослин існує ймовірність трансплантації носіїв генетичної інформації із представників загиблих особин в клітини близьких біологічних видів. Наприклад, перенесення ДНК мамонта ізольоване з тіл тварин знайдених у вічній мерзлоті і перенесене в клітини слона з подальшим клонуванням.

Перенесення клітин, експлантів, регенерантів в інший культуральний посуд на свіже поживне середовище називають **субкультивуванням**. Період від висадки рослинного об'єкта на середовища до чергового субкультивування є **періодом культивування *in vitro***. Схожим на перший погляд терміном є “пасажі” - багаторазові послідовні розмноження біологічних об'єктів у культурі тканин на штучних живильних середовищах. Нульовим пасажем зазвичай називають етап первинної культури з первинного експланта, наприклад ізольованого із рослини, що росла в нативних умовах. Відмінність в термінах полягає в тому, що субкультивування може бути, як послідовна пересадка рослинних об'єктів на “свіжу порцію” середовища тоді, як при пасажуванні передбачається розмноження.

II. ГЕНЕТИЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ОСНОВИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

2.1. Онтогенез рослинного організму

Розвиток індивідуально кожного рослинного організму відбувається, згідно поступової вибіркової експресії генів його геному. Результатом її фізіолого-біохімічні і морфологічні зміни. Сукупність цих генетично зумовлених змін в організмі починаючи від його виникнення із зиготи, спори або спеціалізованого вегетативного зачатка до природної смерті у звичайних умовах середовища, позначають поняттям життєвого циклу, або **онтогенезу**. Онтогенез має 4 періоди: 1) ембріональний; 2) ювенільний; 3) репродуктивний (генеративний); 4) старість.

Ембріональний період проходить ще на материнській рослині і триває від утворення зиготи до завершення формування насіння. Ембріональний період в умовах *in vitro* може розпочинатися штучно без участі спеціалізованих генеративних органів. Наприклад, після злиття протопластів чи індукції соматичного ембріогенезу калюсних клітин. **Соматичний ембріогенез** – це утворення в калусній, або суспензійній культурі біполярних структур ембріодів. Два полюси ембріодів це є два полюси на осі зачатків кореня - та пагона. Ембріогенез є основою технологій створення штучного насіння.

Ювенільний період – починається з проростання насіння, або органів вегетативного розмноження і характеризується швидким накопиченням вегетативної маси. Рослини в цей період не здатні до статевого розмноження. Їм притаманна висока регенеранційна здатність. Більшість технологій мікроклонального розмноження передбачає культивування рослинних об'єктів в ювенільному стані. У випадках введення експлантів з донорів, які знаходяться в генеративному стані відбувається **реювенілізація**. Це активація в дорослому організмі процесів характерних для ранніх періодів онтогенезу: ювенільного та ембріонального, тобто “повернення до дитинства”. Ювенільність *in vitro*

підтримується гетеротрофним живленням, гормонами стимулюючої дії (цитокініни та ауксини).

У генеративному періоді відбувається формування генеративних органів і становить основну частину формування насіння. В такому стані здатність до регенерації і вегетативного розмноження знижується.

Завершується онтогенез сенильним періодом, тобто періодом старості.

Протягом онтогенезу відбувається виникнення, ріст і розвиток органів, систем і частин тіла організмів. Цей процес називають **морфогенез**, а формування окремих органів, - **органогенез**. У рослин формування і розвиток органів (кореня, стебла, листків, квіток) відбувається у процесі онтогенезу з ділянки недиференційованої твірної тканини – меристеми.

У мікроклональному розмноженні виділяють прямий і непрямий морфогенез. Прямий – утворення органів, регенерантів із експлантів шляхом активації меристем, а непрямий – із первинного, чи субкультивованого калюсу.

2.2. Тотипотентність, диференціація та дедиференціація

Кількісні (ріст) і якісні зміни (розвиток, в т.ч. і морфогенез) тісно пов'язані в онтогенезі між собою. Первинним є збільшення кількості і розмірів клітин, тобто ріст. Поділ клітин є первинним і найголовнішим оскільки без нього самі поняття розтягнення клітин та їх диференціації втрачають сенс. Ріст за рахунок мітозів поволі переходить у ріст за рахунок збільшення розмірів клітин, що супроводжується їх спеціалізацією. Початок диференціації за своїм змістом є проявом морфогенезу на клітинному рівні, який дещо пізніше виходить на тканинний і в решті-решт виливається у формування вегетативних і генеративних органів. Морфогенез пов'язаний виключно з меристемами і синтетичними процесами.

Поняття росту необхідно сприймати у широкому сенсі цього слова. Це означає, що ріст можна схематично описати сумою кількох векторів, які

визначають його напрямки. Під впливом різних детермінант величини змінюються таким чином, щоби вповільнити один напрямок, а інший і його кінцевий результат стимулювати. Наприклад, зменшення висоти рослини може супроводжуватися збільшенням товщини її стебла, ширини листків, змінами в утворенні бічних коренів, кореневих волосків тощо, або замість одного товстого пагона утворюється конгломерат менших пагонів за рахунок масового пробудження бічних бруньок.

Детермінант (*determinans, determinatio*) з латинської переводиться, як «той, що визначає, обмежує», тобто чинник, який визначає, або обмежує. Детермінанти *in vitro* є найбільш дієвими чинниками спрямування життєвого циклу біологічних об'єктів і такими, які піддаються регулюванню, згідно технологічних потреб.

Детермінація розвитку – набуття клітиною, органом або організмом стану готовності до розвитку по визначеному шляху, що одночасно супроводжується обмеженням можливостей розвитку в інших напрямках. У період детермінації онтогенезу створюються необхідні внутрішні умови для наступної морфологічної реалізації певного напрямку розвитку. Вважають, що найбільш активна детермінація екзогенної природи властива першим етапам процесу розвитку. Подальший вплив детермінант відбувається на фоні зкоординованих внутрішніх механізмів.

Оскільки фітобіотехнологія є технологічним процесом з використанням рослинних об'єктів, то керування цими об'єктами відбувається саме шляхом застосування впливу різних детермінант. Найчастіше, це синтетичні гормони, трофічні компоненти живильних середовищ, світло, температура, склад повітря та інше.

Таким чином рослинний об'єкт має ряд шляхів свого морфогенезу в межах геному. **Геном** – сукупність спадкового матеріалу, укладеного в клітині організму одного ботанічного виду. Геном містить біологічну інформацію, необхідну для побудови та підтримки організму. **Генотип** – сукупність генетичної інформації окремого організму. Разом із чинниками довкілля

визначає фенотип організму. Деякі гени проявляються у фенотипі лише у певних умовах, тобто відбувається **генетична детермінація**. У процесі детермінації виявляється, який із можливих типів розвитку буде реалізовано. Цей момент залежить від активізації тих, чи інших генів у певний час відповідно ендо - та екзогенних детермінант.

У технологіях МКР дотримуються заходів, щоб усі клітини були тотожними за генотипом, тобто збереження генетичної константності матеріалу, який розмножують клонуванням. Тотожність за генотипом усіх клітин організму, та їх здатність до реалізації генетичної інформації у всіх властивих, як окремої клітини, так і цілісного організму біохімічних, фізіологічних та морфологічних ознак називають **тотипотентністю** (від лат. *totus* – весь, цілий і *potentilla* – сила) або **омніпотентністю**. Завдяки, тотипотентності з експланта у стані однієї частинки, або навіть клітини, вегетативного органу (у рослин, що культивуються в штучно створених умовах, можна отримати цілий організм. Утворення, регенерація цілого організму із експланта поряд із ростом і збільшенням кількості клітин відбувається завдяки їх морфогенезу. Основою морфогенезу є диференціація клітин.

У будь якій клітині більшість генів репресована і тільки частина з них депресується за дії певних детермінант. Клітинна диференціація у процесі розвитку виникає, як результат диференціальної активності генів, яка пов'язана зі складними ядерно-цитоплазматичними співвідношеннями, які ускладнюються у процесі розвитку.

Основою диференціації активності генів на тканинному рівні, яка приводить до формування органів, є гетерогенність клітинних популяцій та взаємодія несхожих між собою клітин.

З точки зору генетики диференціювання клітин - це процес активації одних ділянок хромосом і дезактивації інших, тобто компактна упаковка, або розкручування ділянок хромосом, що робить їх доступними для зчитування спадкової інформації. У кон'югованому стані, коли гени упаковані в

гетерохроматин, зчитування неможливе, а в розправленому вигляді потрібні ділянки генетичного коду стають доступними для інформаційної РНК і подальшої експресії. Отже, диференціювання клітин - це довільно регульована типізація однотипної упаковки хроматину.

Копіюванню підлягають не тільки активні ділянки хромосом, а й кон'юговані, тому в тканинах диференційовані клітини після ділення дають дві нові дочірні клітини, що мають генетичний матеріал, аналогічний повному соматичному набору хромосом. Однак диференціюватися в інші клітини вони нездатні, оскільки не можуть мігрувати природним шляхом в інші умови існування, тобто до інших детермінант диференціювання.

Управління процесами морфогенезу, диференціації, дедиференціації, росту та розвитку у експлантованих об'єктах, культивованих клітинах та тканинах здійснюється через варіювання якісного та кількісного складу компонентів живильних середовищ, зокрема, фітогормонів, вітамінів, вуглеводів, а також різноманітних технік експлантації і трансплантації, умов культивування.

Після проведення необхідної трансформації рослинних об'єктів у більшості технологій (окрім клітинних суспензій, калюсних культур) у них індукують процеси диференціації. **Диференціювання** – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими і дочірніми клітинами. Проявляється морфологічними, фізіологічними, біохімічними змінами клітин, іншими словами клітини набувають «спеціалізації».

Будь яка соматична клітина являє собою інтегровану частину організму, виконує вузькоспеціалізовані функції, але у той же час несе у собі частини цілісного організму. Щоб з клітини, експланту, які набули спеціалізації відтворити цілісний організм необхідно “перезапустити” генетичну програму і отримати клітини подібні до клітин твірних тканин (наприклад, калюсу, камбію, меристем) з яких відбувається формування інших тканин, тобто

відбувається втрата набутої “спеціалізації” (диференціації) клітин, тканин. Цей процес є зворотнім дефінанціяції і називають його дедиференціацією.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих клітин до втрати спеціалізації (диференціації), активація їх поділу. Наприклад, з спеціалізованих клітин мезофілу листка утворюються клітини калюсу, які не є спеціалізованими. Індукція процесів дедиференціювання передбачає перепрограмування геному і його повернення до стану, характерного для проліферуючих клітин, тобто “ювенілізацію”.

Недиференційованою тканиною є **калюс** (калус). У природних умовах калюс розвивається на раневих поверхнях, у культурі *in vitro* виникає при культивуванні окремих клітин, або шматочків тканин. Калюс *in vitro* може утворюватися спонтанно, внаслідок зміни трофічно-гормонального балансу, або індукуватися спеціальним складом живильного середовища та за дії травматичного ефекту, отримані калюси використовують для трансформацій (клітинна селекція), або для вирощування калюсних культур. Калюсним культурам властиве явище **проліферації клітин**. Це процес розростання тканини через поділ та ріст клітин організму. Проліферація клітин відбувається шляхом поєднання росту клітин із регулярними клітинними циклами.

2.3. Феномен ювенілізації в умовах *in vitro*

Протягом всього онтогенезу залежно від його періоду відбувається регулювання експресії необхідних генів, що впливає на морфологічні та фізіолого-біхімічні процеси рослинного організму. Під **регуляцією експресії генів** вважають складну сукупність молекулярних механізмів, завдяки яким клітини можуть збільшувати, або зменшувати кількість продуктів експресії певних генів (РНК або білків) у відповідь на зміну зовнішніх умов і факторів. Регуляція експресії дозволяє існування різних фенотипів у клітин, що мають ідентичні геноми.

За часом експресії під час онтогенезу виділяють “ранні” та “пізні” гени. Зокрема є гени експресія, яких відбувається в ювеніальному періоді, а в наступних вони репресуються.

Одна з особливостей МКР – ювенілізація тканин та підтримання цього стану, що є причиною легкості мультиплікації та ризогенезу *in vitro*. На відміну від тваринних, рослинним організмам властиве, за особливих умов, повернення до програм генетичного регулювання, які є на ранніх етапах розвитку. Набуття, чи втрата ознак ювенільності, зміна регенераційного потенціалу - це особливості реакції рослин на культивування *in vitro*, які притаманні усім етапам МКР.

На практиці, щоб було успішне введення того чи іншого об'єкту *in vitro* та ефективно його культивування він має бути в ембріональному, або ювенільному стані. Однак досить часто є потреба використовувати в якості первинних експланти рослин, що знаходяться на пізніх періодах онтогенезу. В цей час після закладання генеративних органів активність верхівковим меристем затухає, або вони взагалі зникають, тому отримання асептичної культури застосовують ряд заходів, щоб індукувати в експлантах ізольованих з таких донорів процеси експресії “ранніх” генів онтогенезу, тобто запустити процеси ювенілізації.

В експлантів ізольованих зі старих рослин складно отримати культури з високими регенераційними властивостями, тому застосовують заходи ступінчастої ювенілізації (омолодження). Наприклад, проводять омолоджуючу обрізку, або щеплення на молоді сіянці, а вже потім з таких донорів ізолюють первинні експланти.

Отже, **ювенілізація** це повернення рослинних об'єктів до ранніх періодів онтогенезу шляхом створення умов для експресії генів властивих цим періодам. Тотожним терміном **ювенілізації** є **омолодження**.

III. ДЕТЕРМІНАНТИ ОНТОГЕНЕЗУ *IN VITRO*

Основний регуляторний механізм онтогенезу – реалізація генетичної програми (спадкової інформації) на різних стадіях розвитку організму, що є в кожній клітині. Ця програма здійснюється частково: розвиваються ознаки і властивості, для яких є сприятливі умови. В процесі росту і розвитку гени активуються один за одним у певній послідовності. Відбувається вибіркова експресія окремих груп генів. Наприклад, для експлантів мигдалю було встановлено, що гени, які кодують білки, пов'язані з синтезом і процесингом білка, а також з метаболізмом азоту і вуглецю, були диференційовано експресовані на ранній стадії, тоді як гени, які кодують білки, що беруть участь у порятунку і захисті рослинних клітин, а також взаємодії з навколишнім середовищем, були в основному знайдені на пізній стадії

Завдяки регуляції експресії генів відбуваються такі складні явища, як клітинна диференціація та морфогенез. При застосуванні відповідних екзогенних сигналів меристематичні та диференційовані рослинні клітини в культурі *in vitro* під дією детермінант здатні змінювати свій онтогенез. Із декількох можливих шляхів розвитку в межах генотипу один активується інші вповільнюються, або гальмуються (рис. 2).

На рослинний об'єкт і відповідно на шлях його розвитку діють групи детермінуючих

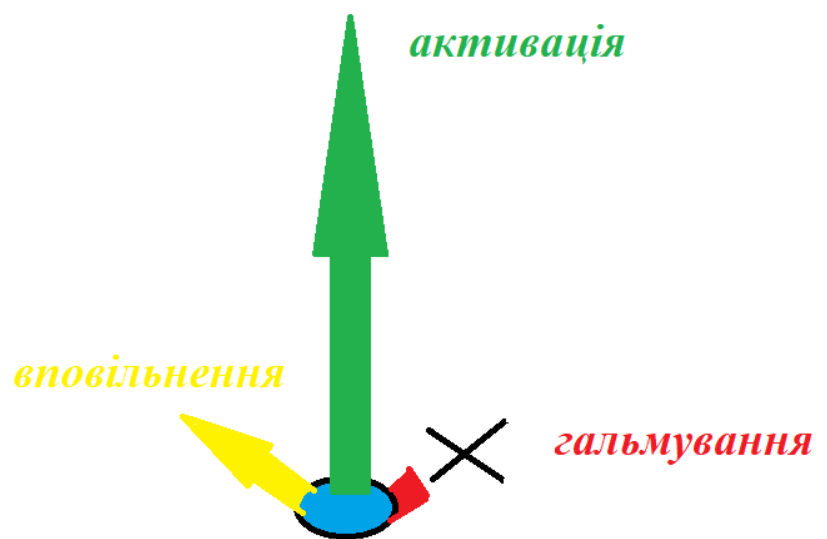


Рис. 2. Вплив детермінант на прояв можливих факторів: гормональні, шляхів онтогенезу

трофічні, фізичні. *In vitro* їх походження може бути, як ендогенного в т.ч. передане від донора експлантів так і екзогенного. Взаємодія детермінант відбувається у вигляді синергізму, антогонізму та індиферентно.

Детермінанти поділяють на такі групи: гормональні, трофічні, фізичні; а за походженням: ендогенні та екзогенні.

3.1. Гормональні детермінанти

In vitro індукують ті процеси, які необхідні, згідно технологічних потреб. Наявність лише ендогенних гормонів недостатньо у культивованих тканинах рослин для більшості технологій культивування, тобто застосовують гормональну та інші детермінацію розвитку рослинних об'єктів.

Є такі групи фітогормонів: «класичні» (ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизини, етилен) та «нововідкриті» (жасмонати, брасиностероїди, саліцилова кислота). Серед “класичних груп” ауксини, цитокініни, гібереліни стимулюючої дії, а етилен і абсцизини є інгібіторами.

Фітогормони, їх синтетичні аналоги та прогормональні сполуки ефективні в надзвичайно малих кількостях (від сотих до декількох міліграм на літр живильного середовища) для керування онтогенезом біологічних об'єктів у біотехнологічних процесах, як з науковою так і комерційною метою. Рослинним гормонам властива багатовекторність дії, тобто вони впливають одночасно на низку процесів. Додаючи в живильне середовище гормони, враховують ефекти їх взаємодії щодо впливу на онтогенез рослинних об'єктів.

У складі живильних середовищ найбільш поширені групи гормонів, або їх синтетичних аналогів стимулюючої дії: ауксини, цитокініни та менш поширені гібереліни (табл. 1). Гормони інгібітори (абсцизини, етилен) рідко застосовують. Синтез регенерантами етилену може бути навіть шкодити технологічному процесу.

Фітогормони призводять до репресії одних генів, утворення білків-ферментів для попереднього етапу й одночасно експресії інших генів, які відповідають за розгортання процесів метаболізму, морфогенезу (рис. 3., табл. 2). Гормони здатні переміщуватися по рослині на далекі відстані, так і міжклітинні та внутрішні регулятори близької дії. Проте для індукції генетичних програм недостатньо наявності лише гормонів. Необхідно, щоб у

рослинному організмі були компетентні рецепторні ділянки (сенсорні зони та клітини мішені).

Таблиця 1.Регулятори росту, які використовуються за культивування тканин і клітин рослин

Клас фітогормонів	Назва	Скорочена назва
Ауксини	Індоліл-3-оцтова кислота	ІОК
	3-Індолілмасляна кислота	ІМК
	1-Нафтилоцтова кислота	НОК
	2,4–Дихлорфеноксоцтова кислота	2,4-Д
Цитокініни	6-Бензиламінопурин	БАП
	N-Ізопентениламінопурин	2-іР
	Кінетин (6-фурфуриламінопурин)	К
	Зеатин	Зеа
	Тідіазурон	TDZ
Гібереліни	Гіберелова кислота 3	ГК3
	Гіберелова кислота 4	ГК ₄
	Гіберелова кислота 7	ГК ⁷

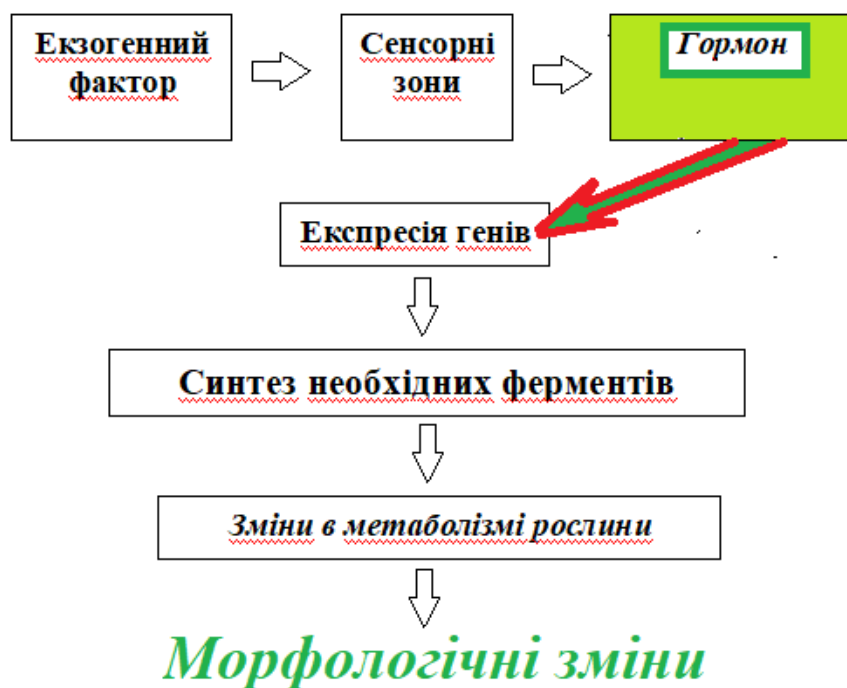


Рис. 3. Приклад зміни метаболізму, морфогенезу рослинних об'єктів залежно від гормонів

Таблиця 2. Ефекти застосування окремих фітогормонів

Гормон	Ефект у культурі тканин
Ауксини	Формування меристем, адвентивних коренів
	Індукція ембріогенезу
	Поділ клітини
	Утворення та ріст калюсів.
	Пригнічення відростання пазушних бруньок.
Цитокініни	Формування придаткових пагонів
	Гальмування утворення придаткових коренів.
	Поділ клітини.
	Утворення та ріст калюсів.
	Стимуляція відростання пазушних бруньок.
	Гальмування розтягування пагонів.
	Гальмування старіння листя.
Гібереліни	Видовження пагонів
	Звільнення від стану спокою в насінні, соматичних ембріонах,

	верхівкові бруньки і цибулини.
	Гальмування утворення придаткових коренів.
	Інгібітори синтезу сприяють коренеутворенню.
	Сприяють утворенню бульб, цибулин, клубнецибулин
Етилен	Старіння листя, бруньок.
	Дозрівання плодів
	Сприяння або гальмування випадкових регенерація (в залежності від часу застосування або генотипу).
Абсцизини	Дозрівання соматичних ембріонів.
	Полегшення акліматизації.
	Формування цибулин і бульб.
	Сприяння розвитку періоду спокою

3.2. Ауксини

Історія відкриття. Ауксини були відкриті раніше від усіх інших рослинних гормонів, у 20-х рр. XX ст. Ганс Фітting (Johannes (Hans) Theodor Gustav Ernst Fitting) виявив у пилку орхідей речовину, яка стимулювала формування зав'язі. Пізніше цю речовину назвали ауксином. Дослідники Утрехтського університету за участі Арьє Жана Хаген-Смита (Arie Jan Haagen-Smit) у 1934 році, ідентифікували речовину β -індолілоцтову кислоту. Вперше вона була виявлена в сечі людини, а вже потім у рослинному матеріалі.

Фізичні та хімічні властивості: Найбільш поширені представники (рис. 4) індолілоцтова, ІОК ($C_{10}H_9NO_2$, назва латиницею Indole-3-acetic acid, IAA), та індоліл масляна ($C_{12}H_{13}NO_2$ назва латиницею Indole-3-butyric acid, IBA), ІМК, рідше нафтилоцтова кислоти, НОК. Порошки білого із жовтуватим відтінком кольору. При температурі 20-50° С і рН від 5 до 9 стабільний до гідролізу. Розчиняються в спирті та 1,0 М розчинах лугів (KOH, NaOH). Фотолітично малостійкі. На світлі руйнуються (період напіврозпаду - менше доби). ІМК менше підлягає руйнуванню в тканинах і застосовується для індукції коренеутворення.

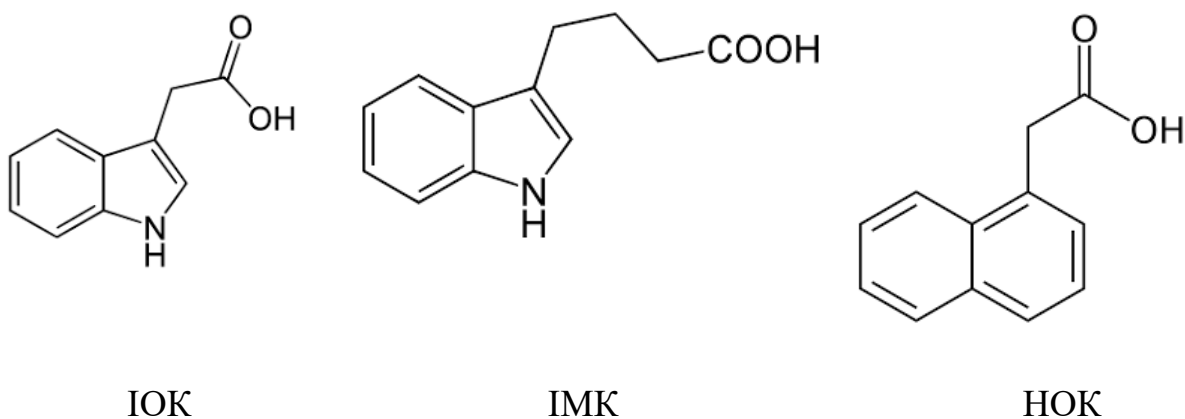


Рис. 4. Ауксини

Метаболізм ауксинів. Синтетичні аналоги ауксинів у рослинних об'єктах є вихідними речовинами для синтезу ендогенної індоліл-3-оцтової кислоти (C₁₀H₉O₂N). Регуляція біосинтезу ІОК відбувається на генетичному рівні, а також завдяки зміні активності ферментів, які беруть участь в її утворенні, присутності інгібіторів цих ферментів, наявності попередника – триптофану, дією інших біологічно активних речовин. ІОК, яка утворилася в рослині, або була введена ззовні, може підлягати ферментативному розщепленню, або ж переводитися в неактивні (зв'язані) форми. Обидва процеси приводять до виникнення в рослині концентраційних градієнтів вільної ІОК. Із зв'язаного стану ІОК може знов переходити у вільну форму.

Ендогенні ауксини синтезуються в апексах пагонів і частково в молодих ростучих листках. Основний *транспорт* цих гормонів відбувається по ксилемі базипетально від верхівки пагона до кореня. Однак можливий і не направлений транспорт по флоемі, що важливо при поглинанні екзогенних ауксинів із живильного середовища.

Синтетичні аналоги. Є 3 групи аналогів ІОК:

1. Похідні індолу – індоліл-3-пропіонова кислота (ІПК) та індоліл-3-масляна кислота (ІМК) рідко зустрічаються у природі, але мають певну ауксинову дію. ІМК менше підлягає руйнуванню в тканинах і застосовується для індукції коренеутворення. Отриманий ряд аліфатичних гомологів ІОК з парною і непарною кількістю атомів С у бічному ланцюгу в С-3-положенні. З подовженням бічного аліфатичного ланцюга ауксинова активність швидко втрачається, крім того, активність гомологів вища, якщо ланцюг містить парну кількість атомів С.

2. Хлорзаміщені феноксипохідні – 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлороцтова кислота (2,4,5-Т) та ін. Висока їх активність у тканинах пов'язана з їхньою стійкістю до руйнування і зв'язування. ІОК-оксидаза не здатна окислювати ці сполуки; 2,4-Д ; 2,4,5-Т.

3. Похідні нафтиалкілкарбонових кислот – 1-нафтилоцтова кислота (1-НОК), її калієва сіль (КАНО), 2-нафтилоцтова кислота (2-НОК). 1-НОК добре проникає до рослинних тканин і легко по них пересувається (порівняно з 2,4-Д). Ці сполуки також відрізняються вищою стійкістю у тканинах, ніж ІОК. 1-НОК 2-НОК.

Біологічні властивості. Ауксини сприяють поділу ядра, росту клітин розтягуванням, активують утворення кореневих зачатків у основи пагонів, тому використовуються для формування і посилення росту адвентивних коренів. Ці гормони є одними із індукторів калусоутворення (2,4-Д), стимулюють недиференційований ріст, та підтримання калусної тканини при субкультивуванні.

Ауксини індують виникнення атрагувальних центрів. Цю властивість застосовують для отримання регенерантів з товстими пагонами та добре розвиненими вегетативними запасуючими органами, наприклад, мікроцибулини часнику, мікробульби картоплі виростуть більших розмірів, якщо в середовищах на фоні високого вмісту вуглеводів збільшити концентрацію ауксинів.

Особливості використання. Оскільки ІМК не розчинна у воді, її зазвичай розчиняють у 75%, чи чистому етанолі. Для використання, як стимулятор росту рослин спиртовий розчин розводять у воді до концентрації 1-5%. ІМК також доступна у вигляді солі (наприклад, калієвої), яка добре розчиняється у воді. Розчин слід зберігати у прохолодному, темному місці.

3.3. Цитокініни

Історія відкриття. Відкриття цитокінінів відбулося завдяки помилці, допущеної в ході експерименту. Щоб середовище була стерильним, флакони із клітинами поміщали в автоклав, де розчин нагрівається вище 100 °С. Випадково режим автоклавування був порушений і середовище разом з ДНК перегрілося. Саме на цьому середовищі серцевинна паренхіма тютюну сорту "Wisconsin-38" почала інтенсивно рости. При детальнішій перевірці з'ясувалося, що в перегрітому препараті ДНК з молока оселедця з'явилася деяка речовина, яка на тлі ауксину викликає активні ділення клітин. У 1953 році вийшла перша стаття, присвячена цьому явищу, а потім вдалося ідентифікувати речовину, що викликає ріст клітин — фурфуріладенін (6-фурфуріламінопурин). За фізіологічного ефекту це речовина отримала тривіальну назва кінетин. Першим природним цитокініном був зеатин виділений із зернівок кукурудзи. В сучасній фітобіології виділяють 2 основних цитокініна — зеатин і кінетин.

Фізичні та хімічні властивості. 6-фурфуріламінопурин (кінетин), у чистому вигляді — кристалічна речовина білого кольору слабо розчинна у метанолі та етанолі, легко розчинна у водних розчинах кислот, погано розчинна у воді.

Фізичні властивості: щільність: $1,6 \pm 0,1$ г/см³; густина: 1.4374 (25 ° С); **точка кипіння:** $367,6 \pm 52,0$ °С; **точка плавлення:** +269 ° С- +271 ° С; **температура спалаху:** $176,1 \pm 30,7$ ° С.

Хімічні властивості: молекулярна формула C₁₀H₉N₅O; **Молярна вага:** 215,21 г/моль

Всі відомі цитокініни - це похідні пуринових азотистих основ, а саме аденіну, в якому аміногрупа в шостому положенні заміщена різними радикалами (рис. 5). *Біологічні властивості.* Цитокініни – стимулюють поділ клітин та їх диференціювання, а також затримують процеси старіння.

Утворення бруньок можна вважати варіантом диференціювання клітин і цей процес є дуже специфічним ефектом цитокінінів.

Цитокініни сприяють синтезу нової ДНК в клітині і контролюють S-фазу клітинного циклу у рослинних клітин. Аденін, як речовина з якої синтезуються цитокініни, входить до складу деяких РНК. Більш того, якщо брати синтетичні аналоги цитокінінів (наприклад, бензиламінопурин), то незвичайний замісник (бензил) з'являється в тих же самих РНК у того ж самого аденіну. Експерименти з міченими атомами показують, що цитокініни безпосередньо не вбудовується в молекулу РНК цілком. Відбувається лише "перекидання" замісника з молекули цитокініну на молекулу РНК.

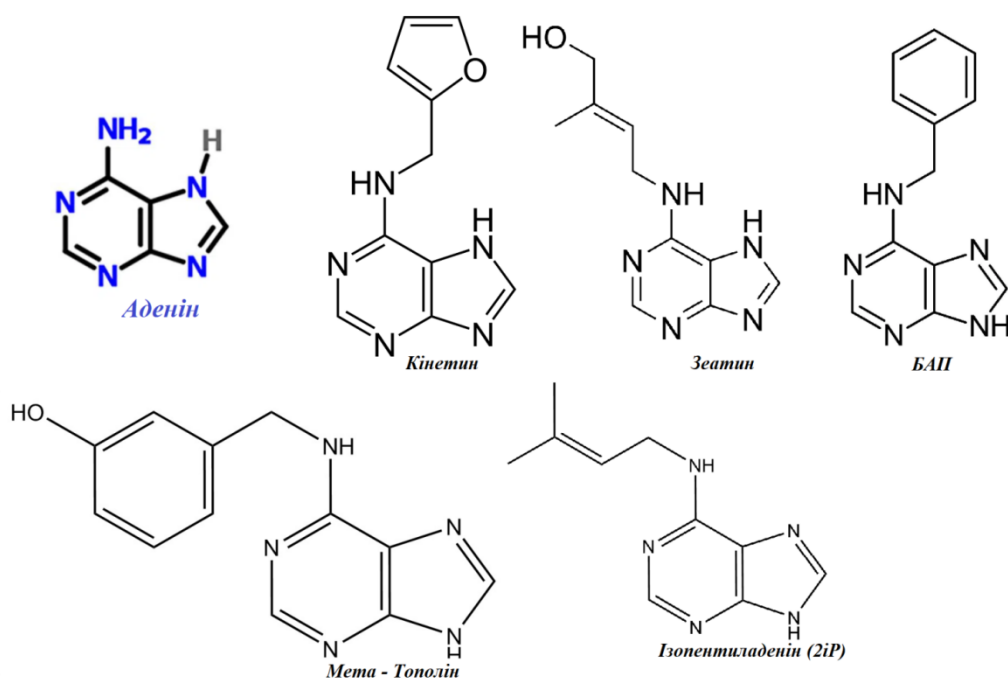


Рис. 5. Аденін та його похідні, речовини з цитокініноювою активністю

Цитокініни виявилися багато в чому схожими на першу з відомих груп рослинних гормонів - на ауксини, проте були й істотні відмінності. Головне у цитокінінів — зовсім інша точка синтезу. Якщо ауксини синтезуються в апексі

пагона, то цитокініни біохімічний "маркер" кінчика кореня. Ауксин *транспортується* по рослині базипетально (зверху вниз), і активно, а цитокініни — навпаки акропетально (знизу вверх).

Їх виявлено в різних тканинах рослин, але особливо багаті ними кінчики коренів, ксилемний сік, простаюче насіння, пухлини корончатих галів. Так як і ауксини, цитокініни проявляють атрагуючу дію, тобто посилюють пересування поживних речовин до збагачених ними тканин. Таким чином цитокініни знімають апікальне домінування, викликане ауксинами. На молекулярному рівні цитокініни в комплексі зі специфічним білковим рецептором посилюють активність РНК-полімерази та матричну активність хроматину. Це є причина збільшення кількості полірибосом та активації синтезу білків. Кінцева дія цитокінінів зумовлює зміну експресії генів на транскрипційному рівні. Найбільш вивченим ферментом, синтез якого індують цитокініни є нітратредуктаза.

Цитокініни індують мітоз, сприяють гілкуванню, формуванню бруньок, прискорюють проростання насіння, викликають пробудження бруньок, насіння, бульб та відіграють важливу роль у формуванні гінецею квітки. Представники — зеатин, кінетин.

Цитокініни приймають участь майже в усіх морфогенетичних реакціях. Вони активують і прискорюють процес дедиференціації, клітинного ділення, утворення калусу спільно з ауксинами, індують розвиток пазушних бруньок, регулюють ріст соматичних зародків, активують диференціацію стеблових бруньок у калусній тканині.

Особливості використання. При застосуванні цитокінінів слід враховувати, їх здатність накопичуватися в рослинах "про запас". Ця надлишкова кількість зростає при субкультивуванні і живцюванні рослин на середовищах із високим вмістом цитокінінів. Надлишок цитокінінів в живильному середовищі, рослинних об'єктах має фітоксичний прояв у вигляді гіпергідратації тканин та інгібування ризогенезу.

3.4. Правило Скуга - Мілера

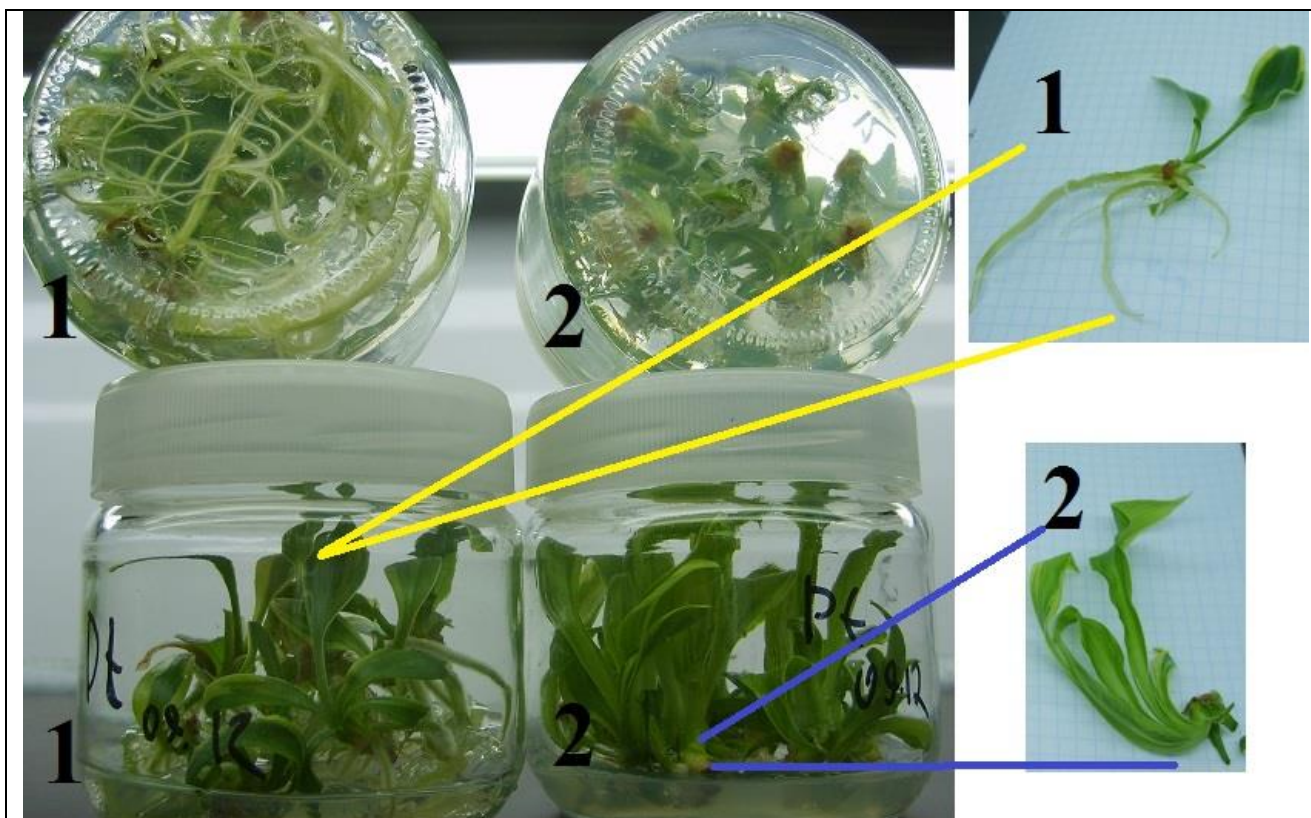
Підбираючи концентрації і співвідношення цитокінінів та ауксинів (цитокінін-ауксиновий індекс) враховують правило Скуга і Мілера (Skoog et al., 1957). Згідно з ним за співвідношення різних концентрацій, тобто переважання кількісного однієї групи гормонів над іншим детермінуються різні напрями детермінації рослинного організму (рис. 6., 7): 1) у випадку відсутності обох гормонів, або присутності їх в малих концентраціях відбувається утворення ембріонів;

2) калюсогенез відбувається, якщо ж концентрації гормонів обох груп є високими;

3) за переважання цитокінінів над ауксинами відбувається утворення конгломерату дрібних пагонів з одночасним пригніченням коренеутворення;

4) більша кількість ауксинів порівняно з цитокінінами стимулює коренеутворення, апікальне домінування.





хоста

Рис. 6. Особливості морфогенезу регенерантів залежно від співвідношення ауксинів та цитокінінів, де:

1- ауксини переважають;

2- цитокініни переважають

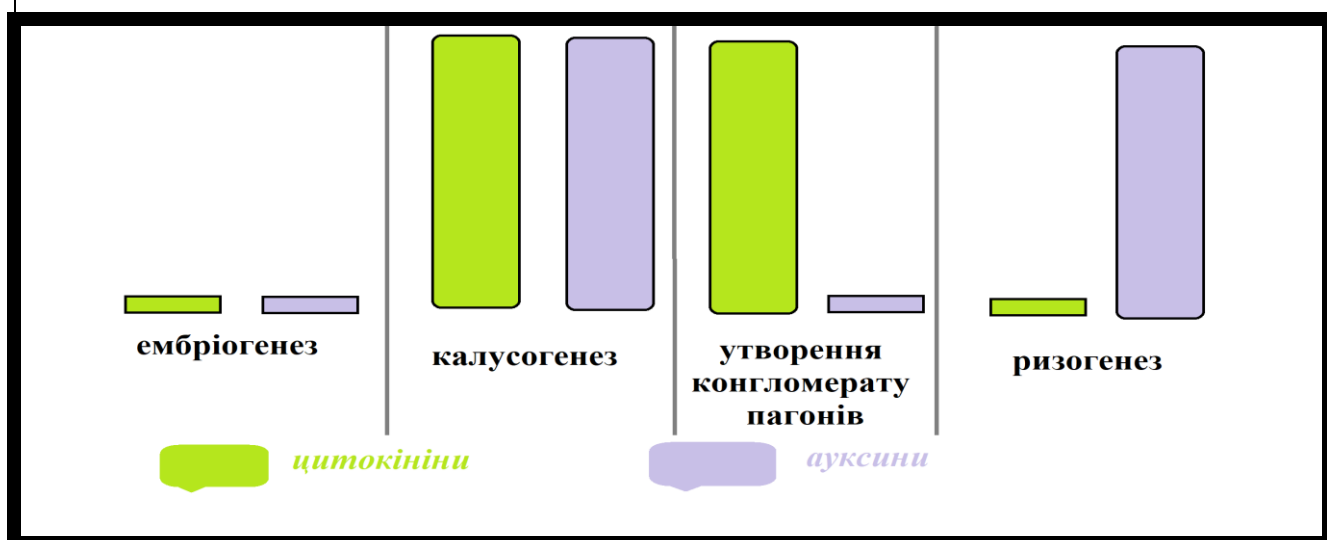


Рис. 7. Графічне зображення впливу комбінацій цитокінінів і ауксинів за Скугом і Мілером

Сформовано на основі джерела (Skoog et al., 1957).

3.5. Гібереліни

Історія відкриття. Гібереліни (від назви патогенного гриба-аскоміцета *Gibberella fujikuroi*, в якому вони були вперше виявлені) – були відкриті у 1926 році японським вченим Е. Куросавою при вивченні ураження рису грибом *Gibberella*. Хворі рослини сильно витягувались в довжину, вилягали і гинули. Екстракт гриба, а також виділення з нього у кристалічному вигляді речовина викликали аналогічну симптоматику захворювання. В 1954 році англійські вчені виділили одну із активних речовин, яку назвали гібереловою кислотою.

Фізичні та хімічні властивості: із гіберелінів найбільш поширеною є гіберелова кислота 3 (ГК₃) - це білий кристалічний порошок, температура плавлення становить 223-225 градус. Він розчиняється в органічних розчинниках, таких як спирти, ацетон, етилацетат.

Хімічна назва: 2,7-дигідрокси-1-метил-8-метилен-13-оксо-1, 2, 4b, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10a- декагідро-4a,1-(епоксиметано)- 7,9a-метанобензо[а]зулен-10-карбонова кислота. *Формула:* C₁₉ H₂₂ O₆. *Молярна маса:* 346,37 г/моль.

Біосинтез гіберелінів відбувається у молодих органах, які інтенсивно ростуть – переважно у листках. Значна кількість гіберелінів накопичується у незрілому насінні та плодах. Транспортування гіберелінів по рослині відбувається пасивно, як по флоємі, так і по ксилемі. У рослинах бувають вільна (активна) і зв'язані (запасна, транспортна) форми гіберелінів.

Гібереліни за хімічною природою – дітерпенові поліциклічні кислоти, які відносяться до карбонових кислот. Основною структурою гіберелінів вважають гіберелін ГК₉; інші гібереліни розглядаються як його похідні. Відомо понад 100 гіберелінів. Вони позначаються під шифром ГК. Наприклад, найпоширенішою є гіберелова кислота – ГК₃. Активність різних гіберелових кислот неоднакова в різних біологічних видів рослин, і лише деякі з них мають власну біологічну активність (ГК₁, ГК₃, ГК₄, ГК₇ і деякі інші).

Найбільш помітна дія гіберелів -це видовження стебла, зумовлено ростом клітин у довжину, стимулюванням активності апікальної та інтеркалярної меристем. Гібереліни відповідають за суворо визначену орієнтацію мітозів, зокрема, в стеблі всі мітози орієнтують вздовж його осі.

Активність гіберелінів зростає при затіненні окремих ділянок (рис. 8.), або і всієї рослини. Це є основним механізмом фототропізмів.

ГК за їх надмірної кількості пригнічують ріст кореневої системи.

Гібереліни активують проростання насіння, бульб та цибулин, прискорюють цвітіння. У багатьох однодомних і дводомних рослин гібереліни сприяють формуванню чоловічих квіток та партенокарпії.

Гібереліни затримують старіння листків у ряду рослин. На біохімічному рівні встановлена здатність гіберелінів індукувати експресію генів синтезу амілази та інших ферментів в алеїроновому шарі ендосперму при проростанні насіння злаків.

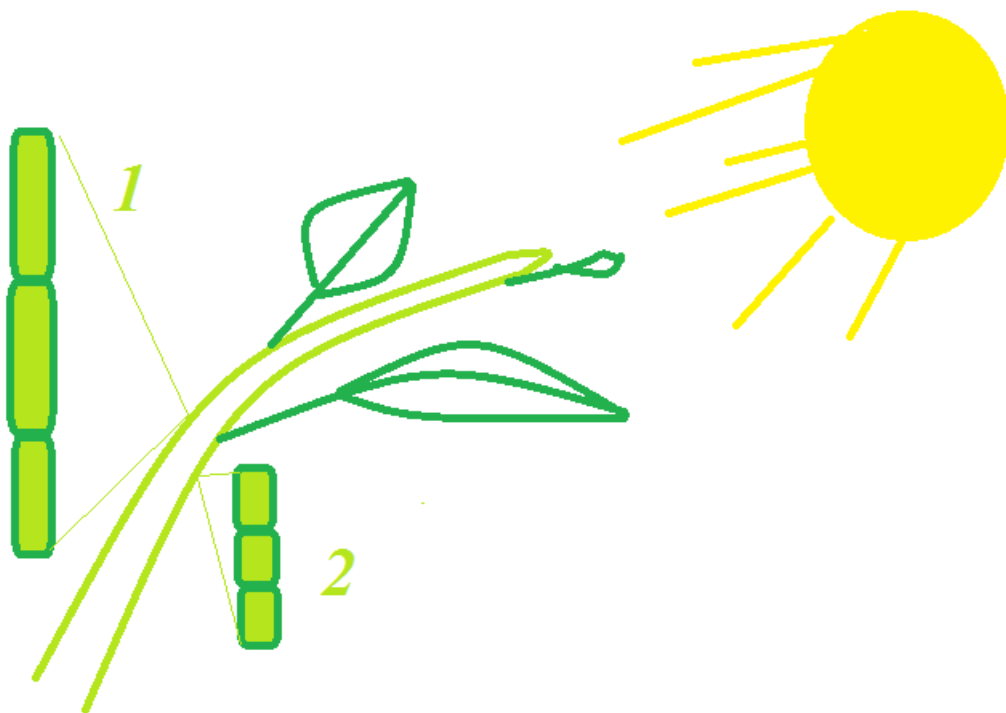


Рис. 8. Рух рослини до світла за зростання активності гіберелінів у

затінених частинах пагону,

де 1 - клітини в затіненій частині; 2 - клітини в освітленій частині.

Вони здатні виводити насіння, органи вегетативного розмноження, бруньки зі стану спокою та сприяти проростанню. У ході проростання насіння контролюють ріст зародка, розм'якшення ендосперму і мобілізацію запасних поживних речовин для його живлення. Стимулюють утворення ферментів, переважно гідролаз, особливо амілази, яка деполімеризує крохмаль до простих вуглеводів.

У вищих рослин багатими на гібереліни швидкоростучі органи – молоді апікальні листки, бруньки, незріле насіння, плоди. Рухаються вони по флоемі, ксилемі уверх-вниз, не виявляючи полярності транспорту. Велике значення для утворення гіберелінів у рослини має світло (воно сприяє їх біосинтезу в хлоропластах листків).

В окремих технологіях мікроклонального розмноження індукують синтез ендогенних гіберелінів. Наприклад, для кісточкових в заміну додавання синтетичних гіберелінів експланти на 7-10 днів витримують у темноті. Це ефективно зокрема для вирішення таких проблем як уникнення розеточності, індукція морфогенезу калюсних культур (ініціація утворення бруньок, пагонів), видовження кореневої системи.

Синтетичні гібереліни використовуються для:

- 1) попередньої обробки материнських рослин, щоб стимулювати їх ріст, сприяючи пробудженню бруньок, видовженню пагону, що виводить рослини із стану спокою та покращує процес ізоляції меристем;
- 2) стимулювання морфогенезу калюсних культур;
- 3) видовження пагону в культур з вкороченими міжвузлями;
- 4) усунення фітотоксичного гормонального дисбалансу, зокрема викликаного надлишком цитокінінів.

3.6. Етилен та абсцизова кислота

Крім гормонів, які стимулюють ріст (ауксини, цитокініни, гібереліни) у рослинному організмі є речовини, що гальмують (інгібують) окремі, або більшість ростових процесів, прискорюють розвиток, старіння. Це важливо, для детермінації онтогенезу, згідно потреб виробництва. В рослин - регенерантів як стимулюють, так і гальмують певні фізіологічні процеси. Найбільш дієвими фітогормонами інгібіторами є абсцизова кислота (АБК) та етилен.

Абсцизова кислота гальмує ростові і метаболічні процеси, пригнічує транспірацію в умовах посухи, сприяє формуванню і спокою насіння, бруньок, органів вегетативного розмноження, а також полегшує опадання квіток і плодів багатьох рослин.

При підготовці до зими, стану спокою АБК виробляється в апікальних бруньках. Це уповільнює ріст рослин і спрямовує зачатки листя на розвиток лусочок для захисту сплячих бруньок у холодну пору року. АБК також пригнічує поділ клітин у судинному камбії, пристосовуючись до холодних умов взимку шляхом призупинення первинного та вторинного росту.

Присутність АБК у середовищах для культивування тканин пригнічує зростання пагонів та проростання зародків, вводить рослинні об'єкти в стан спокою. Вихід із стану глибокого спокою пригнічується АБК в антагонізмі з гібереліном . АБК також запобігає втраті спокою насіння.

На етапі постасептичної адаптації ювенільним регенерантам для підтримання водного балансу необхідна абсцизова кислота. У клітинах продихів абсцизова кислота викликає швидкий вихід калію, що веде до падіння тургору цих клітин і закриття продихів. Водночас абсцизова кислота активує всмоктування води коренями. У багатьох фізіологічних процесах абсцизова кислота є антагоністом ауксину, гібереліну або цитокініну.

Надлишок АБК призводить до втрати ювенільності, старіння.

Етилен. У рослинах етилен виконує роль фітогормона, який індукує процеси дозрівання і старіння, а також захисні реакції в умовах стресу. Практично всі тканини рослин здатні продукувати етилен, проте в найбільшій кількості він утворюється в старіючих листках і плодах, що дозрівають.

Стресові фактори, зокрема дефіцит вологи, низькі температури, а також високі концентрації ауксинів та іноді цитокінінів різко посилюють біосинтез етилену.

Етилен прискорює дозрівання плодів, стимулює старіння, опадання листя і в'янення квіток, у багатьох видів прискорює проростання пилку, насіння, бульб та цибулин. Контрольований вміст етилену допомагає довше зберігати коренеплоди та фрукти.

На відміну від інших гормонів, етилен є газом і дуже «простою» молекулою ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$). Синтез етилену посилюється під час старіння і дозрівання. У культурі тканин *in vitro* поранення та ауксини збільшують синтез етилену. Через сприяння старінню зазвичай накопичення в культуральних ємностях, приміщеннях та використанні етилен в більшості технологій небажані у культурі тканин. Етилен може накопичуватися у вільному просторі. контейнерів для тканинних культур, коли вони занадто щільно закриті, і це накопичення може бути шкідливим для тканин рослини. Етилен також може накопичуватися в занурених тканинах через низьку дифузію газів у водних розчинах (у 10 000 разів менше, ніж у повітрі!).

Існують різні способи зменшити дію етилену, що виробляється рослинами. Етилен можна видалити з повітря розчином KMnO_4 , (наприклад пористий матеріал покритий KMnO_4). Часто використовується AgNO_3 , але ця сполука погано транспортується.

За необхідності додавання етилену, як газу не зручно і тому зазвичай додають етефон (етрел, 2-хлоретилфофонову кислоту) або інші речовини етилен продуценти.

3.7. Нововідкриті гормони

Нововідкриті фітогормони виявлені в окремих родинях рослин, наприклад, брасиностероїди виявлені в родині Капустяних (лат. *Brassicaceae*). Також до нововідкритих відносять саліцилову і жасмонові кислоти. Відповідають критеріям фітогормональних речовин деякі олігосахариди, окремі фенольні сполуки та деякі інші речовини.

Брасиностероїди є групою речовин, які впливають на структурні зміни рослини при дуже низьких концентраціях. На сьогодні відомо 12 представників брасиностероїдів, які мають стероїдну природу і відрізняються своїми радикалами. Поширеним серед них є *Brassinolide Homobrassinolide*. Їх використання та застосування відносно недавні, тому інформації використання цих речовин в промислових технологіях МКР мало. Це речовини стероїдної структури, що використовуються при дуже низьких концентраціях, вдається генерувати структурні зміни на рівні меристематичних тканин.

Найкращі результати при застосуванні цього гормону отримують, коли потрібно отримати продуктивну реакцію рослини. У зв'язку з цим, гормон втручається в процеси клітинного поділу, подовження і диференціації, його застосування корисно для цвітіння і плодоношення. Брасиностероїди можуть сприяти росту коренів, росту сильних сходів, покращенню фотосинтезу і стійкості культур до стресу.

Брасиностероїди сприяють трансформації вегетативного росту в репродуктивний ріст, запиленню і заплідненню, підвищують швидкість зав'язування плодів і та стимулюють їх ріст.

Саліцилова кислота (СК) є фенольним фітогормоном і знаходиться в рослинах впливаючи на ріст і розвиток рослин, фотосинтез, транспірацію, поглинання іонів та транспорт всередині рослини. СК також викликає специфічні зміни в анатомії листя і хлоропластових структур. Відіграє важливу роль в активації та регуляції багатьох реакцій на біотичні та абіотичні стреси. Зокрема, під час взаємодії рослина-мікроб, як частина захисних механізмів спочатку накопичується в локальній інфікованій тканині, а потім поширюється по всій рослині, щоб викликати системну набуту стійкість у неінфікованих дистальних частинах рослини.

Підвищує активність антиоксидантних ферментів, що є важливим на перших етапах мікроклонального розмноження в боротьбі із окисненням фенолів до хінонів у первинних експлантів.

Також саліцилова кислота контролює поглинання та транспорт іонів інгібування синтезу етилену, індукцію адвентивних бруньок, посилює ріст клітин та соматичний ембріогенез. Припускають, що в середовищах може замінити вплив фотоперіоду на стимулювання цвітіння.

Жасмонова кислота рослинний гормон із класу жасмонатів. Складні ефіри та солі жасмонової кислоти називають жасмонати, наприклад, біологічно важливий метиловий ефір - метилжасмонат. Жасмонова кислота в біохімічних реакціях перетворюється на різні похідні, наприклад, ефіри - метилжасмонат, які можуть хімічно з'єднуватися з амінокислотами.

Біосинтез жасмонової кислоти в рослинах здійснюється з α -ліноленової кислоти.

Жасмонова кислота бере участь у регуляції таких процесів росту рослин, як уповільнення росту, старіння та опадання листя. Також жасмонова кислота сприяє формуванню бульб, коренеклубнів і цибулин, наприклад, у картоплі, батату та цибулі.

Жасмонова кислота у рослин відіграє важливу роль у загоєнні пошкоджень тканин.

3.8. Трофічні детермінанти

В ізольованих умовах *in vitro* окрім гормональних детермінант дієвими є й трофічні. Змінюючи уміст, а саме кількість, співвідношення та доступність елементів мінерального живлення біотехнологи детермінують такі зміни в рослинних об'єктах: субстратні (або структурні) та регуляторні (або каталітичні).

Трофічні детермінанти є різної природи: мінеральні елементи (макроелементи, мезоеlementи, мікроелементи); синтетичні аналоги органічних речовин первинних метаболітів (вуглеводи, амінокислоти); біологічно активні речовини вторинні метаболіти (наприклад, вітаміни).

3.8.1. Мінеральні макроелементи

Суша речовина рослини складається з органогенних і мінеральних елементів. Органогенні (C, H, O, N) становлять 95% сухої маси та 5% мінеральні (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, B, Cl, Co, Cr, Ni, I, Si та деякі інші).

Розробка пропису середовища з оптимальним співвідношенням компонентів у багатьох технологіях є однією із вирішальних складових успішного культивування рослинних об'єктів. Як дефіцит, так і надлишок того чи іншого компоненту є шкідливим для живих клітин. Пропис середовища повинен враховувати також вимоги окремого етапу тієї чи іншої технології культивування.

За кількісним умістом елементи мінерального живлення поділяють на групи:

- Макроелементи – N, P, K (азот, фосфор, калій)
- Мезоеlementи – Ca, Mg, S (кальцій, магній, сірка)
- Мікроелементи – серед них п'ять металів Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, (залізо, марганець, цинк, мідь, молібден) та неметали B, Cl (бор, хлор).

Також є специфічні мікроелементи, які необхідні окремим культурам: Co, Cr, Ni, I, Si.

Макроеlementи - хімічні елементи, що містяться в рослинних організмах у значних кількостях (від десятків відсотків до десятих і сотих часток відсотка).

Азот. З неорганічних поживних речовин у культурі тканин у середовищах N має найвищу концентрацію. Мінеральний азот у прописах найчастіше буває в амонійній (NH_4^+), нітратній формі (NO_3^-), або в складі органічних сполук (амінокислоти, аміни, амід). За достатньої кількості легкодоступного азоту рослини нарощують масу, калусні тканини довше залишаються недиференційованими, процеси росту переважають над розвитком.

Кислотність середовища впливає на черговість надходження. Поглинання NO_3^- супроводжується виділенням аніонів із рослини, внаслідок чого середовище стає менш кислим. При поглинанні NH_4^+ з клітин у середовище виділяються протони водню, внаслідок чого воно підкислюється.

За Г. П. Кушнір, В. В. Сарнацькою (2005) “більшість середовищ, як правило, має рН 5,4-5,8. Якщо у середовищі одночасно містяться іони NO_3^- і NH_4^+ , відбувається швидке поглинання амонію, що підкислює рН середовища до 4,2-4,6. За цих умов поглинання амонію припиняється, але стимулюється поглинання нітратів, унаслідок чого рН підвищується”.

Більшість тканин і органів, так само, як й інтактні рослини, ростуть краще якщо на середовищі, що містить одночасно обидві форми нітрогену. При приготуванні, або аналізі середовищ визначають, як загальний уміст нітрогену так і співвідношення між нітратною й амонійною формами.

Іони амонію швидко включаються у синтез органічних сполук, тоді як нітрати потребують витрат часу та енергії на перетворення. Асиміляція нітратів у культивованих клітинах рослин відбувається за наступною схемою: середовище (NO_3^-) $\rightarrow$ //нітратредуктаза $\text{NO}_2^- \rightarrow$ //нітритредуктаза - NH_4^+ - перетворення аміаку в органічний азот: амінокислоти, білки, нуклеїнові кислоти. Для цих перетворень використовується вісім протонів гідрогену та вісім електронів: $\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{OH}^-$. Внаслідок вилучення 8 протонів H^+ та утворенню протону OH^- середовище підлужується.

NH_4^+ мінеральних солей швидко включаються у синтез амінокислот. За надмірної кількості цих сполук має місце гіпергідратації (вітрифікації) тканин. Токсичність надлишку іонів N може полягати у надмірному осмотичному тиску та інгібуванні інших елементів.

Нітрати можуть зберігатися в вакуолі клітини та виконують важливу функцію в осморегуляції та аніонно-катіонний баланс рослини.

Низький уміст у середовищі N викликає вповільнення росту, регенеранти відрізняються малими розмірами.

За надмірного умісту виникає гіпергідратація тканинин, потовщення вегетативних органів, затримка розвитку, зростання осмотичного тиску, спонтанне калусоутворення, зростання чутливості до токсичності етилену, продуктів окиснення фенолоподібних сполук, високих температур, порушення засвоєння низки інших мінеральних елементів (наприклад, кальцій, мідь).

Фосфор приймає участь у багатьох процесах життєдіяльності клітин, це зокрема передача енергії та генетичної інформації. Рослина поглинає іони фосфору у вигляді фосфатів: H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} ; PO_4^{3-} . У прописах фосфор представлений у вигляді натрію і калію моно- і двозаміщених фосфатів (від 85 мг/л в середовищі Пієрика і до 510 мг/л в середовищі Дженевезі). Моновалентні іони найлегше засвоюється.

Високоенергетичний пірофосфатний зв'язок між атомами фосфору у АТФ, дуже важливий для енергії метаболізму клітин рослинних об'єктів. Фосфор входить в склад сполук без яких не можливі процеси зберігання та експресії генетичної інформації (нуклеїнові кислоти). Велика кількість фосфору міститься у фосфоліпідах біомембран.

На ранніх етапах розвитку, особливо в асептичних умовах, сіянці й рослини-регенеранти найбільш чутливі до нестачі фосфору. У великих кількостях фосфор накопичується у швидкоростучих тканинах (меристемах), у клітинах яких інтенсивно протікають метаболічні процеси. Візуальними ознаками нестачі фосфору є пурпурний відтінок вегетативних органів і уповільнений ріст рослин. Засвоєння фосфору залежить від кислотності

середовища. Оптимальним для засвоєння фосфору для багатьох культур є рН від 5,6 до нейтрального. На середовищі з рН 5,2-5,4 вже за першого пасажу візуально на нижніх листках діагностуються проблеми із засвоєнням фосфору – інтенсивне зелене забарвлення листкової пластинки і відмирання її країв.

Частина фосфору не задіяна в метаболізмі клітини міститься у вакуолях “про запас”. Тому випадки передозування Р досить рідкі.

Калій. До складу живильних середовищ калій вносять у вигляді нітрату (KNO_3), фосфату (KH_2PO_4) рідше хлориду калію (KCl) або сульфату (KSO_4).

Виконує ряд фізіологічних функцій, зокрема, стимулює транспортування та перетворення вуглеводів. Також іони K^+ компенсують негативний заряд аніонів, отже регулюють рН. Іони калію беруть участь у регулюванні осмотичного стану клітин, в транспорті аніонів по ксилемі. Потреба у калії зростає під час переходу культур до органогенезу.

Концентрація калію у вакуолі клітини (100 і 200 мМ) значно вища, ніж у живильному середовищі, тому в частинах рослин, які безпосередньо контактують з живильним середовищем, функціонує потужна система іонних насосів, яка підтримує градієнт його концентрації на належному рівні. У тканинах рослин калій знаходиться в іонній формі, має дуже високі рухливість і здатність до реутилізації. Калій є кофактором багатьох ферментів. На сьогодні відомо понад 60 ферментів, для нормального функціонування яких необхідні іони калію.

Калій впливає на водний потенціал рослинних клітин і відіграє важливу роль у процесах поглинання й транспорту води по рослині. Він необхідний для підтримання процесів оптимального росту і розвитку рослин, прямо чи опосередковано беручи участь у біосинтезі основних класів органічних сполук.

При нестачі калію гальмуються процеси поділу й розтягування клітин, що призводить до утворення розеткових форм рослин. Пригнічується також прояв домінуючого ефекту апікальної бруньки та інтенсивність фотосинтетичних процесів, насамперед, внаслідок зниження швидкості відтоку утворених фотоасимілятів.

Під час дефіциту K^+ зростають концентрації розчинних вуглеводів і азоту разом зі зниженням концентрації крохмалю. Така зміна вуглеводного обміну пов'язана з сильною потребою K^+ для деяких регуляторних ферментів у вуглецевому обміні в рослині спостерігається.

Дефіцит калію візуально проявляється у вигляді плямистості, або зміни морфології листків (скручування, “рваний край”). Нестача K^+ може бути однією з причин гіпергідратації, уповільнення поглинання фосфору.

3.8.2. Мезоелементи

Мезоелементи займають проміжне положення між макро- і мікроелементами. До мезоелементів відносять Ca, Mg, S (кальцій, магній, сірка).

Кальцій. Іони Ca^{2+} беруть участь у процесах морфогенезу, в т.ч. і морфогенезу *in vitro*. Вони необхідні для передачі сигналів ауксинів і цитокінінів. Маючи здатність зв'язувати біологічні структури, кальцій є елементом, від якого залежить структура і функціонування клітинних стінок. У формі пектинату кальцію він входить до складу клітинних стінок (мембран), що підвищує їх проникність і сприяє транспорту вуглеводів і амінокислот по рослині.

Пектинати беруть участь у будівництві стінок клітин, особливо багато їх у міжклітинній пластинці, яка є елементом, що поєднує окремі клітини і творить каркасну систему.

При нестачі кальцію відбувається деградація клітинної стінки. В результаті відбувається розм'якшення рослинної тканини. При дефіциті цього елемента відбувається руйнування клітинних стінок молодих клітин апексів пагонів і коренів. Це призводить до загибелі точок росту цих елементів (рис. 9, 10).

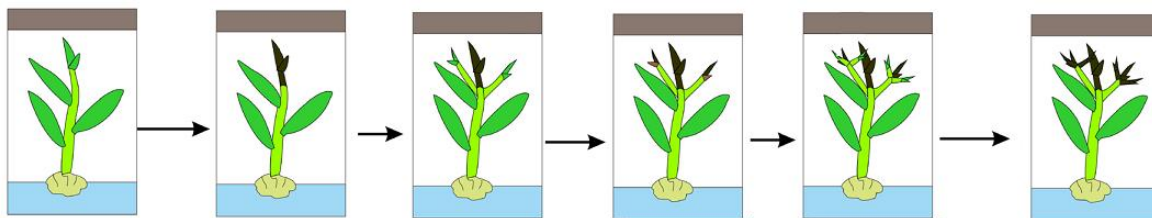


Рис. 9. Прояв дефіциту Са під час росту регенерантів

Візуальною ознакою нестачі кальцію в асептичній культурі можуть бути відмерлі кінчики кореня і верхівки пагонів. Спостерігається також деформація форми листових пластинок: їх кінчики спочатку біліють, а потім відмирають.

До складу живильних середовищ кальцій вводиться у вигляді хлориду кальцію (CaCl_2), нітрату кальцію ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) або складного фосфату кальцію ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). При складанні живильних середовищ необхідно враховувати біоекологічні особливості досліджуваного рослинного об'єкта, оскільки відомо, що рослини по відношенню до солей кальцію умовно поділяються на три групи: кальцієфіли, кальцієфоби і нейтральні види. Разом з тим встановлено, що дводольні рослини містять у своїх тканинах значно більше цього елемента, порівняно з однодольними. Кальцій не реутилізується, а накопичується в старих тканинах рослин тому його дефіцит, або проблеми засвоєння діагностуються в першу чергу на верхівках пагонів та кінчиках коренів.



Рис. 10. Дефіцит кальцію під час постсептичної адаптації регенерантів павловнії

Наявність Ca^{2+} також є важливою для стійкості проти грибної інфекції несприятливих факторів (низька вологість повітря, посуха) на завершальному етапі мікроклонального розмноження.

Магній. Його основна фізіологічна роль у рослинних тканинах полягає в тому, що він входить до порфіринового ядра хлорофілу (приймає участь у зв'язуванні енергії світла, надає зеленого забарвлення рослинам) і є обов'язковим кофактором для РНК- і ДНК-полімераз, АТФ-аз ($\text{АДФ} + \text{Ф} = \text{АТФ}$) та ферментів, які каталізують перенесення фосфатних груп, що призводить до зростання вмісту в тканинах органічних і неорганічних сполук, а також необхідний для функціональної діяльності ферментів гліколізу, циклу Кребса, спиртового й молочнокислого бродіння.

Магній потрібний для багатьох ферментативних реакцій у забезпеченні правильної стереометричної структури між ферментом та субстратом. Магній

дуже важливий для фотосинтезу. Більшість присутніх іонів Mg^{2+} беруть участь у регуляції внутрішньоклітинного рН і правильного катіон-аніонного балансу.

Магнієве голодування, впершу чергу, позначається на фосфорному обміні, а отже і на загальній енергетиці рослини, структурі пластид та спричинює порушення в біосинтезі білка. При його нестачі спостерігається хлороз листків.

Mg^{2+} додають до живильних середовищ у вигляді сульфату ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Сірка вводиться до складу живильних середовищ у вигляді сульфатів різних інших мінеральних елементів (наприклад, K_2SO_4 , $FeSO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) і поглинається кореневою системою рослин тільки в окисненій формі (у вигляді іона SO_4^{2-}). До органічних сполук входить у вигляді груп $-SH$, $-S$ або $-S-S$. Сульфатгідрильні групи входять до складу амінокислот (цистин, цистеїн, метіонін), вітамінів (ліпоева кислота, біотин, тіамін), ліпідів, коферменту А. Однією з найважливіших функцій сірки в рослинному організмі є формування третинної структури білків шляхом утворення ковалентних зв'язків дисульфідних містків між залишками цистеїну.

При відсутності сірки гальмуються процеси росту й розвитку рослин, фотосинтезу, синтезу білків та ін. Як і кальцій, сірка не реутилізується і може в значній кількості накопичуватись в старіючих частинах рослин і бути в дефіциті в молодих ростучих.

3.8.3. Мікроелементи метали

Мікроелементи хоч порівняно із макроелементами у менших кількостях, але є обов'язковими компонентами штучних живильних середовищ. Це такі елементи: манган, мідь, цинк, бор, молібден, хлор, кобальт, йод; в окремих прописах також присутні нікель, алюміній, срібло. Мікроелементи можуть бути металами (наприклад - мідь, цинк, молібден, марганець, кобальт і т.д.), неметалами (бор) і галогенами (йод).

Манган (Mn, марганець) входить до складу усіх відомих прописів. У клітині міститься у складі міжгранних і граневих мембран тилакоїдів хлоропластів. У складі одного з поліпептидів бере участь у фотолізі води ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$). Крім того, марганець є складовою частиною каталітичного центру ферменту супероксиддисмутази і сприяє детоксикації активних форм кисню.

Відомо понад 30 ферментів металопротеїдів, для активування яких необхідні іони Mn^{2+} . При нестачі марганцю істотно знижується виділення кисню у процесі фотосинтезу, пригнічується біосинтез вуглеводів у тканинах рослин, на листках між жилками з'являються ознаки хлорозу. У живильні середовища марганець додають у вигляді кристалогідрату сульфату ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Його регуляторна роль у процесах росту і диференціації зумовлена впливом на вміст природного ауксину індолілоцтової кислоти. За нестачі цього елемента вміст гормону зменшується.

Мідь міститься в живильних середовищах у вигляді сульфату рідше хлориду, або нітрату (CuCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$). У клітині, як і залізо, вона зв'язується з ферментами і приймає участь в окиснювально-відновних перетвореннях обміну речовин. Відіграє важливу роль в транспорті електронів у мітохондріях та хлоропластах.

Майже половина міді, яка знаходиться в тканинах рослин, концентрується в хлоропластах у вигляді пластоціаніну. Крім того, мідь входить до складу деяких рослинних ферментів (аскорбатоксидази, поліфенолоксидази, супероксиддисмутази, цитохром-оксидаза), бере участь у біосинтезі пігментів та в енергетичних процесах клітин, й переходячи з одновалентного стану у двовалентний.

Разом із цинком входить у комплекс, який захищає та відіграє важливу роль у нейтралізації високо-реакційно здатного супероксид-аніон-радикалу O_2^- , що зокрема утворюється під час дихання.

При нестачі міді знижується ефективність процесів дихання та фотосинтезу, порушується лігніфікація клітинних оболонок, уповільнюється ріст рослин і спостерігаються відхилення в їх морфологічному розвитку. Рослини набувають темно-зеленого забарвлення із подальшим розвитком некрозів, хлорозу кінчиків листків, відмирання апексів пагонів і втрати тургору.

Цинк додають до живильних середовищ у вигляді сульфату, рідше нітрату. Входить до складу ферментів, зокрема тих, що приймають участь у синтезі хлорофілів, попередника ІОК – триптофана. Є металевим компонентом ряду ферментів. Він може бути як структурним, так і регуляторним кофактором складних ферментів.

Цинк дуже важливий для синтезу білка.

Zn необхідний для активності РНК-полімерази. Під норму умов РНК-полімераза містить два атоми Zn.

Дефіцит цинку призводить до значного зниження синтезу білка. Відбувається дезінтеграція рибосом і накопичення білкових попередників, таких, як амінокислоти та аміди.

Нестача цинку візуально проявляється у зміні кольору листових пластинок (вони набувають жовтуватого відтінку) і порушенні нормального розвитку кореневої системи.

Молібден найбільше міститься в ростучих органах, особливо в надземній частині. В листках він знаходиться в переважно в хлоропластах. Молібден приймає безпосередню участь у процесах перетворення N в аміачні форми, які добре засвоюються рослинами, тому його іноді називають мікроелементом азотного обміну. При нестачі молібдену в тканинах рослин у великій кількості накопичуються нітрати.

Може виявляти захисну дію щодо токсичності надмірної кількості металохелатів.

У живильні середовища для культури тканин додають молібдат натрію ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Передозування цього мікроелемента в культурі *in vitro* може бути вкрай токсичним. При закисленні живильних середовищ доступність

молібдену знижується, що може призводити до зміни морфології пагонів і пригнічувати їх ріст майже до повного припинення.

Кобальт у рослинному організмі може перебувати в іонній формі і у вигляді порфіринової сполуки ціанокобаламіну (вітамін B₁₂). Рослини не синтезують вітамін B₁₂, тому кобальт вводять в живильні середовища екзогенно у вигляді кристалогідрату (CoCl₂·6H₂O).

Також приймає регуляторну участь у морфогенезі. Іони кобальту і срібла додають до середовищ для запобігання отруєнню регенерантів етиленом.

Симптоми нестачі кобальту подібні до симптомів азотного голодування.

3.8.4. Мікроелементи неметали та специфічні мінеральні елементи

Деякі інші елементи, наприклад кобальт (Co), алюміній (Al), натрій (Na) і йод (I) є важливими, або корисними для деяких видів, але встановлено, що вони не були широко поширеними. Потреба в мікроелементах була відкрита тільки на початку останні 50-60 років. Оскільки рослини в культурі тканин повністю залежать від додавання поживних речовин, відкриття важливості мікроелементів було вирішальним для успішного росту *in vitro*.

Бор до культуральних середовищ додають у вигляді борної кислоти (H₃BO₃). На відміну від інших мікроелементів не входить до складу ферментів. Бере участь у метаболізмі фенолів, вуглеводів, гормонів, нуклеїнових кислот, азотному та ауксиновому обміні, у формуванні структури клітинних стінок, поділі клітин, регулює процеси росту й розвитку рослин, транспорту води, підсилює ріст пилкових трубок. Приймаючи участь у синтезі азотистих основ (в т.ч. РНК), підтримує активність меристемних тканин.

Дефіцит бору проявляється у відмиранні апікальних меристем, деформації та хлорозі листових пластинок, порушенні анатомічної будови осьових органів рослин.

За відсутності бору не відбувається біосинтез лігніну. Бор активізує фенолази, що беруть участь у синтезі фенілпропанових сполук, які, полімеризуючись, утворюють лігнін.

За відсутності бору уповільнюється транспорт ІОК та синтез цитокінів, також припиняється синтез нуклеїнових кислот, уповільнюються мітози.

Надлишок бору токсичний і може викликати загибель рослин.

Хлор. Присутній у середовищах у вигляді солей соляної кислоти (Cl^-) інших мінеральних елементів у кількостях 6 ммоль і більше. Багато видів рослин переносять високі концентрації хлоридних іонів, але є і “хлорофобні види”, наприклад картопля. У таких видів надлишок Cl^- спричинює гіпергідратацію.

Засвоюється рослинами у невеликих кількостях. До складу живильних середовищ хлор вводиться у вигляді хлориду кальцію ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) та солей деяких мікроелементів. Крім того, хлор може потрапляти у вигляді домішок до інших реактивів мінеральних солей. Хлор необхідний для процесів фотосинтезу (фотолізу води) і підтримання нормального росту рослин, шляхом регулювання осмотичного тиску. При дефіциті хлору листки в'януть, листкові пластинки жовтіють. Стійка нестача, як і надлишок цього елемента, є летальними для рослин.

Йод додають до багатьох культуральних середовищ у вигляді йодиду калію (KI). Входить до складу деяких амінокислот. Необхідний для рослин у слідових (мінімальних) кількостях.

Натрій необхідний для деяких рослин. Наприклад у пшениці, вівса, бавовни, цвітної капусти Na^+ справді має корисний поживний ефект і тому розглядається, як функціональний елемент. Елемент може функціонувати як осмотичний стабілізатор у галофітних рослинах. Містять Na^+ : NaFeEDTA, молібдан натрію. Агар і гельрит містять високі рівні Na^+ .

Кремній (Si) є другий за поширеністю елемент у ґрунтах. Проте в класичних прописах його не додають. Силікатний іон корисний для росту рослин та полегшує біотичний та абіотичний стрес. Навмисне додавання у середовище може покращити зростання деяких видів рослин.

3.9. Органічні компоненти середовищ

Органічні речовини клітини і організму в цілому є переважно результатом автотрофної діяльності. За походженням та функціями їх дві групи:

- первинні метаболіти;
- вторинні метаболіти.

3.9.1. Первинні метаболіти та їх синтетичні аналоги

Функції первинних метаболітів в організмі - будівельний матеріал і/або джерело енергії. Наприклад, глюкоза під час дихального окиснення розпадається до двох молекул піровиноградної кислоти, які в циклі Кребса окиснюються до три- та дво карбонових органічних кислот. При розпаді глюкози вивільняється енергія, що зв'язується макроергічними сполуками (АТФ) та утворюються органічні кислоти, які є будівельним матеріалом для синтезу інших органічних речовин. Зокрема, у випадку приєднання до цих кислот аміногрупи (NH_2 , NH_4^+) вони перетворюються у прості амінокислоти.

У більшість середовищ додають гетеротрофні джерела живлення. Це переважно синтетичні аналоги первинних метаболітів. У більшості прописів середовищ це моно- та дисахариди. Метаболізм вуглеводів займає найважливіше місце в основному обміні речовин вищих рослин.

Вуглеводи завдяки високій мобільності в пересуванні рослинними тканинами і швидкому перетворенню в інші сполуки є, в першу чергу “будівельним матеріалом” та джерелами енергії. Тому різні форми вуглеводів є обов’язковою складовою живильних середовищ у культурі *in vitro*, від якої залежить безпосередньо процес накопичення біомаси культури.

Важливе значення має підтримання певного рівня осмотичного тиску за додавання у середовище вуглеводів.

Серед вуглеводів у прописах більшості середовищ зустрічається дисахарид сахароза та рідше моносахарид глюкоза. Сахароза є найбільш поширеним вуглеводом флоемного соку покритонасінних рослин.

Сахароза (рафінований білий цукор) додається у середовища від 2 до 9 % (20 – 90 г/л; 58 – 263 мМ). У тканинах концентрації досягають від 0,3 до 0,9 М. Інвертази, що виділяються експлантатом у середовище, розщеплюються сахарозу на глюкозу та фруктозу. Таким чином, експлантати зазвичай мають суміш сахарози, глюкози та фруктози.

При автоклавовування відбувається гідроліз сахарози (табл. 3). Розпад вуглеводів під час автоклавовування частково підкислює середовище. Виставлений рівень рН до автоклавовування на декілька десятих відрізняється після стерилізації.

Таблиця 3. Гідроліз сахарози до фруктоза та глюкоза під час автоклавовування, залежно від рН.

рН	гідроліз, %	рН	гідроліз, %
3.0	100	3.4	75
3.8	40	4.2	25
4.7	12.5	5.0	10
6.0	0		

Наявність сахарози (або інших її похідних) у середовищі необхідна для укорінення рослин-регенерантів, оскільки при її відсутності навіть за наявності ауксинів процес ризогенезу в більшості культур істотно уповільнюється, або припиняється.

Взаємоперетворення глюкози, фруктози й сахарози забезпечує залучення кожного із цих головних для росту ізольованих культур компонентів в основні метаболічні процеси – гліколітичний і пентозофосфатний. Загалом, перший шлях більше відповідає високим енергетичним затратам, а другий – синтетичним запитам.

Для окремих культур (наприклад, фундук, грецький горіх) найбільш ефективний ріст спостерігається на середовищах із глюкозою.

Середовище із сахарозою для культивування тканин специфічно пригнічує утворення хлорофілу.

Органічні кислоти і амінокислоти. Серед органічних кислот позитивний ефект є за додавання кислот циклу Кребса. Додавання цих речовин активізує поглинання з середовища іонів амонію та утворення амінокислот. Вони можуть застосовуватися, як хелатуючі агенти, буфери для підтримання сталого рН, або бути джерелом живлення.

Органічні кислоти разом з амінокислотами утворюють комплекси з іонами металів і беруть участь у транспортуванні останніх.

Відновлений азот може бути доданий у вигляді амінокислот. Для окремих культур тканин додавання амінокислот може бути непотрібним наявність мінерального N, забезпечуючи середовища містять достатню кількість NO_3^- та NH_4^+ . Коли середовища містять субоптимальних кількостях гідролізат казеїну (суміш амінокислот) може значно збільшитись зростання.

У живильних середовищах найбільш поширені такі амінокислоти: гліцин ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), глутамін ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$), L-серин ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$). Додавання амінокислот є досить ефективним для ембріогенних та калюсних культур. Вони можуть бути єдиним, або додатковим джерелом азоту. Слід зазначити, що в рослинах природними транспортними засобами відновленого N є аспарагін і глутамін.

Органічні компоненти невизначеного складу. Багато невизначених добавок використовувалися в ранніх технологіях культури тканин. Їх використання поступово знижується. Проте окремі доповнень невизначеного та змінного складу досі широко використовуються. Першим успішно для культури рослинної тканини включали використання дріжджового екстракту.

Наприклад, раніш застосовували гідролізат казеїну та продукт з нього триптон, який отримують шляхом контрольованого ферментативного гідролізу казеїну із коров'ячого молока. Цей гідролізат білка є висококонцентрованою сумішшю амінокислот, пептидів і великих білкових фракцій.

Інші невизначені добавки, які можуть додаватися в окремі середовища для культивування тканин рослин, включають м'ясний екстракт, картопляний екстракт, солодовий екстракт, банановий гомогенат та кокосове молоко.

3.9.2. Вторинні метаболіти

Вторинні метаболіти в організмі синтезуються із первинних і виконують інші функції. Це, зокрема регуляторні, захисні, екологічні. В середовищах є аналоги вторинних метаболітів: гормони, вітаміни, антиоксиданти, інколи антибіотики та інші.

Вітаміни. Ці речовини приймають, як складові ферментів у багатьох біохімічних реакціях. Відсутність одного, або декількох вітамінів може істотно позначитись на розвитку рослинного організму. Багато ізольованих культур втрачають здатність до самостійного їх синтезу.

У прописах живильних середовищ поширені п'ять вітамінів: тіамін (B_1); піридоксин (B_6); аскорбінова кислота (C); нікотинова кислота (PP) і мезоінозитол.

Тіамін (B_1 , $C_{12}H_{17}C_1N_4OS$). Молекула тіаміну складається із двох компонентів: перший із них є залишком піримідину, другий – половиною молекули тiazолу.

Тіамін задіяний у метаболізмі вуглеводів (кофермент циклу Кребса) і біосинтезі амінокислот. До складу середовищ вводять у вигляді хлоргідрату тіаміну в концентраціях 0,1-0,4 мг/л. Встановлено, що тіамін у рослинному організмі синтезується, головним чином, у листках і відноситься до світлозалежного процесу. Синтез тіаміну стимулюється додаванням у середовище цитокініну, а саме кінетину. Одночасне збільшення вмісту вітамінів B_1 і PP збільшує утворення соматичних ембріодів.

Піридоксин (B_6 , $C_8H_{11}NO_3$) є коферментом ферментів, зокрема карбоксилювання і переамінування амінокислот. Він позитивно впливає на процеси проростання насіння і росту проростків, тому часто використовується, як компонент живильних середовищ. Однак іноді спостерігається й зворотний

ефект, що, ймовірно, пов'язано із супероптимальними (завищеними) концентраціями екзогенного піридоксину, який може накопичуватись у рослинах у фазі їх активного росту, а, отже, і активного метаболізму амінокислот.

Аскорбінова кислота (*вітамін С*, $C_6H_8O_6$) приймає участь у окисно-відновних реакціях. Є потужним антиоксидантом, тому часто для боротьби з фенолоутворенням застосовують додавання у живильне середовище збільшених концентрацій вітаміну С і (або) замочування первинних у розчинах аскорбінової кислоти. Аскорбінова кислота чутлива до автоклавування і окиснення.

Нікотинова кислота (*Вітамін РР*, $C_6H_5NO_2$) приймає участь у метаболізмі речовин-переносників енергії (у синтезі у НАДФ $\cdot$ H $_2$, НАД). Вони забезпечують перебіг процесів, пов'язаних з виділенням та акумулюванням енергії в макроергічних зв'язках АТФ. Крім того, НАДФ $\cdot$ H+H $^+$ відіграє важливу роль донора протонів водню в процесах синтезу багатьох біополімерів клітини.

Активізує фосфорний, вуглеводний і ліпідний обміни. Нікотинова кислота у системі обміну речовин входить до складу коферментів, що проявляють активність в анаболічних реакціях.

Мезоінозитол вітаміно-подібна речовина, яка синтезується більшістю рослинних тканин. Це продукт гідролізу фітину. Приймає участь у вуглеводному обміні, входить до складу мембран, в т.ч. у хлоропластах.

Антибіотики. Застосовують для пригнічення росту бактерій у клітинних культурах. Антибіотики можуть вироблятися різними видами мікроорганізмів, або синтезуються хімічним шляхом. Усі вони мають здатність пригнічувати ріст мікроорганізмів.

Більшість антибіотиків пройшли випробування для використання в клітинних культурах відсутність цитотоксичної дії для рослинних клітин і тканин. Антибіотикам властиві різні способи протимікробної дії, активні проти більш-менш певних спектрів бактерій. Поширеною дією низки антибіотиків є конкурентне інгібування бактеріальних ферментів. У біотехнології найчастіше

використовуються дві групи інгібіторів бактерій. Перша група гальмує синтез клітинної стінки (Пеніциліни: Ampicillin, Amoxycillin, Carbenicillin, Penicillin G, Ticarcillin; Цефалоспори́ни: Cefalexin, Cefotaxim; інші: Bacitracin, Cycloserin, Vancomycin) та друга - інгібітори синтезу білка (Chloramphenicol, Chlortetracycline, Clindamycin, Doxycyclin, Erythromycin, Lincomycin, Oxytetracyclin, Spectinomycin, Tetracyclin. Перша використовується для знищення бактерій, наприклад *Agrobacterium*. Друга група, наприклад Канаміцин, найчастіше використовується, як селективний засіб у комбінації з маркерними генами.

3.10. Гелеутворювачі

Агар (агар-агар, E406) – суміш полісахаридів агарози і агаропектину. Основна фракція агарози – лінійний полісахарид, побудований з залишків β D-галактопіранози і 3,6-ангідро- α -L-галактопіранози, що чергуються, з'єднаних по чергово β -(1,4)- і α -(1,3)-зв'язками.

Агаропектин – суміш полісахаридів складної будови, які містить глюкуронову кислоту і естернозв'язану сульфатну кислоту.

Агар-агар отримують з червоних морських водоростей (*Gracilaria*, *Gelidium*, *Ahnfeltia*), які ростуть у Білому морі, Тихому й Атлантичному океанах. Залежно від виду водоростей склад виділених полісахаридів може змінюватися.

Використовується для загущування рідких живильних середовищ, надаючи їм желеподібного стану. У такому вигляді культуральне середовище може витримувати на своїй поверхні рослини і не перешкоджати вільному пересуванню поживних речовин до поглинальних зон. Агар не засвоюється рослинами, однак у разі застосування синтетичного агару, необхідно враховувати присутність у ньому слідів кількості домішок, які можуть впливати на результат. В агарі можуть міститись хлориди, сульфати, іони натрію, кальцію, магнію і заліза. Концентрація домішок змінюється залежно від місця походження, виду морських водоростей і методу виробництва агару. У продажу

є очищені агари, які цілком придатні для культури тканини рослин. При виконанні роботи з новим типом агару потрібно спочатку визначити його кількість, необхідну для приготування гелю певної концентрації. Як правило, ці дані надає виробник. Зазвичай це значення становить 6-10 г/л середовища, проте зустрічаються агари з оптимальною концентрацією 12-16 г/л.

Витрата агару також залежить від такого показника як “сила гелю”. Агар буває різних марок за цим показником (сили гелю) – від 600 до 1200. Чим вища сила гелю, тим ефективніше відбувається гелеутворення, тим менше необхідно додавати агару.

Крім того, слід враховувати, що при закисленні (зниженні рН) середовища агарозний гель дещо розріджується. Чим нижче значення рН, тим м'якіше гель. Це відбувається після автоклавування та при культивуванні окремих видів рослин, які виділяють у культуральне середовище специфічні сполуки.

Слід наголосити, що надмірно тверде живильне середовище перешкоджає доступу живильних речовин до рослин, а надмірно м'яке – викликає вітрифікацію. Поверхня гелю повинна бути достатньо стійкою при одночасному збереженні м'якості для того, щоб на його поверхні можна було вільно розміщувати рослини-регенеранти (або їх частини), без утруднення доступу до них живильних речовин на поверхні середовища не повинно бути конденсату.

Іноді, як замітник агару, застосовують поліакриламідні гелі, кульки з пірексу та кварцовий пісок. Однак порівняно із традиційними способами культивування на агарі, у них відмічається низка недоліків.

Натепер доступні кілька **синтетичних замінників агару** таких, як gelrite, gellan і phytigel. Гелланова камедь gellan gum (в т.ч. торгова марка Gelrite) використовується, як альтернативний агару гелюючий засіб. Також застосовується, як харчова добавка E418. Це водорозчинний аніонний полісахарид, що виробляється бактерією *Sphingomonas elodea*.

Бактерія, що виробляє геллан, була виявлена та виділена з рослинних тканин лілії. Повторюваною одиницею полімеру є тетрасахарид, який складається з двох залишків D - глюкози та одного з кожного залишку L - рамнози та D - глюкуронової кислоти. Застосовують, як замінник гелеутворювача при значно нижчому рівні використання для заміни агару в твердих культуральних середовищах. Вона здатна витримувати автоклавування при температурі +120°C тепла. Гелланова камедь порівняно з агаром забезпечує середовищам вищу стійкість до дії ферментів.

Для досягнення еквівалентної міцності гелю потрібно приблизно половинну кількість геланової камеді порівняно з агаром, хоча точна текстура та якість середовища на основі камеді залежать від концентрації присутніх у ньому двовалентних катіонів. Вона забезпечує дуже прозорий гель, полегшуючи мікроскопічний аналіз клітин та тканин. Тому її доцільно застосовувати особливо на етапі введення в асептичні умови первинних експлантів, для покращення діагностики контамінування.

Для окремих культур (картопля, злаки), або низці технологій в біореакторах одночасно, як гелеутворювач і джерело вуглеводного живлення додають модифікований крохмаль. На відміну від нативних рослинних крохмалів більшість модифікованих крохмалів є переважно сумішшю двох фракцій гомоглюканів (полімерів глюкози) лінійної і розгалуженої будови – амілози і амілопектину.

3.11. Детермінанти ендегенної природи

3.11.1. Генотип рослин

Види рослин які добре розмножуються вегетативно (малина, ожина, картопля, лохина та ін.), мають високу регенераційну здатність у культурі *in vitro*. Є певні труднощі в індукції регенераційних процесів представників родини Бобових та ряду родин класу Однодольних.

Вводячи рослини *in vitro* враховують їх історичний центр походження, уміст елементів живлення та оптимальну кислотність ґрунту. Зокрема, фундук,

горіх, мигдаль, походять з регіонів, які мають нейтральні і слабколужні багаті на кальцій ґрунти. Тому підбираючи живильні середовища для цих культур необхідно враховувати їх кальцієфільність та кислотність. Лохина походить із регіонів з бідними болотними, торф'яними кислими ґрунтами (рН 3,5-5,0) відповідно для цієї культури застосовують кислі середовища з низьким вмістом поживних елементів, наприклад, середовище WPM Лойда-Мак Коуна (Loyd Mc Cown's Woody Plant Medium).

У межах одного ботанічного виду регенераційна здатність відрізняється. Експланти по-різному реагують на склад живильного середовища і виявляють відмінності у проліферації калусу та морфогенезі. Це спостерігається за МКР багатьох культур. Зокрема, різниця у кількості мікропагонів і їх висоті у різних сортів лохини на одному і тому ж середовищі може бути 200 % і більше.

Тому при впровадженні у промислове виробництво протоколів МКР того іншого ботанічного виду проводять, їх корегування з урахування сортових особливостей видів рослин.

3.11.2. Фізіологічний стан донорів та первинних експлантів

Фізіологічний стан материнської рослини. Успіх перших етапів МКР часто залежить від умов вирощування материнської рослини. Як підготовчий етап проводять 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 (гриби, бактерії). Контамінантами є переважно сапрофітна непатогенна мікрофлора, яка у майбутньому може потрапити з рослинним матеріалом у живильне середовище. Первинна обробка, особливі умови вирощування в депозитарії зменшують забруднення первинних експлантів та зменшують виділення ними у живильне середовище фенолоподібного ексудату.

Якщо в якості експлантів використовують бруньки, що відновили ріст то ізоляцію проводять таким чином, щоб біля бруньки залишалася невелика, розміром в 0,2-0,5 мм “п’ятка”. Перед деконтамінацію ізолюваний первинний матеріал замочують в антиоксидантному розчині (наприклад, перші 60 хв - аскорбінова кислота 200 мг/л + цистеїн 5 мг/л; наступні 60 хв 10 г/л полівінілпіролідон).

Походження первинних експлантів. На ефективність первинного культивування впливає пора року. В основі динаміки первинного потенціалу, пов'язаного з порами року, лежать зміни фізіологічного стану рослин, зокрема накопичення ендогенних гормонів. Також вміст гормонів у первинних експлантах буде відрізнятися у різних тканинах і навіть за різного розміщення органів (рис. 11). Так, верхівки пагони містять більше ауксинів, а бруньки базальної частини пагона містять більше цитокінінів.

Тотипотентність властива усім рослинним клітинам, але її прояви обмежуються невеликою кількістю меристемоїдних, морфогенно компетентних клітин, які започатковують розвиток ембріодів, бруньок, пагонів. Кращими експлантами є меристематичні тканини, яким властива висока метаболітична активність. Вони містяться в апексах пагонів, бруньках, досить часто в основах суцвіть, камбіальних тканинах.

На ефективність морфогенезу, регенерації первинних експлантів впливає і їх онтогенетичний стан та пора року. Найвищу регенераційну здатність мають первинні ізолювані на початку активного росту, тобто після пробудження. І навпаки в генеративному етапі онтогенезу та особливо в стані глибокого спокою регенераційний потенціал є дуже низьким.



Рис. 11. Теоретична схема розподілу ауксинів та цитокинінів по бруньках вихідної для живцювання рослини

Вплив розмірів експлантів на приживлюваність. Морфогенез експланта залежить від його розміру: чим він менший, тим нижча його регенераційна здатність. Великі експланти з ділянками паренхіми, провідними тканинами, камбієм швидше утворюють нові органи.

3.12. Детермінанти фізичної природи

В умовах культури на клітини, тканини впливають як трофічні, гормональні детермінанти, так і фізичні фактори (фотоперіод, освітлення різної інтенсивності, тривалості та спектрального складу, температура, осмотичний тиск тощо).

3.12.1. Світло

У природних умовах існує зв'язок між світловим режимом, інтенсивністю фотосинтезу листка й експортом з нього продуктів асиміляції та впливом на онтогенез. У культурі з джерелами гетеротрофного живлення (сахароза або інші екзогенні вуглеводи) детермінуючий ефект світла в умовах

in vitro більш проявляється через регулювання різноманітних фізіологічних процесів. Освітлення впливає на синтез та співвідношення різних класів вторинних сполук.

Світло є багатограним детермінантом онтогенезу у регенерантів. Воно впливає на метаболізм й морфогенез організму. Так, збільшення тривалості освітлення істотно впливає на збільшення висоти пагона, довжини кореневої системи.

Світловий режим регенерантів – умови освітлювання рослинних об'єктів *in vitro*. Він характеризується: інтенсивністю випромінювання, спектральним складом світла, тривалістю денного освітлення, фотоперіодом (тобто співвідношенням періодів освітлення і затемнення в умовах штучного освітлення рослин).

Вплив спектра світла на онтогенез *in vitro*. Інтенсивність світла і спектральний склад значною мірою визначають проходження окремих фаз росту і розвитку рослин (фотоморфогенез). Спектральний склад штучного світла має значний вплив на ріст стебла і його діаметр. Наприклад, за довгохвильового спектру, при використанні ламп розжарювання, стебла подовжуються, а при використанні короткохвильового (під люмінесцентними лампами) спостерігається укорочення міжвузлів.

Якщо в умовах плантацій цей процес регулювати і досліджувати складно, то культура тканин дозволяє виокремити впливи цих чинників на ріст і розвиток регенерантів. Якісний спектральний склад світла впливає не лише на інтенсивність фотосинтезу, але й на хімічний склад асимілятів. Наприклад, за синього світла у листках, крім вуглеводів, утворюються і неуглеводні продукти (органічні кислоти та ін.), і швидкість фотосинтезу зростає. Синє світло пригнічує ріст у верх; рослини вирощені під синім світлом мають короткі, потовщені пагони та темно зелені листки порівняно з рослинами вирощеними без синього світла (рис. 12). Синє світло контролює відкривання продохів.

Припускають, що за переважання червоного спектру краще росте пагін, а при збільшенні частки синього посилюється ризогенез. Для більшості культур оптимальним співвідношенням червоних і синіх світлодіодів є 4:1.

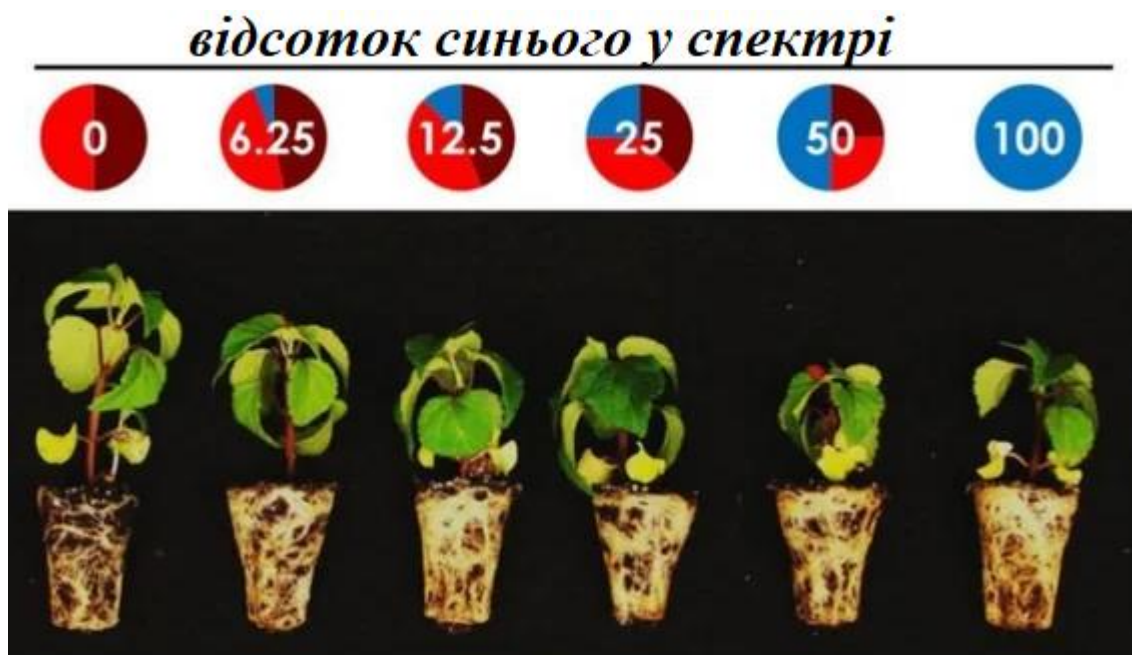


Рис. 12. Вплив синього і червоного світла на рослини

Інтенсивність освітлення. У більшості технологій культивування інтенсивність освітлення становить 1-5 кЛк, рідше до 10-12 кЛк, наприклад, при фотоавтотрофному методі мікроклонального розмноження. Інтенсивне освітлення при культивуванні світлолюбивих культур стимулює збільшення розмірів пагона та ризогенез.

Калусні тканини вирощують переважно у темряві. Соматичний ембріогенез здійснюється після перенесення калусної культури на світло.

Розташування джерела світла. Джерелом освітлення є природна сонячна радіація і штучні електроосвітлювальні прилади. Однобічне освітлення зумовлює вигинання рослин до світла і відповідну орієнтацію листків. Рівномірне об'ємне освітлення сприяє утворенню з гарним гілкуванням, добре облиствлених рослин. Верхнє освітлення стимулює посилений ріст рослин у довжину та незначне гілкування.

Фотоперіод. Реакція на фотоперіод - це біологічне явище, коли організми змінюють свої характеристики - обмін речовин, регенерацію, морфологічні та анатомічні особливості. Рослини виявляють зміни фотоперіоду завдяки пігментам фітохромам.

Як правило, збільшення тривалості освітлення протягом доби призводить до посилення ростових процесів, накопичується більша фітомаса. Регенеранти мають більші розміри, зокрема більшими є пагін та коренева система. Скорочення фотоперіоду, особливо на фоні високого вмісту вуглеводів стимулює утворення запасуючих органів.

Сезонні зміни поведінки ізолюваних тканин зазвичай пов'язують зі зміною фотоперіоду і температури, при яких вирощували донорні рослини. Відмічено, що уміст меристемоїдів і найбільш висока ступінь регенерації спостерігається у випадку вирощування рослин-донорів при оптимальних для даного виду фотоперіоді і температурі. Експланти, відібрані у рослин, які вирощувались при несприятливому фотоперіоді, утворюють мало, або зовсім не формують регенерантів, навіть у випадку, коли фотоперіод при культивуванні *in vitro* буде оптимальним.

3.12.2. Температура, осмотичний тиск та інші фізичні фактори

Температурний фактор – безпосередньо впливає на ряд процесів і особливо на активність ферментів, необхідних для метаболізації джерел живлення та інших біохімічних процесів. Для більшості культивованих тканин температурний оптимум становить +25...+26°C. Зниження температури обмежує надходження елементів живлення до рослини. При зниженні температури до +10 °C і нижче у теплолюбивих рослин, зокрема павловнії регенеранти зупиняють елонгацію пагона. Натомість відбувається потовщення бруньок. Тривалий вплив таких температур і /або подальше зниження до +2..+4 °C індукує перехід рослин до стану спокою. Посилюється цей процес в умовах зниження вологості повітря та восьмигодинного (короткого) фотоперіоду аж до скидання листя.

Якщо регенеранти павловнії *in vitro* за два - три тижні висадити у теплицю і потім знизити температуру та вологість, як наслідок, формуються мікродерева з напівздерев'янілими пагонами. За таких умов впродовж трьох тижнів настає стан спокою. З цього стану рослини за підвищення температури і вологості виходять не раніше, як за місяць, а саме з пробуджених бруньок утворювалися ювенільні листки.

У картоплі *in vitro* можна створити певні умови, які б індукували зміни в онтогенезі. Наприклад, на фоні високого вмісту сахарози у живильному середовищі (6-8 %) та цитокінінів інкубація живців пониженими позитивними температурами (+4 °C) індукує в бруньці живця відразу розвиток столона, бульби без утворення рослиною звичайного стебла.

Осмотичний тиск у рослині – один із найважливіших факторів, який впливає на розподіл води і розчинених речовин у рослинних тканинах. Осмотичний тиск поживного середовища є однією із умов спрямування і швидкості транспорту речовин через цитоплазматичну мембрану клітин. Регуляція величини осмотичного тиску здійснюється переважно варіаціями компонентів поживного середовища. У ряді випадків для підтримання відповідного осмотичного тиску до поживного середовища вводять компоненти, які не є джерелом живлення і не мають токсичних властивостей.

Умови аерації – особливо важливі при культивуванні тканин коренів і клітинної суспензії. Аерація середовища певною мірою обумовлює аеробне, чи анаеробне протікання біохімічних процесів і є одним із факторів, які спричиняють клітинну диференціацію.

Невисокий, низький уміст CO₂ на фоні додавання в живильні середовища синтетичних вуглеводнів є однією з причин ювенілізації рослинних об'єктів *in vitro*.

За фотоавтотрофного мікроклонального розмноження з використанням інтенсивного освітлення вміст вуглекислого газу навпаки збільшують у декілька разів, що є запорукою інтенсифікації утворення продуктів фотосинтезу.

Вологість повітря культуральних ємностей. В асептичних умовах рослинним об'єктам властиві ювенільні слабо розвинуті системи надходження, контролю витрати води та ніжні покривні тканини, тому в культуральних кімнатах підтримують вологість близько 70-75 %. Вища вологість може бути причиною зростання загального інфекційного фону в приміщеннях.

Перед адаптацію регенерантів в приміщеннях і по можливості напряду в самих культуральних ємностях поступово знижують вологість. У спорудах закритого ґрунту вологість повітря поступово доводять до рівня польових умов.

IV. ОЗДОРОВЛЕННЯ

4.1. Особливості боротьби з вірусами

Для боротьби з фітопатогенними грибами, багатьма бактеріями застосовують низку заходів в т.ч. хімічні з використанням пестицидів (фунгіциди, антибіотики..). Дієвих віроцидів для боротьби з рослинними вірусами в промислових плантаціях не існує. Залишається вірним вираз: “вірус можливо знищити легше знищивши господаря”. Якщо тварини захищаються від вірусів антитілами імунної системи, то рослини не мають таких агентів.

Єдиним надійним методом боротьби з вірусами є використання вільного від них посадкового матеріалу, проведення фітосанітарних прочисток та заходів контролю над переносниками вірусів.

Сучасні технології створення безвірусного посадкового матеріалу багатьох рослин складаються з системи біотехнологічних методів: оздоровлення, діагностика методами полімерланцюгової реакції (ПЛР) та мікроклональне розмноження. На сьогодні найефективніший метод оздоровлення - це культивування меристем пагона.

Що таке віруси? Для більшості видів рослин обов'язковим є поєднання мікроклонального розмноження зі звільненням від вірусів, віроїдів, бактерій, мікоплазм та інших патогенів. Ураження цими збудниками може призводити до загибелі цілих плантацій (рис. 13).



Рис. 13. Яблуневий сад, уражений бактеріальним опіком

Найскладніше звільнити рослини від найдрібніших патогенів: вірусів та віроїдів. **Вірус** – це дрібні неклітинні частки, нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК) в оболонці, найчастіше білкової. Віроїд, на відміну від вірусів немає білкової оболонки і являє собою одноланцюгову молекулу РНК. Ці патогени є внутрішньоклітинними паразитами: розмножуючись тільки в 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 в 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 (рис. 14):

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, й інші.

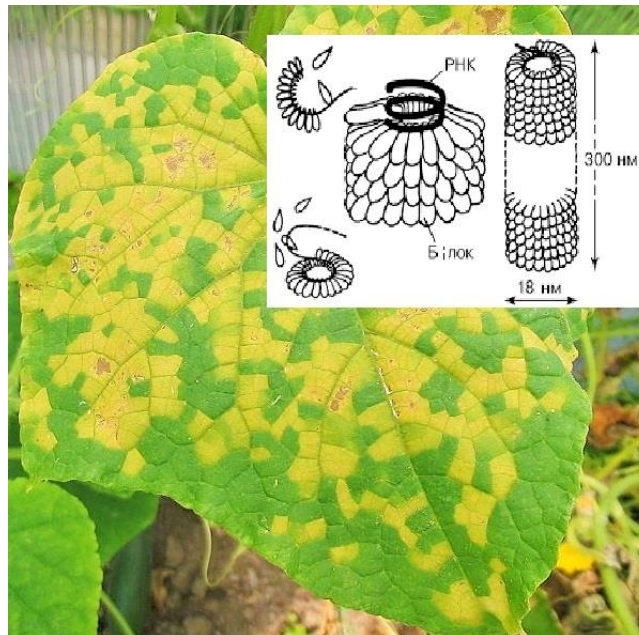


Рис. 14. Листя огірків, уражене вірусом тютюнової мозаїки

2. **Каспид** – це захисна оболонка найчастіше білкової природи. Оболонка часто побудована з ідентичних повторюваних субодиниць – капсомерів. Капсомери утворюють структури з високою симетрією.

4.2. Отримання безвірусних первинних експлантів

Технологія ізоляції первинних експлантів вільних від збудників хвороб і в тому числі й вірусів складається з основного культура меристем (обов'язкового методу) та допоміжних: термотерапії та хемотерапії. Якість технологічного процесу контролюється ПЛР діагностикою.

Система оздоровлення відбувається в 4 послідовні етапи:

1. тестування на віруси вихідних рослин;
2. термотерапія, хемотерапія;
3. 3.1. ізоляція меристем,
- 3.2. регенерація рослин *in vitro* з первинних експлантів,
- 3.3. живцювання;
4. тестування рослин-регенерантів на віруси.

Потомство окремих меристем називають меристемними лініями. Вільні за результатами ПЛР лінії перевіряють на генетичну константність і залучають у мікроклональне розмноження.

Першими застосували культуру меристеми французькі вчені Морель і Мартен у 1952 р. культивуючи ізольовані меристеми жоржин розміром 0,1 мм.

4.2.1. Термо- та хемотерапія

Як допоміжний (підготовчий до основного) метод активного лікування у комплексі з культурою меристем застосовують термотерапію. Суть її полягає, як у повному звільненні від окремих видів вірусів, так і в збільшенні безвірусних зон в апексах безвірусних верхівкових та бічних бруньок, що створює сприятливі умови для наступного виділення верхівкових тканин з метою регенерації з них здорових рослин. Застосування цих допоміжних методів дозволяє звільнити рослини лише від окремих вірусів, наприклад, вірусу скручування листя картоплі.

Також для оздоровлення культур від вірусної інфекції застосовують метод хемотерапії. Цей метод передбачає використання хімічних сполук, які мають антивірусні властивості. До антивірусних агентів належать речовини, що стимулюють ріст тканин, поділ клітин, нормальний обмін речовин, деякі ферменти, аналоги пуринових та піримідинових основ. Ці речовини не дезактивують вірусні частки незворотно, але певним чином заважають розвитку, транспорту інфекції. Однак невідомі специфічні інгібітори, здатні руйнувати вірус, не спричинивши шкоди рослині.

Термо- та хемотерапія є ланками системи оздоровлення рослин. Основою для більшості існуючих технологій звільнення рослин від вірусної інфекції є культура меристемних тканин. Підґрунтям цього методу є те, що частина меристем вільна від вірусної інфекції, та явище тотипотентності меристемних клітин.

4.2.2. Культура меристем.

Культура меристем — асептичне вирощування на поживних середовищах ізольованого із апексу, або пазушної бруньки пагона конуса наростання з одним, або двома листковими примордіями.

Остаточно не доведено, які саме чинники ускладнюють розмноження вірусу в меристемній зоні. З приводу цього існує кілька гіпотез:

- точка росту віддаляється надто швидко, і вірус просто не встигає її досягнути;
- на шляху вірусу існують механічні перешкоди, наприклад, розміри плазмодесм можуть бути надто малими;
- біохімічний склад клітин, що діляться, виключає можливість реплікації вірусу.

Апікальна меристема знаходиться на значній відстані від диференційованих тканин, але з іншого боку, на момент закладання листового горбика лише обмежена кількість клітин не охоплена диференціацією. Провідні шляхи стебла не проникають в апекс безпосередньо. Останні диференційовані елементи провідної системи досягають приблизно лише рівня третього примордія. Постачання апікальної меристеми метаболітами, а також проникнення вірусу в неї, відбувається без участі дальнього транспорту (по провідних пучках), який забезпечував би швидкий рух вірусної інфекції по рослині.

Між розміром меристем, їх приживлюваністю та відсотком вільних від патогенів експлантів існує обернена залежність. У менших експлантах менша ймовірність присутності мікроорганізмів. Зокрема, для оздоровлення використовують меристеми 0,1-0,2 мм. Внаслідок їх малих розмірів приживлюваність є низькою, тобто між приживлюваністю і ефективністю звільнення від мікроорганізмів є обернена кореляційна залежність (рис. 15).

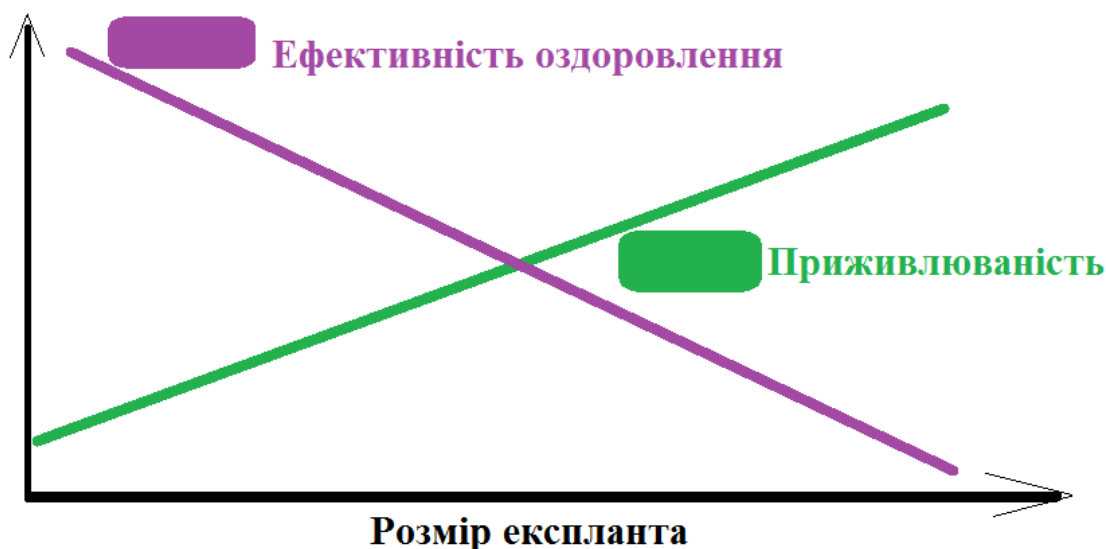


Рис. 15. Вплив розміру експлантів на їх приживлюваність та ефективність оздоровлення

Лише частина меристем регенерує рослини, вільні від вірусу. З приводу цього існують наступні припущення: 1) вірус відсутній у меристемній тканині, однак окремі зразки можуть бути ним забруднені під час ізоляції; 2) деякі частини меристеми можуть містити вірус, а інші – ні; 3) вірус, наявний у меристемі, переходить у латентну форму при культивуванні на штучному поживному середовищі.

Використовуючи меристемо-тканевий метод важливо пам'ятати, що рослини, вирощені з меристеми, і які виглядають здоровими, повинні через певний час піддаватися перевірці на рецидиви вірусної інфекції.

Крім меристемо-тканевої культури застосовують також добір здорових рослин та ізоляцію їх від перезараження. У деяких країнах для отримання безвірусної насінневої картоплі з рослин, вільних від вірусів, чорної ніжки, фомозу, ризоктонії та інших хвороб, що передаються вегетативно, відбирають живці, або бруньки для прискороного розмноження із здорових польових рослин.

При застосуванні культури меристем у поєднанні з термо – та хемотерапією є істотні недоліки. По-перше, через складність застосування діагностики, мутування мікроорганізмів з появою нових форм, штамів важко стверджувати

100 %, що отримані рослини *in vitro* є вільними від вірусів. По-друге, відомі факти утворення термостійких вірусів, що зводить нанівець використання методу термотерапії. По-третє, за певних умов гени вірусів вмонтовуються в геном рослини, а тому стають не досяжними для експериментаторів, тобто, вказані методи не гарантують отримання рослин, вільних від вірусної інфекції.

Проте, не зважаючи на різноманітність поглядів культура меристеми є методичною основою безвірусного насінництва, розсадництва у більшості країн світу.

4.2.3. Експертиза якості оздоровлення. ПЛР

Відсутність симптомів ураження – не привід вважати посадковий матеріал якісним. Планування і проведення фітопатологічної експертизи рослин, зокрема зі застосуванням ІФА- та ДНК-тестування особливо небезпечних для культур збудників, дозволять бути впевненим в отриманні здорового сертифікованого садивного матеріалу. Лише розмноження посадкового матеріалу *in vitro* не гарантує звільнення від інфекції. Візуально здорові рослини можуть містити інфекцію в латентній формі.

Для гарантії відсутності того чи іншого патогену необхідно протестувати вихідні материнські рослини. Лише після результатів тестування розпочинають клонування. Отриманий посадковий матеріал називають “тестований оздоровлений (безвірусний) розмножений *in vitro*”. У документах, які супроводжують рослини вказують на метод та види патогенів, на наявність яких проводилось тестування.

У науковій та комерційній практиці застосовують такі методи тестування: візуальне обстеження, метод рослин індикаторів, електронна мікроскопія, імуноферментний аналіз (ІФА), метод полімеразноланцюгових реакцій (ПЛР).

Візуальний облік проводять, враховуючи типові симптоми у випадку ураження рослин відповідними вірусами. Однак часто вірусна інфекція може знаходитися у латентній формі і не проявлятися. Нерідко симптоми ураження

вірусами схожі на нестачу елементів живлення, хімічні пошкодження (гербіциди) або грибні хвороби.

ІФА визначає інфекцію завдяки реакції утворення комплексів білків патогенів і антитіл.

Найбільш точним і поширеним в останнє десятиліття є **ПЛР**. Цей метод розроблено Кері Мюлісом у 1983 р., а в 1993 р. учений отримав за це відкриття Нобелівську премію з хімії. ПЛР – метод молекулярної біології, принцип якого полягає у багаторазовому збільшенні копій цільової ділянки ДНК *in vitro* (рис. 16). Його назва походить від англійського терміну полімеразна ланцюгова реакція. Як правило ампліфікують послідовність ДНК розміром від 100 п.н. до 5 т.п.н.

Ампліфікація – збільшення кількості ДНК, або копій певної послідовності ДНК.

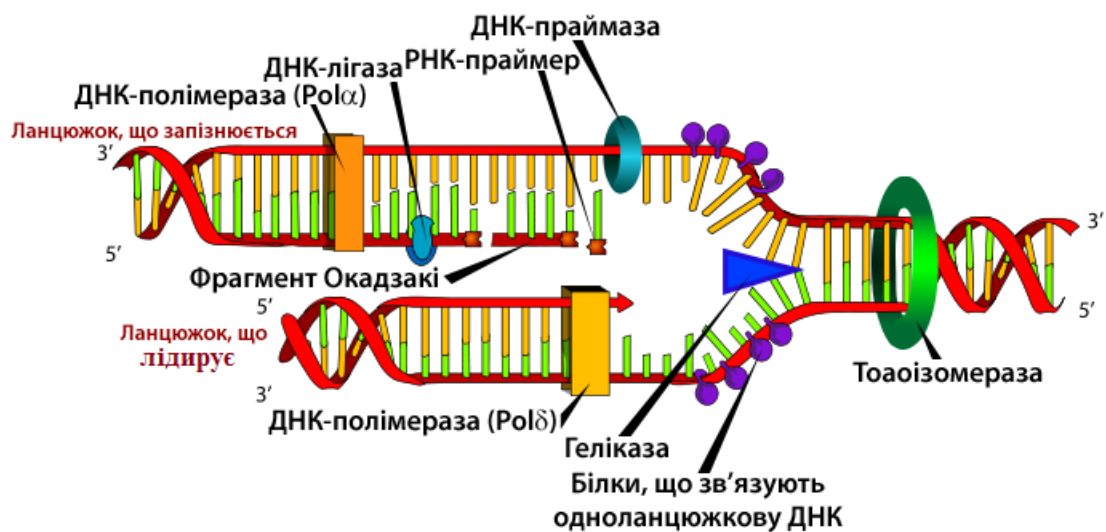


Рис. 16. Схематичне зображення реплікації ДНК.

Для проведення тесту необхідно взяти зразок матеріалу для тестування, потім проводиться аналіз, щоб виявити конкретний генетичний матеріал, характерний для певного вірусу.

ПЛР завдяки своїй високій чутливості й специфічності дозволяє встановити поодинокі копії геномів патогенів і одночасно визначає їх наявність тоді, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити майже неможливо. Метод ПЛР-аналізу дозволяє проводити ранню діагностику фітопатогенних мікроорганізмів сільськогосподарських, декоративних та інших культур ще до появи їх видимих симптомів у полі та безпосередньо доводить присутність збудника інфекції, специфічно визначаючи наявність конкретної послідовності нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), виявленого патогена. Перевага такого тесту полягає в тому, що він виявляє невелику кількість вірусу, або виявляє вірус у дуже малих зразках.

Під час ампліфікації матрицею можна використовувати геномну ДНК різних видів про- та еукаріот, ДНК виділену з культури клітин, бактеріальних клонів, бібліотек генів, а також різні види РНК (зокрема, мРНК).

Кількість копій обраної ділянки ДНК чи РНК у ході ПЛР може бути збільшена у 10^8 - 10^9 разів, що робить можливим її візуалізацію.

Перевага, висока чутливість і відтворюваність забезпечують переваги у наступному:

- ДНК можна екстрагувати із будь якого, навіть деструкторованого біологічного матеріалу (тканини організмів, харчові продукти, об'єкти довкілля, в т.ч. і мікроорганізми);
- для різноманітного аналізування може бути використано один набір приладів і доступний набір реактивів;
- для здійснення аналізу достатніми є “мікрокількості” виділеної ДНК;

Синтез нових ланцюгів починається з двох штучно синтезованих одноланцюгових праймерів, які орієнтовані 3'-кінцями¹ один до одного та в бік ампліфікованої послідовності, тобто відстань між праймерами буде визначати розмір амплікона, що утворюється в процесі ПЛР.

¹ Асиметричні кінці ланцюга ДНК називаються 3' (читається *три-штрих*) і 5' (*п'ять-штрих*). Полярність ланцюга грає важливу роль при синтезі ДНК (подовження ланцюга можливе тільки шляхом приєднання нових нуклеотидів до вільного 3'-кінцю).

***Праймер** – короткий фрагмент нуклеїнової кислоти, або пов'язана молекула, що служить початковим пунктом реплікації ДНК. Праймер потрібний через те, що жодна ДНК-полімераза (фермент, який каталізує реплікацію ДНК) не може почати синтез нової молекули ДНК з одностанцюгової матриці, оскільки їй потрібна двостанцюгова ділянка для приєднання до ДНК, а також вони здатні лише приєднувати нуклеотид до вже наявної -ОН групи на 3'-кінці іншого нуклеотиду.*

Синтез нових послідовностей ДНК відбувається циклічно і, починаючи з другого циклу, нові молекули ДНК є матрицею для подальшого синтезу цільового амплікона. ПЛР приводить до експоненціального росту копій ділянки ДНК, обмеженої праймерами.

Крім праймерів для здійснення реакції необхідний фермент **ДНК-полімераза**, фермент який приймає участь у реплікації ДНК. Ферменти цього класу каталізують полімеризацію дезоксирибонуклеотидів уздовж ланцюжка ДНК, який фермент «зчитує» і використовує, як шаблон. Тип нового нуклеотида визначається за принципом комплементарності до матриці, з якої ведеться зчитування. Молекула ДНК, що синтезується, є комплементарною до матричного ланцюга й ідентична з одним із ланцюгів другої подвійної спіралі.

Розрізняють ДНК-залежну ДНК-полімеразу (КФ 2.7.7.7), що використовує як матрицю один з ланцюгів ДНК, і РНК-залежну ДНК-полімеразу (інша назва — зворотна транскриптаза КФ 2.7.7.49), здатну до зчитування інформації з РНК (зворотна транскрипція). ДНК-полімераза є голоферментом, оскільки для нормального функціонування вона потребує присутності іонів магнію, як кофактора. При відсутності іонів магнію про неї можна говорити як про апофермент.

Використовуючи праймери, специфічні для того чи іншого вірусу, ПЛР може успішно ампліфікувати ДНК та виявити присутність у ньому вірусу.

V. ЕТАПИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

Мікроклональне розмноження залежно від походження меристем, бруньок може відбуватися прямим морфогенезом активацією існуючих бруньок так і непрямим морфогенезом індукцією утворення меристемодів, бруньок з не диференційованої калусної культури. Не залежно від шляху морфогенезу МКР поділяють на чотири етапи:

- I деконтамінація та культивування первинних експлантів;
- II мультиплікація (живцювання);
- III індукція ризогенезу;
- IV постасептична адаптація рослин.

5.1. Підготовчий етап

У протоколах МКР того чи іншого ботанічного виду досить часто виділяють окремий підготовчий етап ("0" етап). Проводять заходи підготовки маточних рослин донорів - експлантів. Ці рослини вирощують в ізольованих теплицях, або інших спорудах закритого ґрунту (депозитарій). Вони мають регульоване освітлення, ізоляцію від переносників патогенів. У депозитарії проводять такі заходи: перевірка на сортотиповість, обробка пестицидами для захисту від контамінування грибами, бактеріями, вірусами та іншими мікроорганізмами і їх переносниками (попелиці, кліщі); обрізка пагонів, яка стимулює пробудження бруньок та інше.

Підготовка маточних рослин у депозитарії підвищує ефективність робіт на I етапі МКР, а саме: зниження самоінтоксикації первинних експлантів продуктами окиснення фенолоподібних речовин; зменшення відсотку ендогенного контамінування.

Для культур яким притаманна потенційна висока мутагенність (суниця, малина) майже щорічно із маточних тестованих на віруси та генетичну ідентичність постійно проводять отримання нових ліній *in vitro*.

При відборі, підтриманні маточних рослин проводять тестування на наявність вірусів та інших збудників хвороб.

5.2. Отримання асептичної морфогенної культури на першому етапі мікроклонального розмноження

Технологічні завдання першого етапу стосовно рослинного матеріалу:

- *асептичний;*
- *морфогенність;*
- *збереження генетичної константності.*

Для отримання асептичної культури застосовують антисептики, біоциди щоб знищити екзогенну мікрофлору що знаходиться на поверхні первинних експлантів. Первинними експлантами називають частини донорних материнських рослин *in vivo* для отримання асептичної культури. Мікрофлора що знаходиться в середині експлантів (напр. в ксилемі) називають ендогенною, зовні - екзогенною. Для боротьби з екзогенною використовують контактні, а для знищення ендогенної - системні препарати, які мають вибіркову дію на окремі види мікроорганізмів (фунгіциди, антибіотики...).

*Процес проведення заходів з метою усунення забруднюючих біологічних агентів з поверхні експлантів. які можуть становити ризик для рослинних об'єктів, живильного середовища асептичної культури є **деконтамінацією** (від лат. de — префікс, що означає видалення, і contaminatus — нечистий, заражений) — процес проведення заходів з метою усунення біологічних агентів з поверхні первинного експланта.*

Первинні експланти важливо отримати не тільки стерильними, а і здатними до деферинціації, морфогенними, тобто такими, які мають регенераційний потенціал. Завдяки тотипотентності з тканини, а в окремих випадках окремої клітини відновлюється цілісний організм.

Рослинні об'єкти під час адаптації до асептичних культуральних умов переходять із автотрофного живлення (фотоасиміляція) до міксотрофного з переважанням гетеротрофного завдяки екзогенним органічним речовинам.

Проводяться одночасно із деконтамінуванням заходи щоб зберегти, або індукувати морфогенний потенціал. Це вирішують підбором компонентів живильного середовища:

- додаванням комбінацій гормонів цитокінінів, ауксинів, гіберелінів;
- органічних речовин аналогів первинних (вуглеводи, амінокислоти) та вторинних метаболітів (вітаміни);
- адсорбентів (активоване вугілля) та антиоксидантів (аскорбінова кислота), які вберігають від самоінтоксикації метаболітами та шкідливими продуктами накопичення, перетворення компонентів живильного середовища.

У більшості ботанічних видів повна адаптація до умов *in vitro* відбувається після 3-5 пасажу. На першому етапі склад живильних середовищ змінюють. Спочатку, як правило первинні експланти висаджують на середовища із зменшеним умістом елементів живлення (наприклад, вдвічі) та високим умістом цитокінінів і додаванням гіберелінів. Враховуючи перебудову метаболізму та ефект накопичення гормонів у тканинах “про запас” склад середовищ корегують з кожним пасажом. Для боротьби із самоінтоксикацією продуктами окиснення фенолів додають найчастіше антиоксиданти та створюють умови щоб донори експлантів менше синтезували фенолоподібних сполук, наприклад вирощування материнських рослин в умовах розсіяного освітлення та низького азотного живлення.

5.3. II мультиплікація (живцювання)

Технологічні завдання другого етапу МКР: високий коефіцієнт розмноження без втрати генетичної константності та морфогенності в т.ч. й здатності до ризогенезу в наступному етапі.

II етап МКР передбачає живцювання (мультиплікацію) вихідного матеріалу з максимально можливим коефіцієнтом розмноження без втрати здатності рослинних об’єктів до проліферації, регенерації. Коефіцієнт розмноження впершу чергу залежить від кількості експлантів з одного донора,

періоду росту регенеранта із експланта та браку. Для збільшення кількості експлантів стимулюють активність бруньок, знімаючи у більшості випадків апікальне домінування цитокінами.

У технологіях з прямим морфогенезом поділ маточних рослин відбувається на стеблові експланти. Це можуть бути:

- одно- двовузлові **живці**, тобто частини пагона з бруньками, що отримують діленням пагона;

- **мікропагони** отримані поділом конгломерату мікропагонів (рис. 17.)

I – поділ пагона на одно-двовузлові живці;

II – поділ конгломерату на мікропагони.

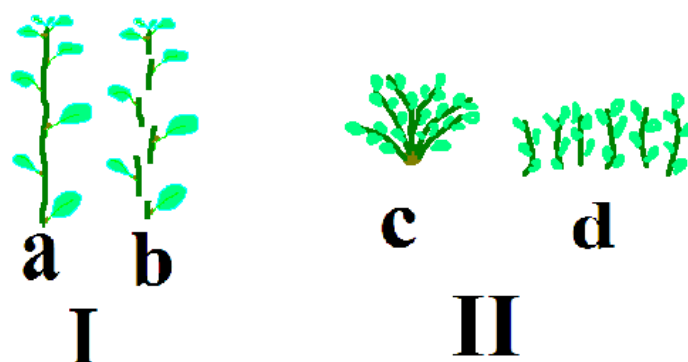


Рис. 17. Способи поділу вихідних рослин, де:

I – спосіб поділу на одновузлові живці; **a** - вихідна рослина із одним добре розвиненим пагоном, яка виросла за апікального домінування;

b – одновузлові живці.

II – спосіб поділу конгломерату на мікропагони; **c** - вихідна рослина-конгломерат мікропагонів, яка виросла без апікального домінування; **d** – мікропагони.

Для культур із вкороченим пагоном другий спосіб є єдиним. Наприклад, для хости (рис. 18), анемони (рис. 19).

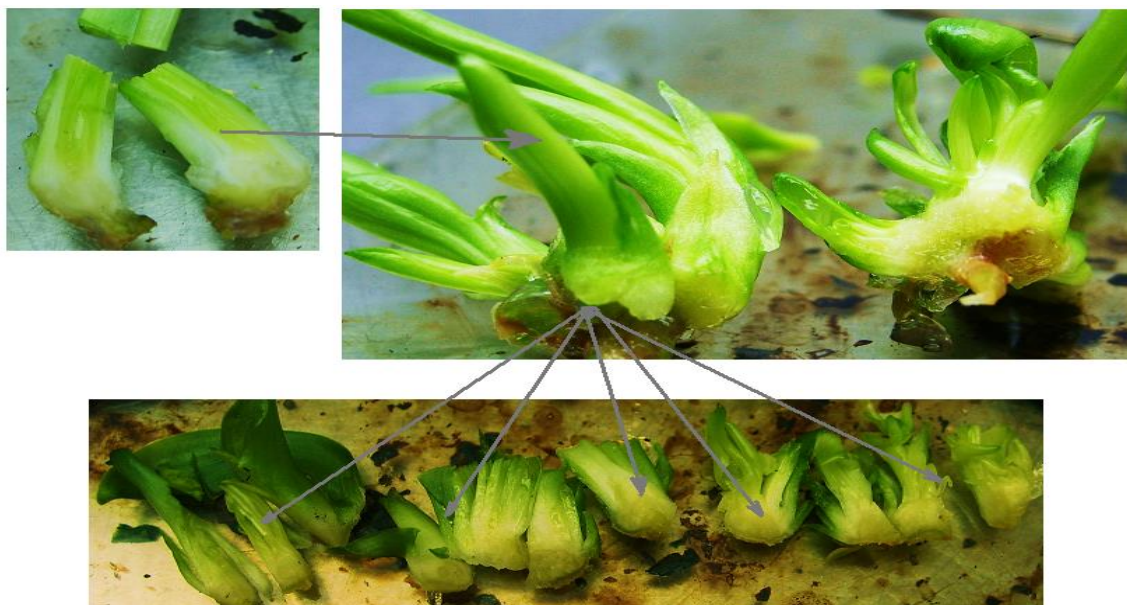


Рис. 18. Зняття апікального домінування поділом денця, сорт Гіацинтіна



Рис. 19. Конгломерат мікропагонів анемони *in vitro*, сорт little White Princess

5.4. III. індукція ризогенезу

Технологічні завдання: стимулювати утворенню кореневої системи, що є основою адаптації in vitro - ex vitro - in vivo.

Це перш за все сприяє кращому забезпеченню водою та розчинених у ній елементів живлення. Також розвинута коренева система завдяки синтезу біологічно активних речовин (цитокініни) впливають на онтогенез регенерантів.

Для індукції і стимулювання ризогенезу застосовують такі заходи:

- 1. Згідно правила Скуга-Мілера зменшують у середовищі уміст цитокінінів та збільшують концентрацію ауксинів;
- 2. Збільшують інтенсивність освітлення;
- 3. Збільшують уміст фосфору та зменшують уміст нітрогену. В окремих випадках концентрацію мінеральної частину зменшують. Такі середовища позначають наприклад, як $MS_{1/2}$. Це означає середовище за прописом Мурасіге і Скуга із зменшеним умістом мінеральних елементів удвічі. Менша кількість цих елементів стимулює розростання кореневої системи, але рослини в цілому ростуть повільніше.
- 4. Додавання в живильне середовища активованого вугілля. Воно затіняє середовище та є адсорбентом токсичних речовин, в т.ч. і метаболітів самої рослини.

Третій етап МКР передбачає, як пересадку на середовище цілої рослини-регенеранта на середовище, що індукує коренеутворення, або живцювання маточних рослин і висадку експлантів зі збільшеним умістом ауксинів.

В окремих технологіях застосовують для стимулювання коренеутворення замочування рослинних об'єктів (цілих регенерантів або експлантів) в розчині ауксинів.

5.5. Постасептична адаптація

IV етап МКР називають постасептична адаптація, аклімація, реадаптація. На цьому етапі відбуваються морфолого-анатомічні пристосувальні зміни задля виживання рослин *ex vitro*.

Технологічні завдання: досягти змін метаболізму, водного обміну та анатомічних утворень у рослин. Також в окремих технологіях відбувається живцювання в постасептичних умовах завдяки ювенільному стану набутому *in vitro*.

Ювенілізація і культивування рослин в умовах *in vitro* зумовлює необхідність додавання екзогенних гормонів, інших біологічно-активних речовин та гетеротрофного живлення, змінюється гормональний баланс об'єкту який культивується. Це впливає на кількість та активність ферментів, що відбувається на проходженні метаболічних реакцій і, відповідно, морфогенезу і життєдіяльності рослинного організму.

Рослинним об'єктам за більшості технологій МКР властивий міксотрофний спосіб живлення з переважанням гетеротрофного, тобто в основі обміну речовин, синтезу молекул лежить перетворення органічних речовин, а не утворення їх з неорганічних, як це відбувається за виключно автотрофного живлення. Автотрофність *in vitro* (фотосинтез) займає порівняно мізерну частину живлення. У “пробірці” рослини мають меншу кількість хлоропластів.

Також в асептичних факторостатичних умовах змінюється, як поглинання водного розчину так і випаровування води.

Зазнають змін і клітини покривних тканин. Їм властиві порівняно тонші оболонки з меншим шаром захисних речовин (кутикула, воск..).

Якщо регенеранти зі вказаними біохімічними і морфологічними змінами перенести відразу у відкритий ґрунт, то більшість з них загине від стресу, тому між “пробіркою” і “відкритим ґрунтом” рослини *in vitro* культивують в умовах за котрих відбувається цикл пристосувальних змін організму *ex vitro*.

Водообмін: рослини *in vitro* поміщають у “вологі камери” із поступовим зниженням вологості із 100-90 до 60-70%.

Ризогенез: висадка регенерантів проводиться на субстрати, які відповідають за показником рН ботанічному виду. Підбирають субстрати в котрих одночасно забезпечується коренева система, як вологою так киснем. Відомо, що життєдіяльність кореня можливо лише в умовах аеробного (кисневого) дихання.

Освітлення: протягом періоду освітлення збільшують від розсіяного до типового для відкритого ґрунту.

Ніжні рослини *in vitro* особливо в умовах стресу сприйнятливі до ураження збудниками хвороб та шкідниками, тому проводять ряд профілактичних заходів. Це зокрема, обробка фунгіцидами, передпосадкова стерилізація субстратів, використання субстратів які унеможливають розвиток ратогенів (наприклад, гриби не можуть накопичуватися на перлітовому субстраті).

VI. РІЗНОВИДИ МКР

6.1. Методи з непрямим морфогенезом



Рис. 20. Регенерація із калюсу адвенттивних пагонів павловнії придатних для МКР прямим морфогенезом

Технології МКР з непрямим морфогенезом передбачають утворення бруньок, зародків, органів із недиференційованих тканин, або утворення адвентивних органів (рис 20.).

Адвентивні, або придаткові органи у рослин — бруньки, корені та інші органи рослин, які утворюються на не звичайних для їх виникнення місцях. Придаткові органи розвиваються з вторинних твірних тканин. Придаткові корені, які утворюються на стеблах, листках, значно збільшують обсяг кореневої системи.

Мікроклональне розмноження, культура меристем (оздоровлення) та процеси диференціації і дедиференціації тісно пов'язані, як у сучасному розсадництві, так і селекції. Дедиференційовані клітини, тканини калюсів, клітинних суспензій актуальні як напрям, що є зручним для маніпуляцій, як шляхом трансгенезу, соматичної гібридизації так і для глибокого дедиференційовання *in vitro* рослинного матеріалу ботанічних видів у котрих на перших етапах мікроклонального розмноження прямий морфогенез у первинних експлантів є проблематичним. Припускаємо, що глибока дедиференціація в калюсній культурі є одним із основних факторів дерепресування ювенільних генів.

Для розмноження непрямим морфогенезом з дедиференційованих клітин індують утворення бруньок, або ембріодів.

За методів непрямого морфогенезу ймовірна більш масштабна ювенільнізація за рахунок депресування генів ембріонального та ювенільного періодів розвитку організму.

Отримання регенерантів можливе в двох варіантах:

- постійна індукція морфогенезу з недеференційованого матеріалу;
- подальше клонування отриманих регенерантів прямим морфогенезом.

Розмноження непрямим морфогенезом доцільно для:

- розмноження видів рослин в яких мало вихідного матеріалу;
- прямий морфогенез складний або не можливий;
- для подальшої селекції;
- наукових цілей.

6.2. Штучне насіння

За культивування клітинних суспензій, пухких калюсів на середовищах з низьким умістом, як цитокінінів так і ауксинів формуються біполярні ембріодиди, зародкоподібні структури.

Ембріод – це зародкоподібна біполярна структура, що утворюється асексуально. Цей термін було запропоновано Везілом та Хільдебрантом для позначання зародкоподібних структур, які виникають, як в умовах *in vivo* (“нуцеллярні” і “фоліарні” зародки), так й *in vitro*.

В умовах *in vitro* індукція утворення ембріодів може відбуватися двома шляхами – прямим – безпосередньо в культурі пиляків і мікроспор та непрямим шляхом – за рахунок утворення калусу та індукції соматичних зародків.

Соматичний ембріогенез (ембріодогенез) – це утворення соматичних зародків (ембріодів). Соматичний зародок (ембріод) – біполярна структура зі спряженим розвитком апексів пагона та кореня. Зовні ембріод нагадує статевий зиготичний зародок даного виду, але виникає асексуально, тобто, нестатевим шляхом з соматичних клітин як спорофіту, так і гаметофіту.

При соматичному ембріогенезі (ембріоїдогенезі) соматичні зародки, які виникають в культурі *in vitro*, розвиваються зі звичайної соматичної клітини експланту, або калусу, мають тільки материнську спадковість, але у своєму розвитку повторюють закономірності зиготичного ембріогенезу, притаманного конкретному виду.

Останнім часом на основі соматичного ембріогенезу інтенсивно розвиваються технології отримання штучного насіння з розмножуваних у лабораторних умовах (*in vitro*) рослин. Дана технологія дозволяє отримати велику кількість однорідного рослинного матеріалу, що має здатність до формування цілих рослин. Штучне насіння може служити способом збереження генетичного матеріалу рідкісних видів рослин, тим самим сприяючи збереженню біорізноманіття. Крім того, воно є зручною формою обміну стерильного рослинного матеріалу в дослідницьких цілях.

Розмноження деяких видів культур не принесло успіхів, внаслідок гетерозиготності насіння, їх дрібного розміру, наявності недорозвиненого ендосперму, вимог насіння в мікоризних грибах для проростання (наприклад, орхідеї), а також у разі деяких безнасінних сортів культур, таких як виноград, кавун та ін. Деякі з цих видів можуть розмножуватися вегетативними способами, однак технологія вегетативного *in vivo* розмноження є трудомісткою і дорогою.

Розробка технології штучного насіння розглядається, як ефективний альтернативний метод розмноження деяких важливих сільськогосподарських культур, а також елітних видів рослин із високою комерційною цінністю.

Технології штучного насіння один з шляхів автоматизації процесів мікроклонального розмноження і в т.ч. постасептичної адаптації.

Термін "**штучне насіння**" часто визначається, як аналог ботанічного насіння, що складається з соматичного ембріона, оточеного штучною насіннєвою оболонкою. Це визначення ґрунтується на схожості соматичного ембріона з зиготним у морфологічному, фізіологічному і біохімічному відношенні. Вчені відзначають, що соматичний ембріон, укладений в штучну

насіннєву оболонку, найбільш еквівалентний незрілому зиготному ембріону. У багатьох видів рослин у незрілому ембріоні на цій стадії все ще присутній ендосперм, тканина ендосперму руйнується, коли зиготний ембріон досягає стадії повної зрілості. Отже, соматичний ембріон повинен бути оточений не тільки штучною насіннєвою оболонкою, але також і штучним ендоспермом для того, щоб бути повним аналогом ботанічного насіння, що складається з соматичного ембріона. Це забезпечує проростання та ріст рослин у польових умовах.

Синтетичним насінням можуть бути штучно закапсульовані рослинні паростки, тобто пагони, соматичні ембріони, клітинні з'єднання, або будь яка тканина рослини, які можуть бути посаджені як насіння і мають можливість перетворюватись у цілу рослину в лабораторних умовах, або в умовах *ex-vitro*.

6.3. Погружні культури

Біореактори, або системи тимчасового занурення (технології TIS) мають різноманітні характеристики, які роблять їх ідеальними для використання в напіваавтоматизованому мікророзмноженні великої кількості видів (рис. 21). Це стерильні контейнери для навколишнього середовища, які використовують переваги рідких поживних речовин і повітряних систем у системі входу та випуску (рис. 22).

Вони розроблені для інтенсивного вирощування та для збільшення масштабів, гарантують можливість моніторингу та контролю умов мікросередовища (наприклад, аерація, температура).



Рис. 21. Культуральна кімната із біореакторами



Рис. 22. Різні системи тимчасового занурення, де 1 - ємність з рослинними об'єктами; 2 - ємність для рідкого живильного середовища

Основна характеристика технології TIS, як вказує його назва, полягає в тому, що культивовані рослини не повністю занурені в рідке середовище, а лише на короткий час контактують з живильним середовищем, дозволяючи атмосфері контейнера оновлюватися. Рослинний матеріал занурюється в рідке середовище росту на короткий час і через рівні проміжки часу. Цих занурень достатньо, щоб рослини засвоїли поживні речовини (рис. 23, 24).

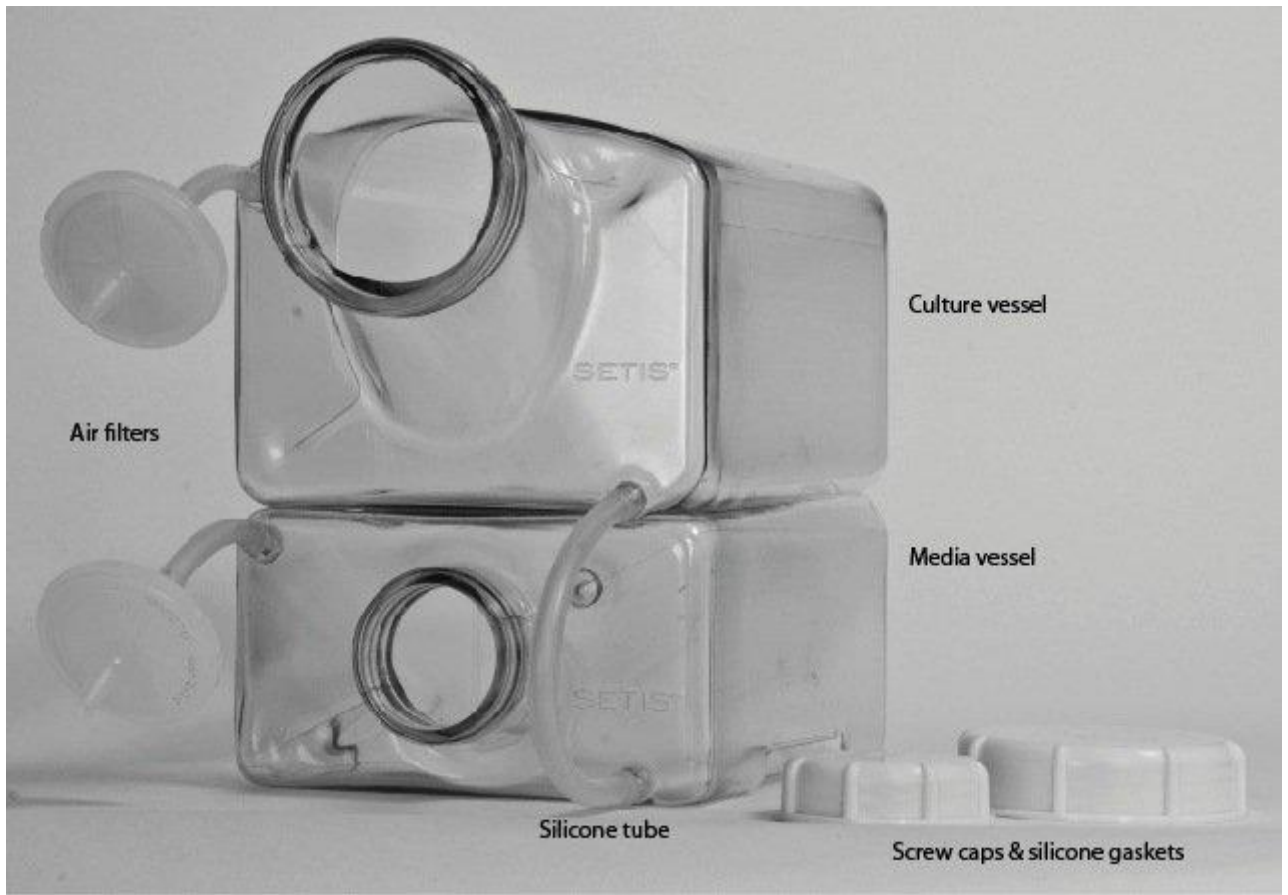


Рис. 23. Будова системи тимчасового занурення від SETIS™ (<https://setis-systems.be/home>)

Системи тимчасового занурення дозволяють контролювати забруднення, достатню кількість поживних речовин і повітря, менше пересадок, легку зміну середовища та менше пошкодження рослин через необережні технологічні роботи. В останні роки різні системи тимчасового занурення використовувалися для мікророзмноження великої кількості видів рослин.

Стаціонарна фаза

Стиснене повітря не подається. Середовище росту залишається в посудині із середовищем і рослинному матеріалі в газовому середовищі. Біореактор є більшою частиною під час цієї фази.



Фаза занурення

Стиснене повітря подається в посудину із середовищем, щоб перенести середовище росту у верхню посудину з культурою. Рослинний матеріал залишається в рідкому середовищі і відбувається засвоєння поживних речовин.



Фаза зливу

Середовище для росту повертається під дією сили тяжіння до судини із середовищем.



Фаза вентиляції

У культуральну посудину подається стиснене повітря для відновлення його внутрішнього газового середовища.



Рис. 24. Приклад роботи системи тимчасового занурення від SETIS™ (<https://setis-systems.be/home>)

6.4. Фотоавтотрофний метод

МКР все більше і більше знаходить комерційне застосування в промисловому вирощуванні, як декоративних, лісових так і сільськогосподарських культур (рис. 25). Водночас, метод через міксотрофне з дуже високою часткою гетеротрофного живлення рослин *in vitro* характеризується рядом недоліків, що впливають на технологічність такого розмноження:

1. Високі затрати на органічні компоненти середовищ, в т.ч. гормони, агар, сахароза.

2. Фізіологічні проблеми рослинних об'єктів, пов'язані зі змінами на етапах переходів *in situ* – *in vitro* – *ex vitro* – *in situ*. Зокрема, через проблем, пов'язані з постасептичною адаптацією регенерантів *in vitro*, втрати рослин можуть становити 70 і більше відсотків.

3. Необхідний тривалий час на утворення повноцінної кореневої системи та фотоасимілюючих органів.

Тому, поряд із гетеротрофними методами МКР в останні десятиліття все ширше застосовують фотоавтотрофний метод МКР (далі ФАМКР). З однієї сторони це удосконалене зелене живцювання, а з іншої застосовуються нові підходи, зокрема інтенсифікація фотосинтезу *in vitro*.

За ФАМКР рослинні об'єкти розмножують подібно звичайному МКР, але без джерел екзогенних вуглеводів (sugar-free medium).

Вуглеводи регенерант синтезує сам, але при синергічному посиленню двох факторів фотосинтезу: 1. збільшення в повітрі умісту CO₂; 2. збільшення інтенсивності освітлення.

Посилення лише одного з вказаних факторів не дає суттєвого ефекту.



Рис. 25. Культуральна ємність (об'єм: 20 л) із системою примусової вентиляції та інтенсивного освітлення ФАМКР, розробленою Zobayed et al. (2000). Розміри: довжина 610 мм, ширина 310 мм і висота 105 мм.

За ФАМКР можливе клонування експлантів ізольованих *in vivo* та експлантів, регенерантів *in vitro*. Завдяки ювенілізації об'єктів *in vitro* регенераційний процес відбувається швидше. Ювенільність підтримується залежно від ботанічного виду культури впродовж перших 3-5 живцевих поколінь. Це забезпечує високу ефективність живцювання *ex vitro* в т.ч. і технологіями ФАМКР.

VII. ЮРИДИЧНІ ТА ЕКОНОМІЧНІ АСПЕКТИ МКР

7.1. Юридичне регламування розмноження рослин

Культура тканин ще в минулому столітті вийшла за межі наукових лабораторій, тобто комерціалізувалася, відповідно цей напрям регулюється законами ринку та юридичними документами.

З юридичної точки зору розмноження комерційних сортів, гібридів форм має враховувати право інтелектуальної власності (тобто “роялті”). ***Право інтелектуальної власності на сорт рослин*** становлять особисті немайнові права інтелектуальної власності на сорт рослин та майнові права інтелектуальної власності (ІВ) на сорт рослин. Особисті немайнові права ІВ на сорт рослин засвідчуються охоронним документом — свідоцтвом про авторство на сорт рослин (рис. 26). ***Майнові права ІВ на сорт рослин*** засвідчуються охоронним документом — патентом на сорт рослин та вносяться до Державного реєстру патентів на сорти рослин

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
З ОХОРОНИ ПРАВ НА СОРТИ РОСЛИН

СВІДОЦТВО

№ _____

ПРО АВТОРСТВО
НА СОРТ РОСЛИН

назва сорту _____

ботаничний таксон _____

Заявка № _____

Автор(и): _____

Голова Державної служби
з охорони прав на сорти
рослин _____

(підпис) _____ (ініціали, прізвище) _____

М.П. _____

права ІВ на сорт рослин

МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
З ОХОРОНИ ПРАВ НА СОРТИ РОСЛИН

ПАТЕНТ

№ _____

на сорт рослин

назва сорту _____

ботаничний таксон _____

Дата пріоритету: _____

Дата державної реєстрації
майнових прав інтелектуальної
власності на сорт рослин: _____

Володілець(льці): _____

Голова Державної служби
з охорони прав на сорти
рослин _____

М. П. _____ (підпис) _____ (ініціали, прізвище) _____

Майнові права ІВ на сорт рослин

Рис. 26. Документи що засвідчують інтелектуальну та майнову власність на сорт

Комерційно розмножувати дозволяється сорти за згодою власника сорту, які пройшли державну реєстрацію та занесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні. Реєстр знаходиться на офіційному сайті «Державного центру сертифікації та експертизи сільськогосподарської продукції» (рис. 27).

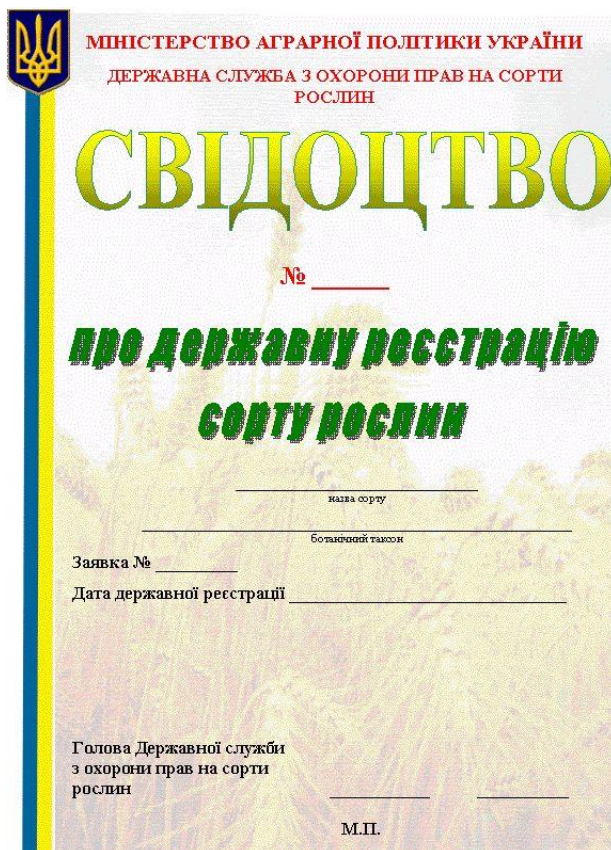


Рис. 27. Документи які дозволяють розповсюджувати сорт в Україні

Для окремих ботанічних видів розроблені стандарти з мікроклонального розмноження:

- ДСТУ 4813:2007 Живці малини. Мікроклональне розмноження. Загальні вимоги;
- ДСТУ 4949:2008 Розсадництво плодових культур, винограду та хмелю. Культура ізольованих тканин. Порядок створення.

7.2. Регламентування якості

Відповідно до ст.15 Закону України від 26.12.2002 р. № 411-IV «Про насіння та посадковий матеріал» продавати посадковий матеріал можна лише після його сертифікації (рис. 28).



Серія СП

10328
ISO 9001:2015

№ 016367

СЕРТИФІКАТ,**що засвідчує товарні якості садивного матеріалу,**від 29.07.2021 р. № 129988

Виданий Державним підприємством "Державний центр сертифікації"
 (повне найменування органу з оцінки відповідності, що належить до сфери управління
 і експертизи сільськогосподарської продукції, м.Київ, вул. Януша Корчака, 9/12
 Мінагрополітики, або органу з оцінки відповідності незалежно від форми власності)
 на садивний матеріал, що належить ФГ "Батьків сад",
 (прізвище, ім'я по батькові фізичної

Хмельницька область, Деражнянський район, село Клопотівці
 особи - підприємця або найменування юридичної особи)

Відомості про походження садивного матеріалу

Садивний матеріал вироблено ФГ "Батьків сад"
 (прізвище, ім'я по батькові фізичної

особи - підприємця або найменування юридичної особи)

Цей сертифікат засвідчує, що садивний матеріал Ліщина велика (фундук)
Барселонський, ССМ, саджанці, контейнер 2л
 (культура, сорт, клон, підщепа, категорія)

відповідає вимогам ДСТУ 4780:2007 Садивний матеріал горіхоплідних культур. ТУ.
 (назва нормативних документів,

відповідно до яких проведена сертифікація садивного матеріалу)

Номер партії UA-23-075/0004-21

Розмір партії 2 тис. одиниць

Відомості про маркування партії ДСТУ 4780:2007

Середня проба надійшла для дослідження згідно з актом від
28.07.2021 № 6 і зареєстрована за номером 129988-21

Випробування садивного матеріалу проведено згідно з вимогами
ДСТУ 4780:2007 Садивний матеріал горіхоплідних культур. ТУ.

(назва нормативних документів)

Сертифікат, що засвідчує сортові якості садивного матеріалу,
 від 15.07.2021 р. № 032113

Сертифікат дійсний до 29.07.2022 р.

Заставний Ю.Б.

(ініціали та прізвище)

(підпис керівника органу з оцінки відповідності,
 що належить до сфери управління Мінагрополітики, або
 органу з оцінки відповідності незалежно
 від форми власності)

МП

ГАРАНТІЙНЕ ЗОБОВ'ЯЗАННЯ

Збереження партій садивного матеріалу від змішування помологічних
 (амтелогографічних) та товарних сортів, а також умови зберігання в живому виді
 до реалізації гарантую.

(підпис)

(у разі наявності)

(ініціали та прізвище фізичної особи - підприємця або
 керівника юридичної особи чи їх представника)



Рис. 28. Зразок сертифікату що засвідчує якість садивного матеріалу

Наприклад, базовим документом, який визначає вимоги до якості посадкового матеріалу волоського горіха і фундука являється ГОСТ 4780:2007 «Садивний матеріал горіхоплідних культур. Технічні умови». Тут чітко визначені основні параметри «кондиції саджанців». Детально про вимоги:

1. Висота наземної частини рослини: для однорічок від 20см, для двохрічок- 120см. Для зручності транспортування однорічки обрізають на 1м (якщо вони вище) і двохрічки на 1,2 м.

2. Товщина штамбу (міряється на висоті 10см від прикорневої шийки): для однорічних саджанців від 10мм, двохрічних від 12 мм.

3. Довжина стрижневого кореня: для однорічок: від 25см, для двохрічок: 30см.

4. Повинна бути розвинена бокова (мочковата) коренева система.

5. Рослини повинні бути без листя, не підсушені, без механічних та інших пошкоджень, які заважають нормальному приживанню саджанців.

6. Не припустимо підсихання основних корнів, подмороження кори та камбія, наявність кореневого раку.

7. Повинно бути повне визрівання пагонів наземної частини, розпускання бруньок не припустимо.

8. Наявність вірусів та пошкодження шкідниками – не допустимо.

Відповідно до ст. 12 Закону № 411 право на виробництво посадкового матеріалу мають лише суб'єкти господарювання, які включені до Державного реєстру виробників насіння та посадкового матеріалу.

Якість посадкового матеріалу та сортову відповідність державні органи перевіряють лише у тих підприємств, які перебувають у реєстрі.

Сортова відповідність. Як правило, видібрають проби з еталонних рослин у маточних садах, чи депозитарію (закритий ґрунт) морфологічний аналіз, яких проводиться щорічно. На основі еталонів створюють генетичні паспорти з унікальною формулою ДНК кожного сорту: на основі існуючих паспортів ДНК запроваджують систему контролю сортової відповідності: на етапі закладки нових маточних садів, на етапі виробництва і попередньої торгівлі щодо підготовки саджанців. Чинна система практично виключає «пересорт» (путанину сортів) при виробництві і гарантує 100% сортову відповідність.

Безвірусність. Існують хвороби волоського горіха, які не можливо вилікувати. Наприклад для горіха волоського найбільш поширені хвороби викликані фітоплазмою та вірусом скручування листя (ВСЛ). Такі віруси попадають у промислові сади разом з посадковим матеріалом.

Інформацію про безвірусність засвідчують документом “Результати аналізу...”, в якому вказують аналіз на який вірус проводився і методи діагностика.

ЧАСТИНА ДРУГА: ПРАКТИКА

У цій частині навчального посібника відомості для проведення практичних завдань з мікроклонального розмноження.

І. ФІТОБІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ МЕНЕДЖМЕНТ

Біотехнології вийшли за межі наукових лабораторій і займають вагомі ніші в комерційному розсадництві, насінництві та селекції і набули певної виробничої спеціалізації.

1.1. Типи лабораторій

Виробничі фітобіотехнологічні лабораторії спеціалізуються за двома групами методів:

- *селекційні (трансгенні і нетрансгенна селекція);*
- *культура тканин (оздоровлення і мікроклональне розмноження).*

Вказані групи методів переплітаються між собою та доповнюють один одного, і відповідно можуть визначати нішу лабораторії на ринку селекції та насінництва.

Якщо раніше селекція *in vitro* була посиленою великим транснаціональним закордонним компаніям (Monsanto), то з удосконаленням технологій їх здешевленням комерційні селекційні біотехнологічні можливі і нашій державі, як в приватних структурах (ВНІС, Україна) так і державних наукових установах (Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України).

Лабораторії мікроклонального можуть бути декількох рівнів. Наприклад, є лабораторії які займаються отриманням вихідного оздоровленого матеріалу *in vitro*. В їх склад входять споруди ізольованого закритого ґрунту, місця випробування меристемних ліній, колекції оздоровлених зразків та діагностичні сектори (ПЛР). Вони отримують рослинні лінії та зберігають їх колекції.

Об'єми пробіркового матеріалу не великі, такі лабораторії можуть бути як приватними так і при державних наукових установах (Інститут садівництва, м. Скерневіце, Польща).

Інші лабораторії мікроклонального розмноження комерційного спрямування з отриманого вихідного тестованого матеріалу розмножують у товарних кількостях необхідних для розсадників, насіннєвих господарств.

Лабораторії МКР можуть займатися, як однією культурою (лабораторія мікроклонального розмноження Інституту картоплярства НААН України) так десятками різних видів культур (лабораторія ФГ Ягідне, Вінницька обл.).

Також, є лабораторії вищих освітніх закладів, дослідних інститутів, які мають навчальні, наукові завдання.

1.2. Основні структурні підрозділи лабораторії мікроклонального розмноження

Лабораторія складається із окремих приміщень, секторів, які мають різне технологічне використання, наявність приладів та вимоги до стерильності, мікроклімату.

Умовно виділяють наступні сектори (рис. 29):

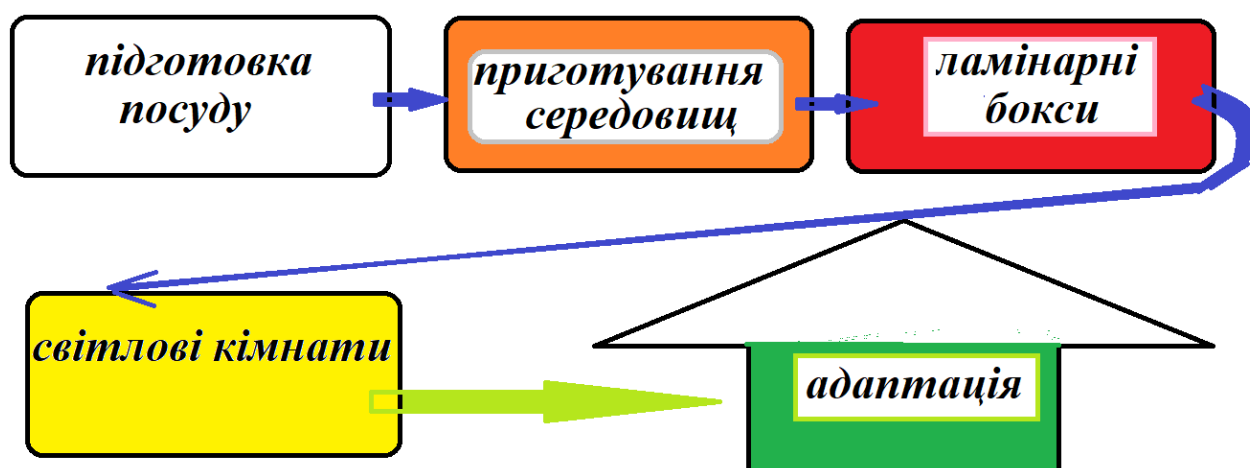


Рис. 29 . Сектори та послідовність процесів у лабораторії МКР

1. **Кімната підготовки, зберігання культивуального посуду** (біологічні пробірки, культуральні ємності). Приміщення забезпечують системами водоподачі та водовідведення та обладнанням автоматизованого миття скляних та пластикових ємностей.

2. **Сектор приготування середовищ.** Має ваговий стіл для аналітичних ваг, холодильники з маточними розчинами, нагрівальні засоби для плавлення гелеутворювачів (наприклад, електроплита), мірний посуд (мірні піпетки, мірні циліндри), рН-метр, також є приміщення, або частина для зберігання реактивів.

В окремій частині сектора, або навіть в окремому приміщенні знаходяться автоклави та інше обладнання для стерилізації середовища і/або культурального посуду (наприклад, етиленоксидний стерилізатор (рис. 30).



Рис. 30. Обладнання для стерилізації середовища та посуду,
де: 1 - автоклав паровий ВК-75; 2 - стерилізатор етиленоксидний газовий

3. **Ламінарна (операційна) кімната.** Приміщення в якому у ламінарних боксах відбуваються маніпуляції з рослинними об'єктами, зокрема поділ на живці. До цієї частини лабораторії найсуровіші вимоги стосовно асептики. Окрім ламінарів розміщують шкафи для стерилізації інструментів. Проводять регулярну деконтамінацію повітря, стін, стелі та підлоги.



Рис. 31. Ламінарна кімната

4. Світлові (культивуаційні) кімнати. Найбільші за розмірами приміщення асептичної частини лабораторії. Основою є світлові стелажі (блоки), в якості світлоносіїв використовують люмінесцентні лампи, світлодіоди. У цих приміщення є системи регулювання температури, вологості, газообміну.



Рис. 32. Світлова кімната

5. Адаптаційний сектор. Його розміщують окремо від інших секторів “адаптаційна” займає порівняно з іншими секторами в рази більшу площу.

Наприклад, порівняно з найбільшим за площу стерильним сектором площа адапційного сектору може перевищува в 20... 100 і більше раз. Так, для виробництва 100 тис. саджанців площа світлової кімнати становить 80 м² тоді, як для їх адаптації, постасептичного живцювання в декілька прийомів (5-15) необхідно 0,05 га (500 м²).



Рис. 33. Постасептична адаптація

Основні вимоги стосуються до регулювання й підтримання мікроклімату, а саме: вологості і температури повітря; полив і фертигація; дренаж субстратів; регулювання освітлення.

II. АСЕПТИКА

2.1. Основні теоритичні відомості

Біотехнологічні дослідження, комерційні біотехнології в переважній кількості технологічних процесів вимагають особливих стерильних умов, які можливо створити лише в спеціалізованих лабораторних приміщеннях з використанням особливих заходів та обладнання.

Стерильність (лат. *sterilis* — безплідний) — відсутність у середовищі, рослинному об'єкті, будь якому матеріалі, або знарядді праці життєздатних мікроорганізмів та їх спор.

Більшість компонентів живильних середовищ, біологічні об'єкти можуть контамінуватися (забруднюватися) мікроорганізмами (рис. 34), які змінюють склад середовища часто із утворенням токсичних речовин та можуть пошкоджувати рослинні клітини, також “в склі” (*in vitro*) оздоровлений матеріал ізолюється від повторного зараження.

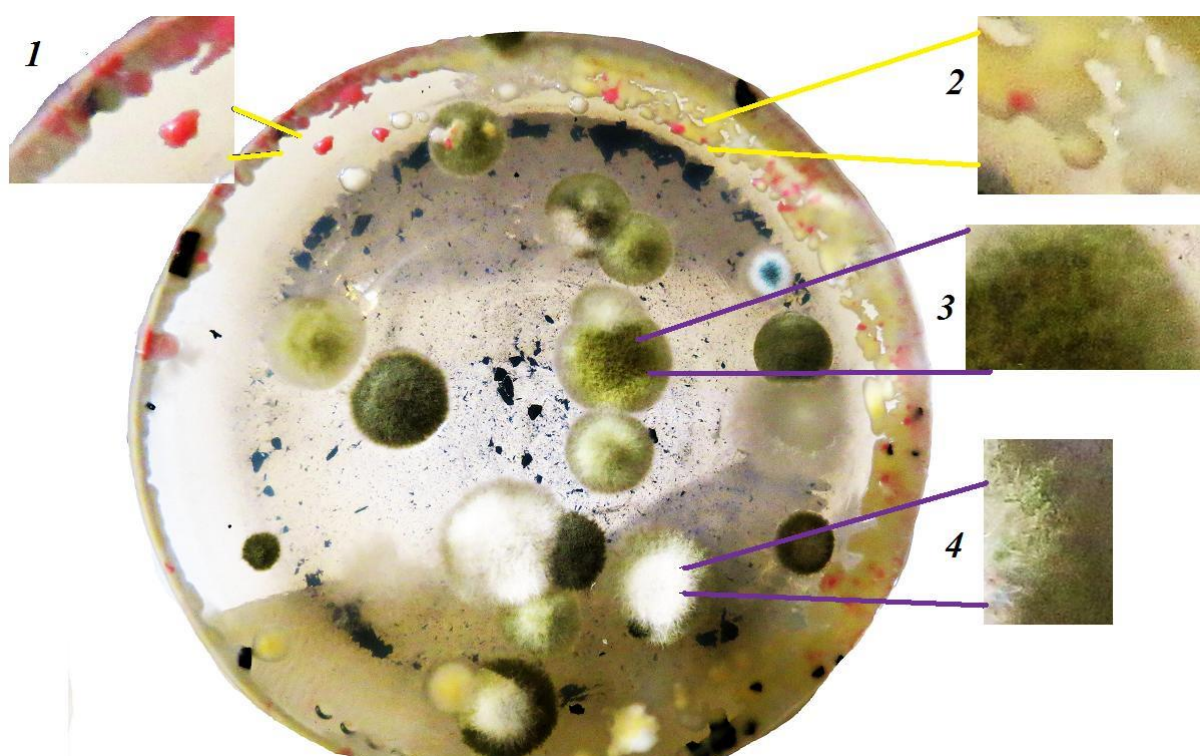


Рис. 34. Контаміноване штучне живильне середовище:

1, 2- бактеріальне (*Pseudomonas* та ін.);

3, 4 -грибне (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* та інші).

Асептика - (грец. *α* — не і *σηπτικός* — гнійний) — сукупність заходів, спрямованих на попередження контамінування лабораторних ламінарних боксів, знарядь праці, культуральних ємностей, рослинних об'єктів, живильного середовища, повітря та лабораторних приміщень, тобто створення стерильності.

Стерильність досягається такими асептичними заходами:

- дія розчинів антисептиків, біоцидів, дезінфекційних засобів;
- газова стерилізація, наприклад у камері із етилен оксидом;
- дія високих температур, наприклад полум'я спиртівки;
- обробка сухим гарячим повітрям;
- автоклавування;
- фільтрування повітря та розчинів;
- застосування бактерицидного опромінення.

2.2. Антисептика, дезінфекція

Досить часто застосовують терміни антисептика і дезінфекція. Перший передбачає знищення, а другий унеможливлення потрапляння мікроорганізмів на об'єкти.

Антисептика (грец. *anti* — проти + *sepsis* — зараження; син.: протигнільний метод) — комплекс заходів, спрямованих на знищення контамінуючих мікроорганізмів.

Є антисептика: механічна, фізична, хімічна і змішана.

Механічна антисептика заснована на механічному видаленні мікроорганізмів. *Антисептика фізична* - це застосування методів, заснованих на фізичних явищах (тепло, світло, звукові хвилі, випромінювання, вологість повітря, температура, гігроскопічність), що створюють несприятливі умови для розвитку мікроорганізмів. *Хімічна антисептика* включає застосування різних хімічних речовин, які стримують життєдіяльність, або знищують мікроорганізми. Наприклад, є антибіотики із бактерицидною і/або бактеріостатичною дією.

Дезінфекція (лат. *desinfectio* <лат. *des* -знищення, видалення + *infectio* - порча) — система заходів знезаражування об'єктів лабораторного простору, спрямована на повне, часткове, або селективне знищення мікроорганізмів з метою унеможливлення їх потрапляння на стерильні об'єкти.

2.3. Стерилізація живильного середовища

Стерильність живильного середовища досягається:

- автоклавуванням;
- або мікрофільтрувальним.

Автоклавування — основний метод термічної стерилізації живильних середовищ та частини лабораторних об'єктів (наприклад, вода для промивки під час деконтамінації первинних експлантів). Здійснюється за допомогою парових стерилізаторів (автоклавів) з насиченою водяною парою при надлишковому тиску 0,11 МПа і температурі 120 °С або 0,20 МПа і температурі 132 °С.

Для досягнення максимального ефекту стерилізації необхідне повне видалення повітря зі стерилізаційної камери і об'єктів, що обробляються, а також правильне розташування останніх із метою забезпечення вільного доступу до них водяної пари.

Термін стерилізації залежить від фізико-хімічних властивостей інгредієнтів, об'єму розчину і обладнання, яке використовується. Стерилізують агаризоване середовище при 120 °С протягом 45 хв.

Стерилізація середовища автоклавуванням має два підходи:

1. Не стерильне середовище відразу розливають у культуральні ємності.
2. Середовище спочатку автоклавують у великій ємності, а потім у стерильних умовах розливають у стерильні ємності (наприклад, одноразовий пластик або реторт пакети (рис. 35)); або застосовують автоматизовані системи розливу середовища в стерильні ємності (рис.36)



Рис. 35. Рослини *in vitro* в реторт пакетах



Рис. 36. Автоматизована система розливу середовища в стерильні ємності

Живильні середовища, або окремі їх компоненти які не витримують автоклавування (антибіотики, частина біологічно активних речовин) стерилізується мікрофільтруванням. **Мікрофільтрування** (стерилізаційне фільтрування) – для видалення мікроорганізмів та частинок від 5-10 до 0,2 мкм. **Мікрофільтрація** — процес фільтрації, який очищує рідину, або газ проходженням через мікропористу напівпроникну мембрану. Типовий розмір пори такої мембрани становить від 0,1 до 10 μm . Мікрофільтрація не відрізняється істотно від зворотнього осмосу або ультрафільтрації, різниця тільки в розмірах молекул, які вона пропускає.



Рис. 37. Мікрофільтр та його застосування

2.4. Стерилізація інструментів та дезінфекція лабораторного простору

Для мінімізації відстоку, а краще унеможливлення потрапляння на живильні середовища, біологічних об'єктів застосовують, як дезінфекцію лабораторного простору в т.ч. обладнання та повітря.

Дезінфекція повітря становить комплекс із найбільш поширених методів аспетики лабораторного повітря: систему надлишкового тиску повітря; опромінення бактерицидними світлоносіями; озонування; фільтрування.

Система надлишкового тиску становить собою нагнітальний вентилятор, фільтр, розгалужені повітряні трубопроводи. Вентилювання повітря з надлишковим тиском у приміщеннях забезпечує газообмін без засмоктування через двері, вікна нестерильного повітря ззовні.

Ультрафіолетове бактерицидне випромінювання – це електромагнітне випромінювання діапазону довжини хвиль в інтервалі від 200 до 320 нм, що володіє бактерицидною (антимікробною) дією та під його впливом призводить до загибелі мікробної клітини.

Ультрафіолетове бактерицидне випромінювання доповнює ефект вентиляції (механічної і природної) і служить основним заходом для знезараження повітря, якщо механічна вентиляція відсутня, або функціонує неефективно. Умовою його використання є виключення можливості шкідливого впливу на здоров'я людини.

Дезінфекція проходить у тих місцях, куди потрапляють прямі промені ультрафіолету. Місця та зони, куди не потрапляють прямі УФ-промені, не дезінфікуються, тому їх часто називають «мертвими» зонами.

Озонування - реакція окиснення органічних сполук під дією озону, яка має стерилізуючий ефект. Це сучасний технологічний напрям, створений для очищення і дезінфекції за допомогою газу озону: сильного окислювача. Про безпеку свідчить його застосування в побуті. Наприклад, вбудована функція озонування в кулері для води дуже корисна. Протягом секунд, швидко

відбувається дія газу озону. Перш за все, він миттєво знищує мікроорганізми, швидше, ніж інші дезінфектори, в 300 – 3000 разів. Ось головна перевага корисної функції озонування.

Використання функції озонування:

Стерилізація поверхні ємностей, резервуарів, меблів:

Швидке знищення мікробів, грибків, цвілі, вірусів і інших мікроорганізмів;

В озонованій воді не змінюється її кислотність. Це прекрасний і швидкий спосіб по знищенню шкідливих мікроорганізмів з води і повітря.

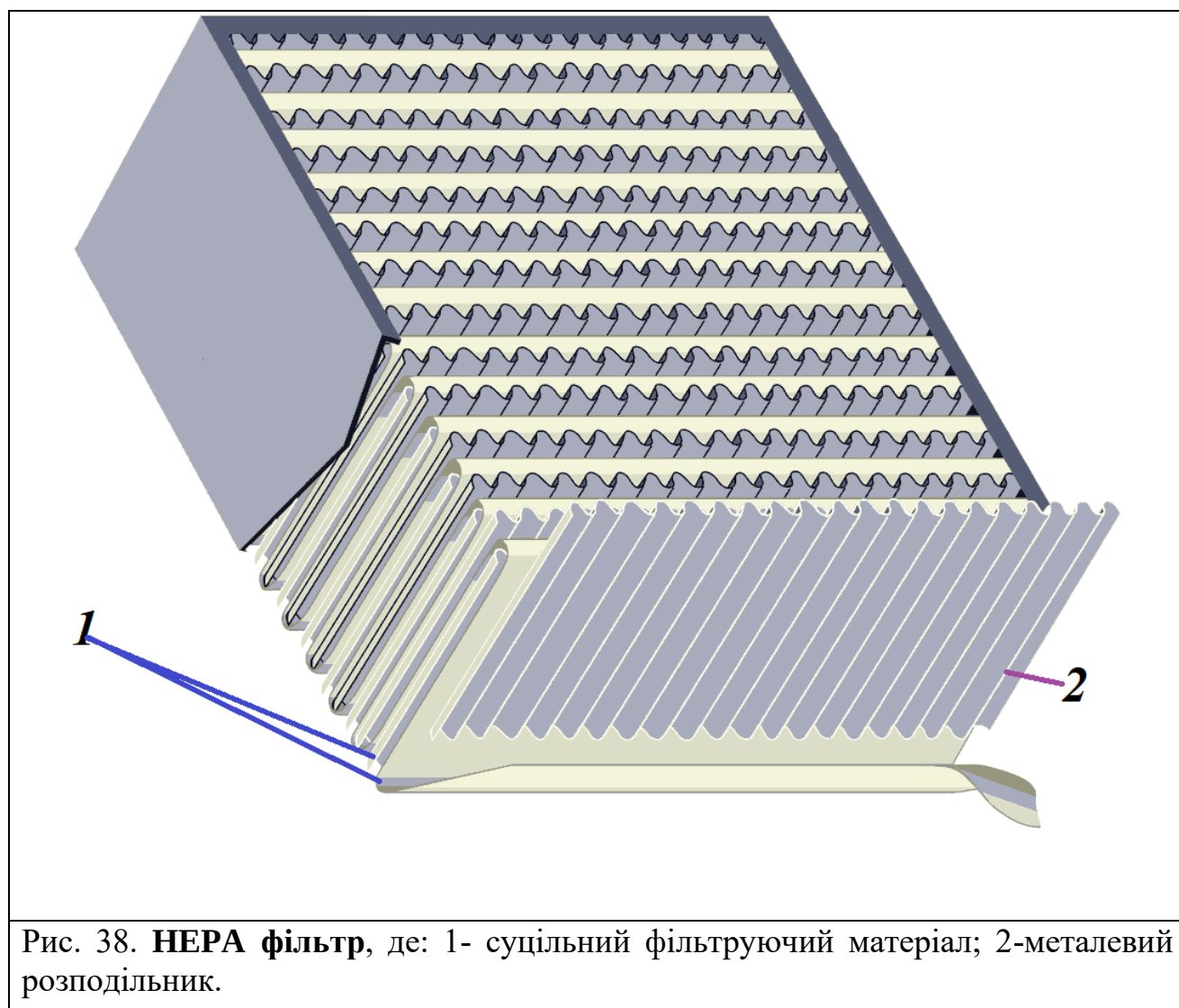
Озон окисляє домішки органічних речовин та додає приємної свіжості, як після грози. ГДК (гранично допустима концентрація) озону за добу – 0,03 мг/м³. Досягається, приблизно, за двадцять хвилин проведення процедури, залишається незмінною протягом 2,5 годин.

Перш за все, з перших секунд роботи озонатора, відбувається реакція усунення озону і розпаду на кисень. Він стає безпечним, не токсичним. Вбудовані датчики контролюють його використання.

Дезінфекують повітря також фільтруванням через HEPA фільтри (таб.4). Фільтри HEPA перешкоджають поширенню бактерій та вірусів крізь повітря, тому дуже важливі для запобігання інфекцій. HEPA (High Efficiency Particulate Air) - це різновид вискоєфективного повітряного фільтра, який відповідає стандартам. *MERV — стандарт, що використовується для вимірювання загальної ефективності фільтра. Шкала MERV становить від 1 до 20 і визначає здатність фільтра видаляти частинки розміром від 10 до 0,3 мікрметра. Фільтри з більш високими показниками не лише видаляють більше частинок з повітря, вони також затримують більш дрібні частинки. Для фільтрування повітря в ламінарних боксах придатні фільтри H13, H14 і вище.*

Таблиця 4 . Маркування НЕРА фільтрів

Клас очищення повітря	Маркування	Ефективність очищення
Високоєфективне очищення	H10 (НЕРА 10)	< 85% частинок розміром більше 0.3 мкм
Високоєфективне очищення	H11 (НЕРА 10)	< 95 %
Високоєфективне очищення	H12 (НЕРА 10)	< 99.5 %
Високоєфективне очищення	H13 (НЕРА 10)	< 99.95 %
Високоєфективне очищення	H14 (НЕРА 10)	< 99.995 %



Для запобігання механічних пошкоджень сторону фільтра, яка в робочій зоні покривається сіткою з нержавіючої сталі, або інших матеріалів стійких до корозії (рис. 39).

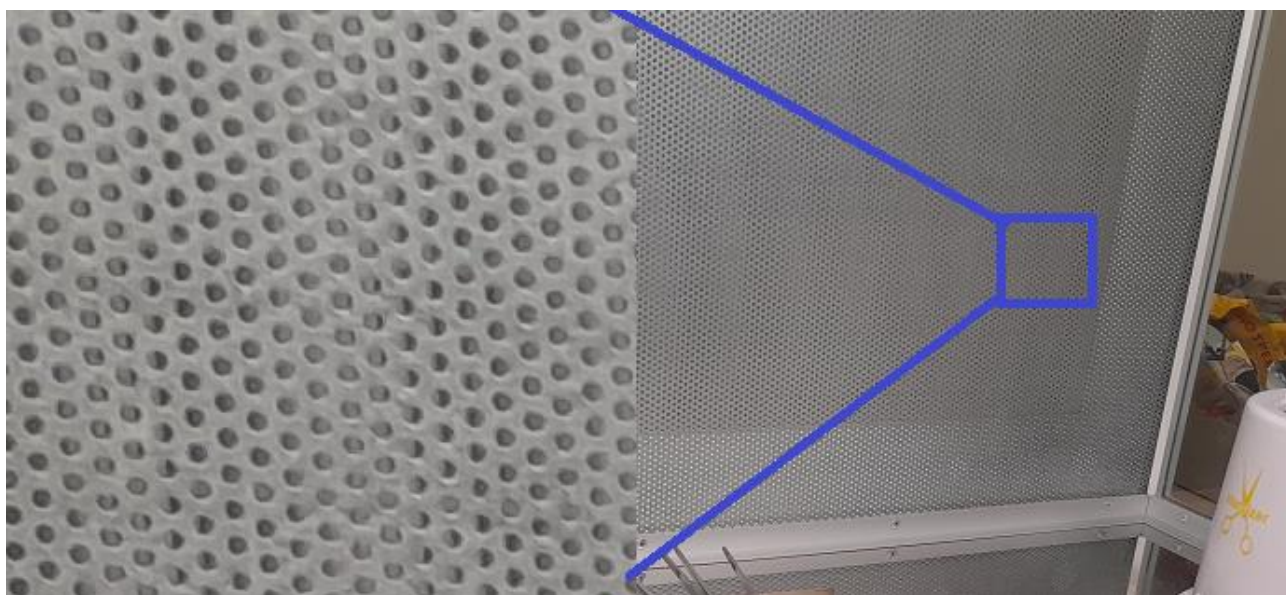


Рис. 39 Решітка HEPA фільтра ламінару

Дезінфекція інструментів проводиться антисептиками (наприклад, етанол) та високими температурами (полум'я, або сухий жар).

Етанол є найдавнішим антисептиком, відомим людству. Принцип дії етанолу на мікроорганізми, ймовірно, полягає у впливі на їхні мембрани та швидкій денатурації білків, що призводить до порушення метаболізму бактерій та подальшого руйнування клітин. Етанол демонструє високу біоцидну дію проти вегетативних бактерій (включно з мікобактеріями), вірусів, грибів, але не спор.

Через відсутність спороцидної дії етанол не може бути використаний для стерилізації, проте його властивостей достатньо для профілактичного знезараження поверхонь, тобто обробка етанолом застосовується в системі з іншими заходами. Спирт зменшує контамінування, діє як детергент.

Підлога, стіни та стеля в стерильних секторах лабораторії мають покриття, яке легко миється розчинами антисептиків, не є пористим, що мінімізує прикріплення до цих поверхонь контамінантів. У таких приміщеннях регулярно проводять вологе прибирання зі стерилізуючими речовинами.

2.5. Асептика ламінарного боксу

Асептичні заходи в ламінарному боксі (ламінарі) спрямовані на запобігання потрапляння контамінуючих мікроорганізмів на середовище й рослинні об'єкти.

Основні з них: *1 - фільтрування повітря; 2 – квартування, або подібна обробка повітря, приміщення та робочої зони ламінару; 3 - дезінфекція робочих поверхонь.*

Працюючи в робчій камері ламінару враховують потоки стерильного (фільтрованого) повітря (рис. 40), тому недопустимо розміщувати нестерильні об'єкти попереду відкритих культуральних ємностей та стерильних рослинних об'єктів (рис. 41).

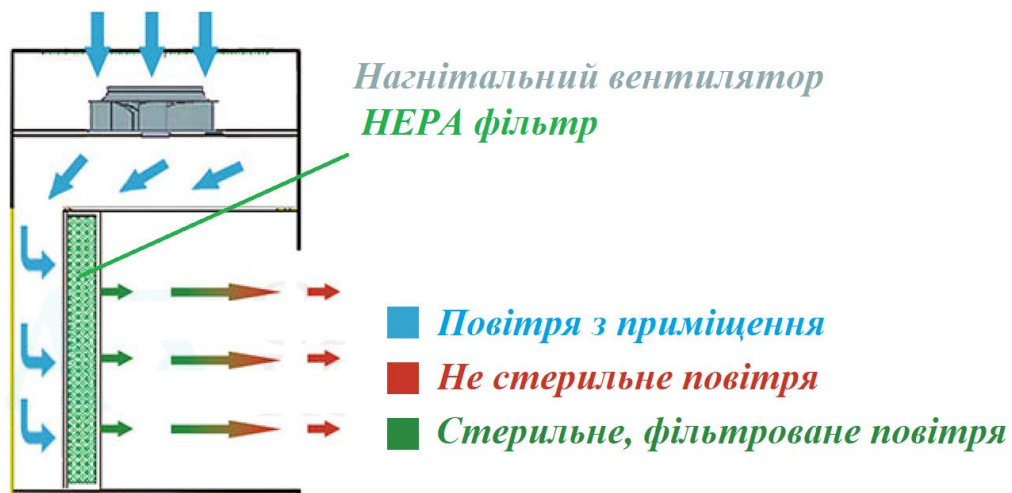


Рис. 40 Потоки повітря в ламінарному боксі

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

За півгодини до роботи включають ламінар, щоб чисте повітря витіснило не фільтроване повітря, видало контамінуючі агенти з робочої зони.

Для зменшення кількості контамінантів та запобіганню потрапляння їх на стерильну поверхню ламінар обробляють антисептиком. Найбільш поширений серед них етанол. Спирт наносять на вату протирають робочу камеру при постійному потоці повітря. Послідовність протирання відбувається з урахуванням такого правила: на протертій поверхні не повинні потрапити контамінанти під час протирання інших частин робочої зони. Першою протирають решітку фільтра починаючи з її верхньої частини, потім “стелю”. Наступними бокові стінки і на останок стільницю. На ній розміщують протерті стерилізатор інструментів, при потребі інше обладнання (наприклад мікроскоп).



Рис. 41. Розміщення стерильних об'єктів у ламінарі

Інструменти (ланцети, пінцети, голки), які безпосередньо контактують із живильним середовищем, серединою культуральних ємностей і рослинними об'єктами стерилізують високими температурами. Спирт для їх стерилізації є не достатньо ефективним.

У разі припинення потоку фільтрованого повітря в ламінарі стерилізаційні заходи проводять заново.

ІІІ. ОТРИМАННЯ АСЕПТИЧНИХ ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ

3.1. Підготовка донорів та початкові роботи з первинними експлантами

Походження первинних експлантів суттєво впливає на їх деконтамінацію та морфогенез, тому підготовчі роботи розпочинають ще з вирощування ізольовано відібраних донорів (материнських рослин) експлантів у спеціальних умовах закритого ґрунту - депозитарію. В депозитарію, порівняно зі звичайними «польовими умовами», в донорних рослин менша інтенсивність освітлення, об'єкти знаходяться в закритому приміщенні (згідно ISO 14644-1:2015), тому контактування із контамінантами обмежене, також проводяться обробки, як контактними, так і системними фунгіцидами та бактеріоцидами (наприклад, казумін).

Дії з донорами експлантів наступні:

1. Тестування та по можливості відбір вільних від збудників хвороб донорів експлантів
2. Вирощування відібраних рослин в умовах закритого ґрунту із розсіяним освітленням.
3. Після висаджування рослин проводиться декапітація пагонів для пробудження бруньок.
4. Проведення обробок фунгіцидами та за потреби антибіотиками.

У випадку потреби прискорення потреби пробудження бруньок з донорних рослин зрізають гілки і ставлять у воду із додаванням розчину гібрелінів.

Ізольовані первинні експланти перед деконтамінацією можуть оброблятися в розчинах:

- системних фунгіцидів, наприклад Превікур® Енерджі 840 SL,(пропамокарб гідрохлорид 530 г/л, фосетил алюмінію 310 г/л); у деяких випадках антибіотиків, або біоцидів для боротьби із ендогенним контамінуванням;
- антиоксидантів (аскорбінова кислота, полівінілпіролідон, цистеїн) для запобігання самоінтоксикації продуктами окиснення фенолоподібних речовин.

3.2. Деконтамінація рослинних об'єктів

Перед звільненням експлантів від мікробіологічного забруднення за потреби рослинний матеріал звільняють від фізичного забруднення (пил, рештки ґрунту). Для цього застосовують розчини не агресивних побутових, або спеціальних миючих засобів (Твін 80). Потім звільняють від мертвих тканин, криючих лусок і т.п.

Наступним кроком, який вже проводиться в умовах ламінар боксу є занурення в розчин антисептика (позиція 5 на рисунку 42), або суміші антисептиків. Тривалість перебування експлантів у цьому розчині залежить, як від антисептика його концентрації так і від особливостей рослинних об'єктів (ботанічний вид, частина і вік рослини).

Потім експланти відмивають від антисептика в стерильному дистилаті (позиції 6,7). Відмитий після деконтамінації матеріал переносять у чашки Петрі (8), стерильний папір. Експланти відділяють від пошкоджених та не потрібних, згідно технологічних потреб тканин.

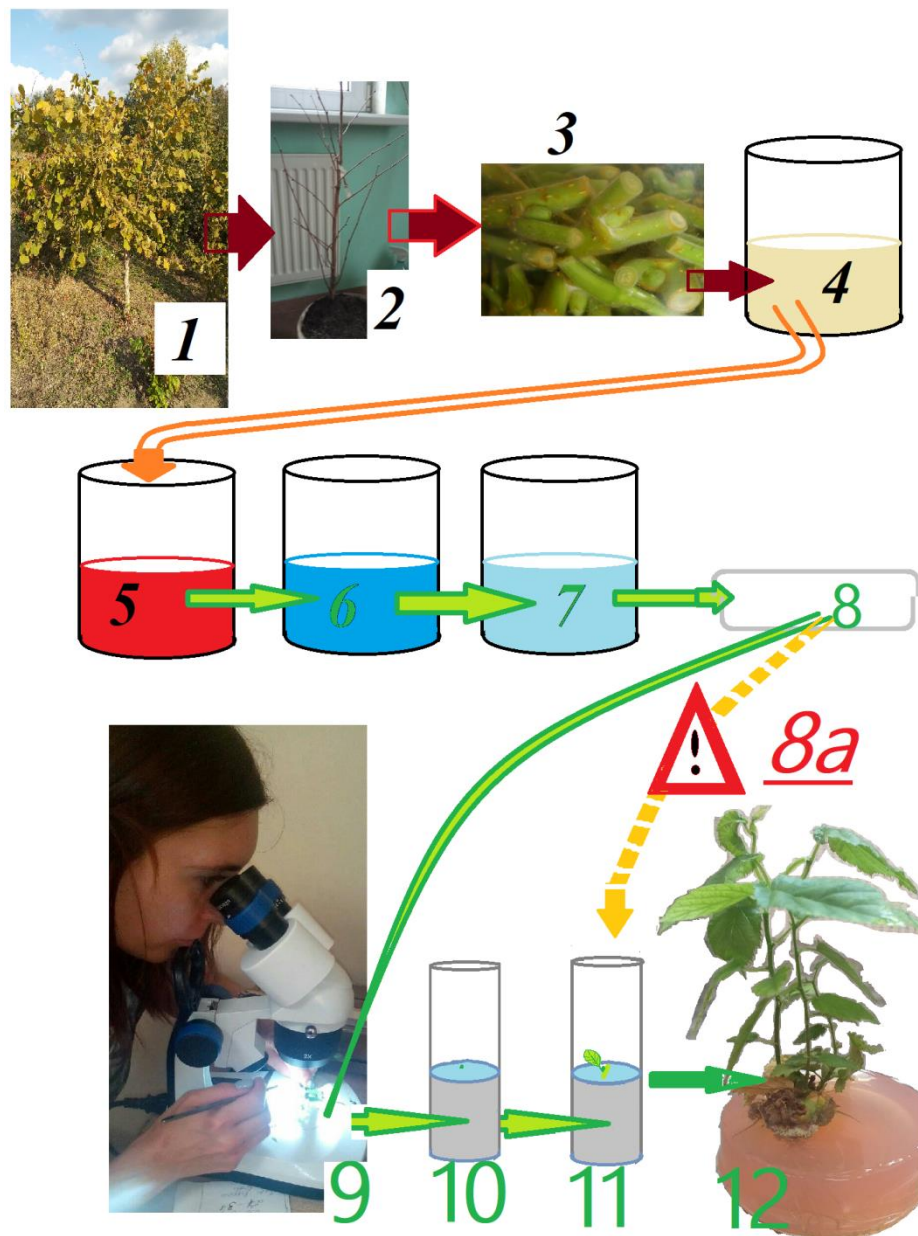


Рис. 42. Схематична послідовність робіт по отриманню асептичних первинних експлантів, де: **1** - відібрана рослина в польових умовах; **2** - рослина донор в депозитарії; **3** - ізолювання рослинного матеріалу; **4** - занурення рослинного матеріалу в підготовчі розчини (фунгіциди, антиоксиданти); **5** - занурення експлантів у розчини антисептика; **6, 7** відмивання антисептика з експлантів; **8** - перенесення рослинного матеріалу в стерильну чисту чашку Петрі; **8a** - висадка первинних експлантів без оздоровлення меристемнотканевим методом; **9** - ізоляція меристем; **10 - 12** регенерація рослин з меристемних експлантів.

У випадку лише розмноження (без оздоровлення меристемотканевим методом) простерилізовані експланти висаджують на живильне середовище (8а). Повна технологія передбачає оздоровлення, тому деконтамінований матеріал у стерильних умовах переносять на предметний столик стереомікроскопа ізолюють меристему (9) та регенерують з неї рослину (10-12)

IV. ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

4.1. Компоненти живильних середовищ

Штучне живильне середовище (ШЖС)- це є водний розчин, який забезпечує рослинний об'єкт усіма необхідними поживними і біологічно активними речовинами рослинні об'єкти. За консистенцією ШЖС може бути рідким та твердим. У рідкому середовищі фіксація експлантів відбувається з використанням містків із фільтрувального паперу, або стійкої до корозії проволки, чи інших пристосувань. У твердих середовищах для фіксації рослинного матеріалу додають гелеутворювачі (агар-агар, гуарову камедь, синтетичний агар, крохмаль), або наповнювачі (вермикуліт, перліт).

У найбільш поширених ШЖС одному літрі міститься: 3-5 г солей мінеральних елементів; 10-30 (інколи до 60) г джерел вуглеводневого живлення; інші органічні, в т.ч. біологічно активні речовини до 1 г; агар близько 7 г.

Мінеральна частина складається із солей: *макроелементів* - N, K, P; *мезоелементів* - Ca, S, Fe, Mg; *мікроелементів* - Cu, Zn, Mn, Mo, Co, J, B, Cl.

В якості **джерела гетеротрофного живлення** в більшості прописів застосовується екзогенний дисахарид сахароза, рідше моносахарид глюкоза, також додають пробілкові компоненти, зокрема амінокислоти. З органічних компонентів додають екзогенні **вторинні метаболіти**: гормони та вітаміни.

У складі середовищ можуть додатково вводитися: регулятори кислотності (HCl, KOH); буферні системи; адсорбенти (активоване вугілля).

4.2. Приклад приготування живильного середовища

4.2.1. Перерахунок гідратів

У прописах живильних середовищ зустрічаються солі з різною кількістю зв'язаних молекул води, тобто різна гідратація. Як відомо, більшість солей, що випускає хімічна промисловість, є кристалогідратами, тому в лабораторіях для приготування розчинів солей майже завжди використовують кристалогідрати. Умовно припускається, що кристалогідрат являє собою розчин безводної солі у власній кристалогідратній воді, або як розчин, схожий на рідкий розчин безводної солі, але в твердому агрегатному стані.

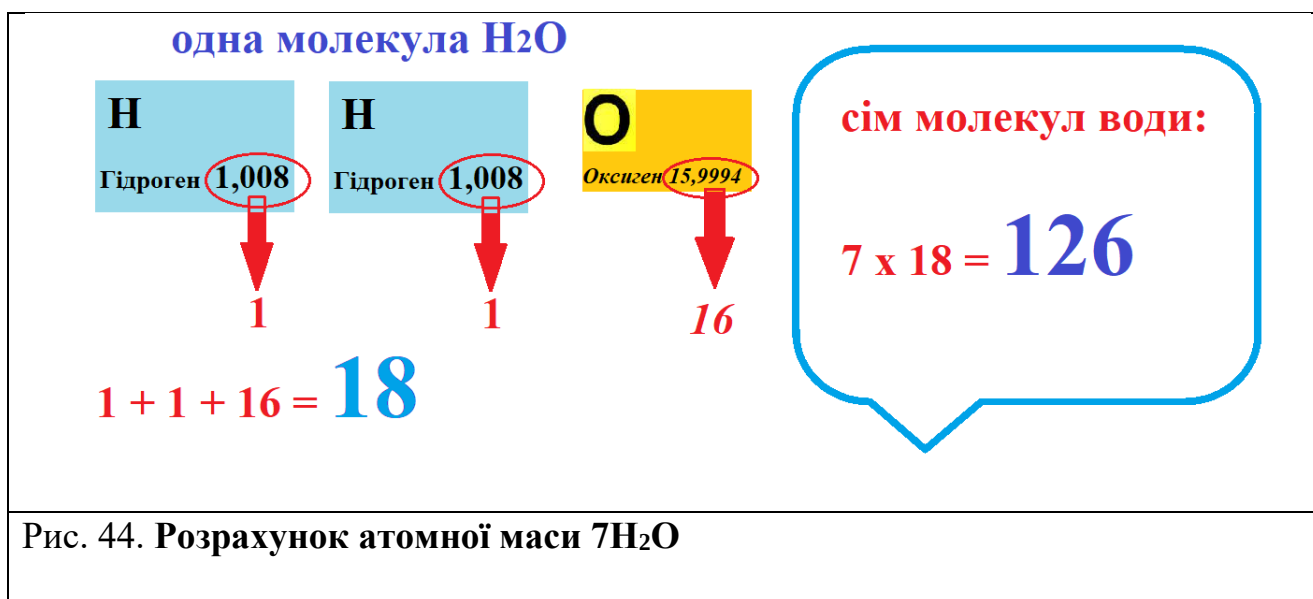
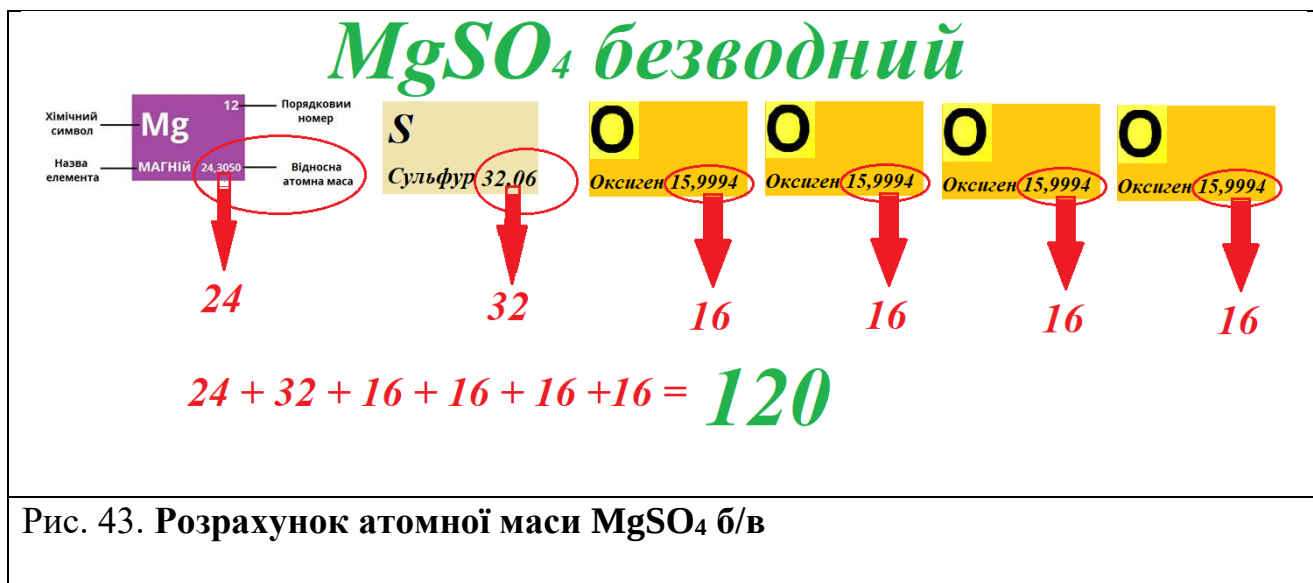
Гідрати — сольоватні комплекси, які містять зв'язані молекули води, що можуть входити до їхньої структури.

Розглянемо перерахунок по атомній масі солей з різною кількістю молекул води, щоб мати однакову кількість діючій речовині.

Наприклад, у прописі середовища DKW (Драйвера і Канюки) вказується, що необхідно додати 361,46 мг/л MgSO_4 б/в (Сульфат магнію безводний). Безводний, тобто без жодної молекули води в солі, але в лабораторії доступним є наступна сіль $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Сульфат магнію гептагідрат), яка містить у собі сім молекул води ($7\text{H}_2\text{O}$).

Якщо ми додамо в середовище 361,49 мг/л гептагідрату ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) то концентрація магнію і сульфору в ШЖС буде меншою, ніж передбачено прописом, щоб отримати необхідну концентрацію кількість солі збільшують. Для цього виконують перерахунок за атомними масами, щоб отримати коефіцієнт, який вкаже у скільки разів є більшою кількість гептагідрату порівняно з безводною формою солі. Спочатку розраховуємо атомну масу MgSO_4 б/в, потім атомну масу семи молекул води (рис.43). Додавши атомні маси MgSO_4 б/в і $7\text{H}_2\text{O}$ отримуємо атомну масу $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (рис.44).

Отже, замість 361,49 мг/л $MgSO_4$ б/в потрібно додати в 2,05 рази більшу кількість $MgSO_4 \times 7H_2O$ ($361,46 \times 2,05 = 741,0545$) мг/л. (рис. 45).



$MgSO_4 \times 7H_2O = MgSO_4$ безводний

246
120
плюс сім молекул води 126

коэф. = $\frac{MgSO_4 \times 7H_2O}{MgSO_4} = \frac{246}{120} = 2,05$

Рис. 45. Розрахунок атомної маси $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та перевідного коефіцієнта в MgSO_4 б/в

4.2.2. Приготування маточних розчинів

Для пришвидшення процесу приготування та більш точних кількостей компонентів живильного середовища готують маточні розчини. Виключенням є компоненти розчини, яких швидко псуються, або додаються у великих кількостях, наприклад інозитол, агар, сахароза, активоване вугілля.

З точки зору технології приготування маточних розчинів склад живильного середовища ділять на “мінеральну” і “органічну частину”. Такий поділ показано на рисунку 46 на прикладі середовища за прописом Мурасіге й Скуга. Маточні розчини є однокомпонентними, дво- і багатокомпонентними. Багатокомпонентними є розчини частини солей макроелементів, мікроелементів. З мінеральних елементів окремо готуються розчини солей кальцію та заліза. Кальцій у маточних розчинах за високих концентрацій спричиняє випадання осаду, а хелат заліза може, як випадати в осад так і міняти валентність.

На виробництві технологи вибирають різні концентрації речовин. Поширеними є такі концентрації, якими і користуються автори даного посібника: макросолі - 1 :40; хелат заліза - 1 :100; солі кальцію 1 - 100; мікросолі 1 - 1000. Відповідно для приготування розчину середовища використовують на один літр наступні кількості: маточний розчин макросолей 25 мл (1/40 від маточного); маточний розчин солей кальцію 10 мл; маточний розчин хелату заліза 10 мл; маточний розчин мікросолей 1 мл (1/1000 від маточного).

Такі органічні компоненти, як амінокислоти, вітаміни, гормони, як правило готують у вигляді однокомпонентних маточних розчинів з такою концентрацією: *в одному міліметрі один міліграм*. Наприклад, для приготування 100 мл такого розчину індолілоцтової кислоти в мірну ємність спочатку додають 7-10 мл спирту, або одномолярного розчину КОН. Потім у розчинник додають 100 мг кристалізованої індолілоцтової кислоти. Після

розчинення гормону об'єм доводять дистиллятом до 100 мл. Отже, в цьому випадку в 100 мл (0,1 л) розчинено 100 мг гормону(0,1 г).

	mg/l	mM	
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25	Макроеlementи
KNO ₃	1900.00	18.79	
MgSO ₄	180.54	1.50	
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61	
CaCl ₂	332.02	2.99	Солі кальцію
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8		Хелат заліза
Na ₂ EDTA x 7 H ₂ O	37,3		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11	Мікроelementи
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10	
H ₃ BO ₃	6.20	100.27	
KI	0.83	5.00	
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	100.00	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91	
Гліцин	2.00	26.64	ОРГАНІЧНА ЧАСТИНА СЕРЕДОВИЩА
міо-Інозитол	100.00	554.94	
Нікотинова к-та	0.50	4.06	
В1	0.50	2.43	
В6	0.10	0.30	
Індолілоцтова к-та	2,0		ОРГАНІЧНА ЧАСТИНА СЕРЕДОВИЩА
Кінетин	0,2		
Агар	7 г		
Цукроза	30 г		

Рис. 46 Поживне середовище за прописом Мурасіге й Скуга

4.2.3. Приклад приготування живильного середовища

Хід приготування 4 л живильного середовища:

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 літри дистилату, або очищеної води зворотнім осмосом.
3. У цю ж колбу (каструлю) відважити наважки агару, інозиту та цукру.
4. Каструлю з агаром, дистилатом та цукром поставити на електроплиту і за невеликої подачі тепла, 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 загустіти, тобто не утвориться однорідна гелеподібна маса.
5. Виставити маточні розчини на столі, згідно з таблицею 5 додавання маточних розчинів.

Таблиця 5. Приклад робочої таблиці об’ємів маточних розчинів для приготування середовища в мл

№ п/п	Інгредієнт середовища	на			Розведення в маточному розчині
		1 літр	2 літри	4 літри	
1	Макросолі	25	50	100	1:40
2	Мікросолі	1,0	2,0	4,0	1:1000
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	10	20	40	1:100
4	Fe-хелат	25	50	100	1:40
5	<i>Вітамін B₁ (тіамін)</i>	1,6	3,2	6,4	1:1*
6	<i>Вітамін B₆</i>	1,0	2,0	4,0	1:1
7	<i>Вітамін C</i>	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	Аденін	5	10	20	1:1
11	БАП	2,5	5,0	10	1:1
12	ІМК	0,5	1,0	2,0	1:1

*Примітка: * один міліграм в одному мілілітрі (1:1)*

6. Перевірити наявність усіх маточних розчинів, у разі недостаючих приготувати маточні розчини.

7. У літрову ємність (колбу) налити 250-300 мл дистилляту

8. Згідно з прописом у робочій таблиці додати компоненти в цю літрову ємність.

9. Об'єм ємності (колби) дистиллятом довести до 1 л.

10. Відкоригувати кислотність розчину, використовуючи КОН і KH_2PO_4 (або HCl) до рН 5,6 (або іншого, яке задане прописом технології МКР).

11. Після розчинення у каструлі агару й цукру додати в неї суміш з літрової ємності.

12. Отримані 4 літри середовища розлити в банки й проавтоклаувати (45 хв, при 1,21 атм).

Приготовлене середовище за кімнатної температури, впродовж години загусає. Нормальною є консистенція, за якої вміст ємності із проавтоклавованим і загуслим середовищем у лежачому положенні не розтікається. Живці (експланти) повинні входити в середовище без зусиль. У занадто загуслому середовищі під час посадки живців відчувається його пружність.

V. ВИДІЛЕННЯ МЕРИСТЕМ

Допоміжні заходи в системі оздоровлення методом культури меристем

Для підвищення ефективності отримання оздоровленого матеріалу в окремих випадках проводять низку заходів, що збільшують відсоток безвірусних серед ізольованих меристем. Найбільш поширені такі:

1. Добір материнських рослин донорів первинних експлантів за господарськими ознаками та результатами діагностики (ІФА, ПЛР).
2. Термотерапія
3. Хемотерапія

Добір донорів. Виокремлюють рослини за господарсько-корисними ознаками відповідно сорту, по можливості зв'язують із “ДНК паспортом сорту”. Перевіряють на наявність поширених збудників хвороб. Наприклад, для картоплі із 20 вірусів найбільш поширені S, M, Y, L, X віруси.

Термотерапія. Сам захід не є ефективним у знищенні вірусних часток. Застосовується для вповільнення розвитку та транспорту вірусів по рослинах. Це забезпечує технологічно збільшення безвірусної зони меристеми.

Для кожної культури є оптимальні температури. Наприклад, для картоплі такими температурами є $37 \pm 0,5$ °C, а для часнику рекомендують поступове нарощування температури із 24 до $38 \pm 0,5$ °C.

Органи вегетативного розмноження (бульби, цибулини, кореневища), пагони поміщають на інертний субстрат, наприклад перліт у термокамеру, чи термостат з регульованим мікрокліматом, в т.ч. температурою. Триває цей процес 4–6 тижнів.

Хемотерапія в боротьбі з вірусами, як додатковий, не основний метод оздоровлення застосовується, але досить рідко. В таких заходах, зокрема на картоплі, малині, часнику поширеним є віроцид Рібавірін (віразол).

Однак, у більшості ефект такого заходу полягає не абсолютного знищення, а лише зниження титру вірусних часток. Оскільки віродиди гальмують процес пов'язані з нуклеїновими кислотами відбувається і пригнічення рослин.

Для хемотерапії малини віразол (1-β-D-рібофураназол-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід, комерційна назва рибавірін, C₈H₁₂N₄O₅) додають в автоклавоване

середовище через мембранний фільтр ($d = 0,22$ мкм). Тривалість пасажів для первинних експлантів становить близько одного місяця.

Підготовка матеріалу для ізоляції меристем. Ізольовані з донорів паростки, які за потреби пройшли термо- та хемотерапію стерилізують від біологічних контамінантів. Це найчастіше такі розчини: діюрид, гіпохлорит натрію, або препарат Бланідас 300. Потім рослинний матеріал 2-3 рази промивають в автоклавованому дистилаті і переносять у стерильні ємності (наприклад, пусті чашки Петрі).

Для ізоляції меристем з підготовленого матеріалу використовують бінокулярний стереомікроскоп (рис. 47) зі збільшенням $1 : 20 - 1 : 40$ із прямим (не оберненим зображенням). Особливістю таких мікроскопів є великий об'єктив, що забезпечує більш чіткіше і об'ємне зображення. Для визначення розмірів меристем в один з окулярів додають спеціальну масштабну сітку. Для більшості культур розмір меристем має бути не більшим 200 мк ($0,2$ мм).



Рис.47 . Стереомікроскоп

Для ізоляції застосовують заточені ін'єкційні голки. Поступово відламуючи листки бруньки (рис.48) підрізуванням голки ізолюють точку росту (меристемний купол) з одним примордієм (зародковим листком у вигляді бугорка).

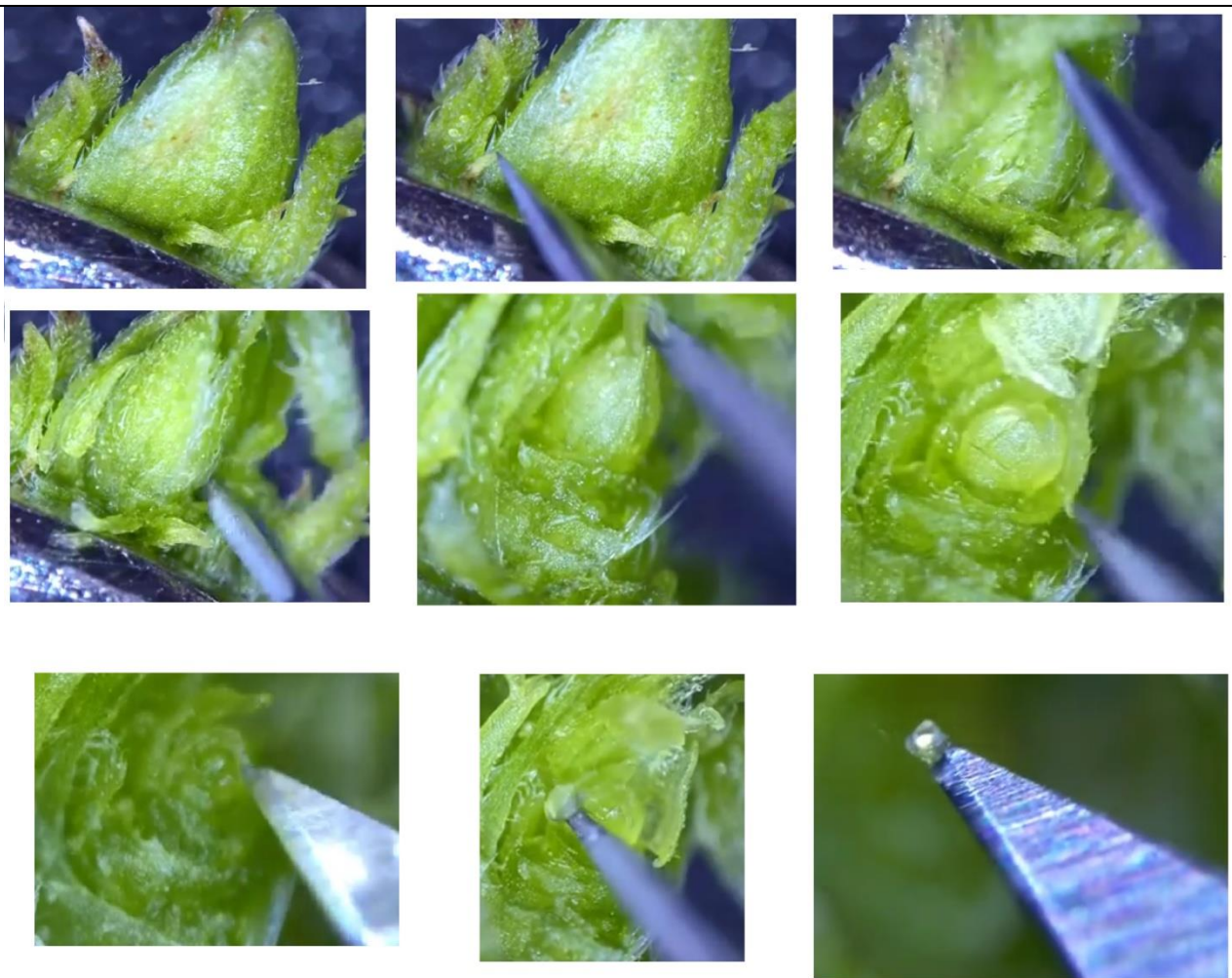


Рис. 48. Послідовність виділення меристеми із бруньки

Якість заходів по оздоровленню визначають методами полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього використовують специфічні кожному штамму вірусів праймери, також діагностують генетичну констатність.

VI. МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ ПРЯМИМ ТА НЕПРЯМИМ МОРФОГЕНЕЗОМ

Термін мультиплікація походить від лат. *multiplicatio* («множення, збільшення, зростання, розмноження»).

Завдяки високому коефіцієнту розмноження в умовах *in vitro*, незалежно від пори року та погодних умов забезпечується мультиплікація від сотень тисяч до мільйонів штук.

6.1. Непрямий морфогенез

Для частини ботанічних видів складно ввести в асептичну культуру методами прямого морфогенезу, це зокрема стосується старих донорів експлантів та частини однодольних видів, тому застосовують методи непрямого морфогенезу, тобто культивування соматичних дедиференційованих клітин (рис. 49), такий матеріал також може використовуватися і в селекційних цілях.

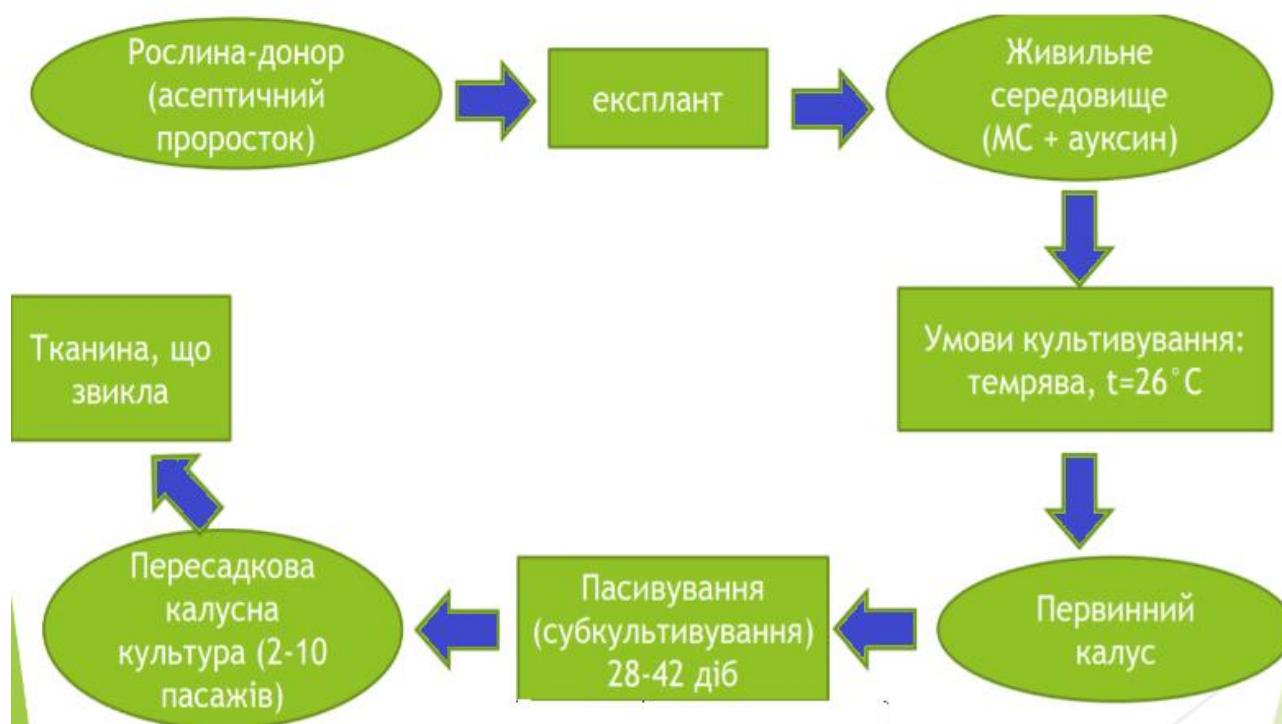


Рис. 49 Схема отримання калюсних культур

Калюси отримані з листків мають більший потенціал до морфогенезу, проте із калюсу стеблового походження молодих рослин також відбувається утворення адвентивних бруньок (рис. 50). Окрім листків в якості донорів, або як безпосередньо експланти використовують зародки, ембріони, пилок та інше.

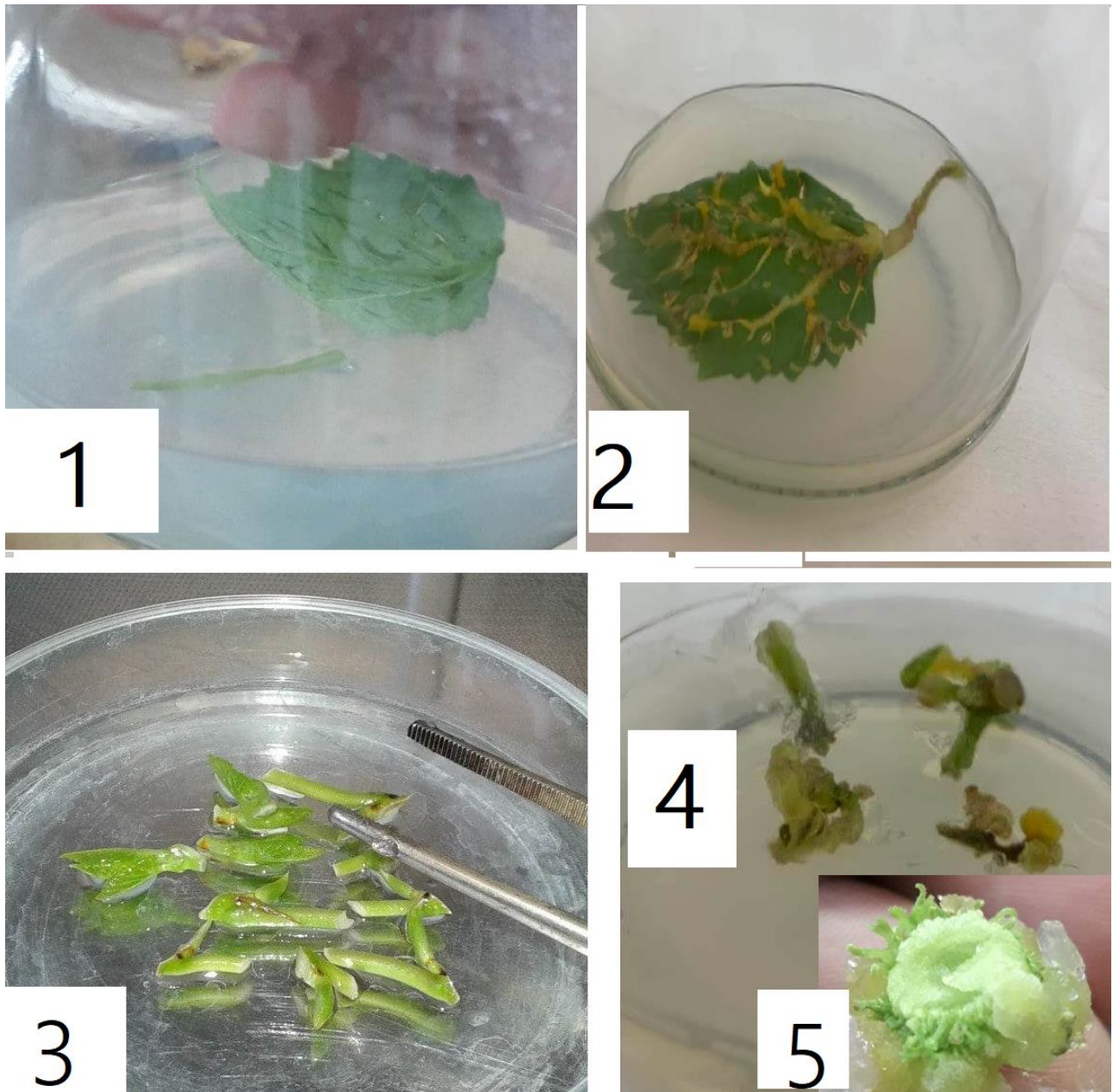


Рис. 50 **Калюсогенез у павловнії**, де: **1** - листковий експлант; **2** - калюсогенез на жилках листка; **3** - стеблові експланти; **4** - калюсогенез на стеблових експлантах; **5** - морфогенез калюсів стеблового походження.

Культивують їх на середовищах зі збільшеним умістом ауксинів. Зокрема, 2,4-Д є потужним індуктором калюсогенезу. Отримані дедиференційовані тканини застосовують, як для безпосереднього отримання з регенерантів так і для розмноження пасажуванням у калюсній, або суспензійній культурі. На рисунку 51 представлено процес отримання калюсів із недозрілих зародків кукурудзи.

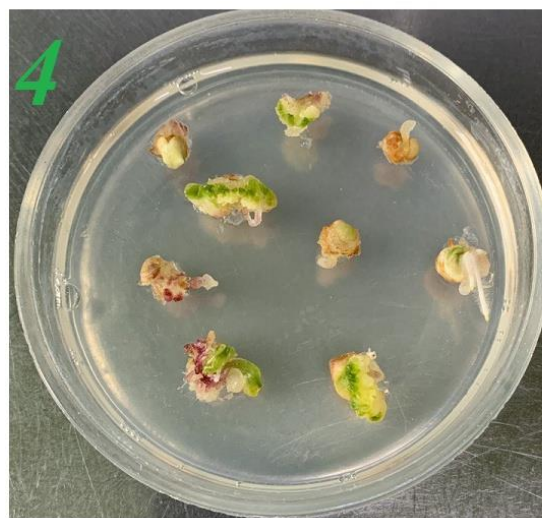
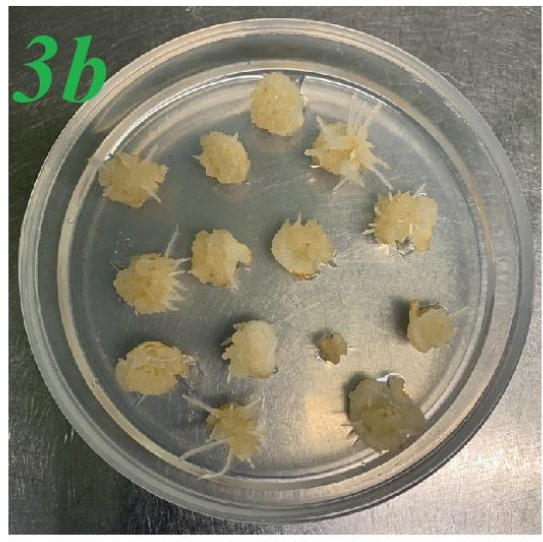


Рис. 51. Отримання калюсів з незрілих зародків кукурудзи, де: 1. виділення незрілих зародків з зерна кукурудзи віком 7-14 днів після запилення

2. зображення місця утворення калюсу в незрілих зародків (щиток зародку кукурудзи) під мікроскопом
3. **3 а** культивування незрілих зародків на калюсогенному середовищі
3б індукція коренів з калюсу, що є хибним шляхом розвитку
4. індукція регенерантів з калюсу кукурудзи
5. розвиток регенерантів у повноцінні рослини кукурудзи

Ріст культивування дедиференційовані клітини калюсів проходять п'ять фаз росту. Кількісна характеристика калюсних клітин характеризується ростовою кривою калюсних клітин та має S-подібну форму і включає такі фази:

під час першої, **латентної**, або лаг-фази, збільшення числа, або маси клітин не відбувається, проте проходять фізіологічні зміни, спрямовані на активний поділ клітин.

Друга фаза – **логарифмічна**, або фаза експоненціального росту – характеризується найбільшою мітотичною активністю, збільшенням маси калюсної культури і прискоренням росту клітин.

Третя фаза – **лінійна**, під час проходження якої швидкість росту клітин залишається постійною.

Четверта фаза – **уповільненого росту** характеризується різким зниженням мітотичної активності клітин.

У п'ятій фазі – **стаціонарній**, ростова крива виходить на плато, тобто число клітин, які діляться, є еквівалентним числу відмерлих.

Якісна характеристика калюсних тканин. Якісна характеристика калюсних клітин характеризується кольором, матовістю, консистенцією (за класифікацією Р.Г. Бутенко існує три типи калюсних тканин:

1. пухка, що складається із сильно обводнених клітин і легко розпадається на окремі дрібні агрегати;
2. середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;
3. щільна, у якій диференціюються елементи камбію і провідної системи).

6.2. Прямий морфогенез, живцювання

Збільшення кількості досягають поділом материнських рослин на експланти. Регенерація відбувається активацією уже існуючих бруньок. За МКР прямим шляхом морфогенезу, тобто живцюванням, використовують стеблові живці отримані розрізанням пагону на одно-двовузлові живці, та мікропагони отримані із конгломерату мікропагонів (рис.52).

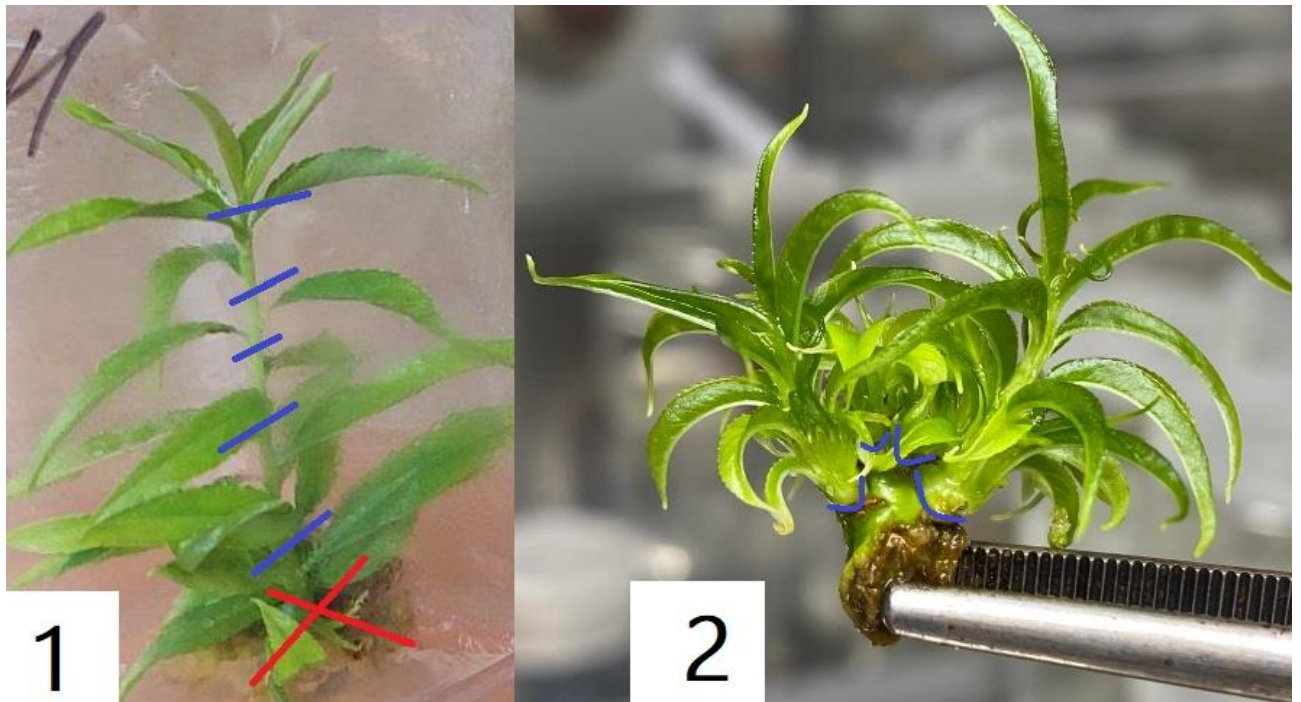


Рис. 52. Способи мультиплікації за прямого морфогенезу на прикладі регенерантів мигдалю солодкого, де: 1 - поділ на одно, дво вузлові живці; 2 - поділ конгломерату пагонів.

Обираючи технологічний шлях живцювання задають, згідно правила Скуга-Міллера розвиток материнських рослин донорів живців. За першого шляху для отримання стеблових живців детермінують розвиток експланта майбутнього донора із апікальним домінуванням. Для цього уміст ауксинів повинен дорівнювати, або бути вищим умісту цитокінінів. У ряді випадків для боротьби з розеточністю та видовження пагонів додають гібереліни.

Регенеранти для живцювання в асептичних умовах ламінарної шафи виймають з пробірок (банок) розрізають на живці, кожен із яких містить у собі відрізок стебла з листком та пазушною брунькою. Частина стебла над листком в 2-3 рази коротша частини стебла розміщеної нижче листка.

У випадку поділу на мікропагони стимулюють утворення конгломерату мікропагонів, для цього уміст цитокінінів має перевищувати уміст ауксинів.

VII. ПАТОФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН *IN VITRO*

Патофізіологія рослин *in vitro* це структурно-функціональні порушення, які виникають при дії ендогенних і екзогенних факторів в асептичних умовах.

7.1. Типи факторів, які викликають патології

До ендогенних (біотичних) факторів відносять:

- походження і фізіологічний вік експлантів;
- накопичені ендогенні фітотоксичні ефекти;
- контамінування патогенною мікрофлорою;
- самоінтоксикація продуктами життєдіяльності.

До екзогенних (абіотичних) факторів відносять:

- кількісний, якісний уміст та співвідношення елементів живлення;
- доступність елементів живлення;
- концентрація водневих іонів;
- “кількість та якість” світла;
- температура;
- синтетичні біологічно -активні речовини;
- вологість;
- газовий склад повітря та ін.

Вказані та низка інших факторів впливають на онтогенез рослинних об'єктів, тому моніторинг їх впливу на біотехнологічні процеси є вирішальним у тривалому мікроклональному розмноженні. Діагностика причин патологій

потребує комплексного аналітичного підходу. Наприклад, надмірна оводненість тканин може бути одним, або комплексом із перелічених як ендотак і екзогенних факторів: надто ювенільні не дозрівши бруньки експлантів; низька кислотність; надлишок нітрогену і /або феруму; надлишок цитокінів.

Тому в лабораторії ведуться записи стосовно складу живильного середовища, кислотності, коригування компонентів та донорів експлантів.

При діагностиці природи патологій враховують, що дія одних факторів проявляє себе за першого пасажу, а інших за третього - четвертого. Також патологія залежить від сили впливу фактора на онтогенез (рис. 53). Наприклад, в мигдалю за нормального стану протягом 1,5-2,0 місяців формується пагін із 7-10 міжвузлями. Якщо в середовищі зростає тиск впливу надлишку елементів то міжвузля вкорочується, потім регенерантам стає властива розеточність пагону. Подальше поглиблення призводить вітрифікації, втрати морфогенного потенціалу.



Рис. 53. Посилення глибини негативного впливу не збалансованого середовища (зліва направо).

7.2. Патологічні фізіологічні зміни викликані факторами ендогенної природи

Оскільки МКР є специфічним вегетативним розмноженням за якого частина материнської рослини дає життя новому організму, то її фізіологічний стан впливає на реалізацію генетичної інформації.

Не однаковий, в тому числі, патологічний розвиток обумовлюється різними станами експресії генів. Зокрема, пасажування, методом живцювання зі скороченим періодом культивування призводить до зниження морфогенезу. Це пов'язано зі слабкою диференціацією бруньок, які не визріли (недостатньо диференційовані). Так, скорочення періодів між живцюваннями фундука *in vitro* викликає зменшення розмірів регенерантів, гіпергідратацію часткову, або повну втрату здатності до ризогенезу. Ця патологія має накопичувальний ефект, тобто з кожним наступним пасажом аномальність стану регенерантів нарастає. Тривале таке культивування призводить до втрати морфогенної активності.

Візуальні цієї ознаки патології: регенеранти менших розмірів; темно-зеленого забарвлення; листові пластинки дрібні, слабодиференційовані; можливе спонтанне калюсоутворення; коренева система не розвинута, або відсутня. Такі рослини з-за слабкої диференціації оболонок, продихів швидко втрачають тургор при зниженні температури.

З іншої сторони надмірно тривалий період культивування є причиною спочатку відмирання частини органів, потім синтезу етилену. Високі концентрації цього гормону спричиняють спочатку входження рослин у стан спокою, а при тривалій дії загибелі, або слабших, а той усіх регенерантів.

Ознаки надлишку етилену: хлороз листків починається із країв листової пластинки. Відмерлі тканини мезофілу напівпрозорі. Жилки також хлорозні. Відмирають першими нижні, старші листки. В пазухах відмерлих листків бруньки спочатку типового зеленого кольору, при тривалій дії жовкнуть.

Як приклад, ситуація за загущеного вирощування регенерантів смородини, що прискорює розвиток тканин, їх старіння і передчасне відмирання (рис.54, рис.55).



Рис. 54. Отруєння етиленом регенерантів ожини: зліва – другий пасаж; праворуч – перший пасаж.



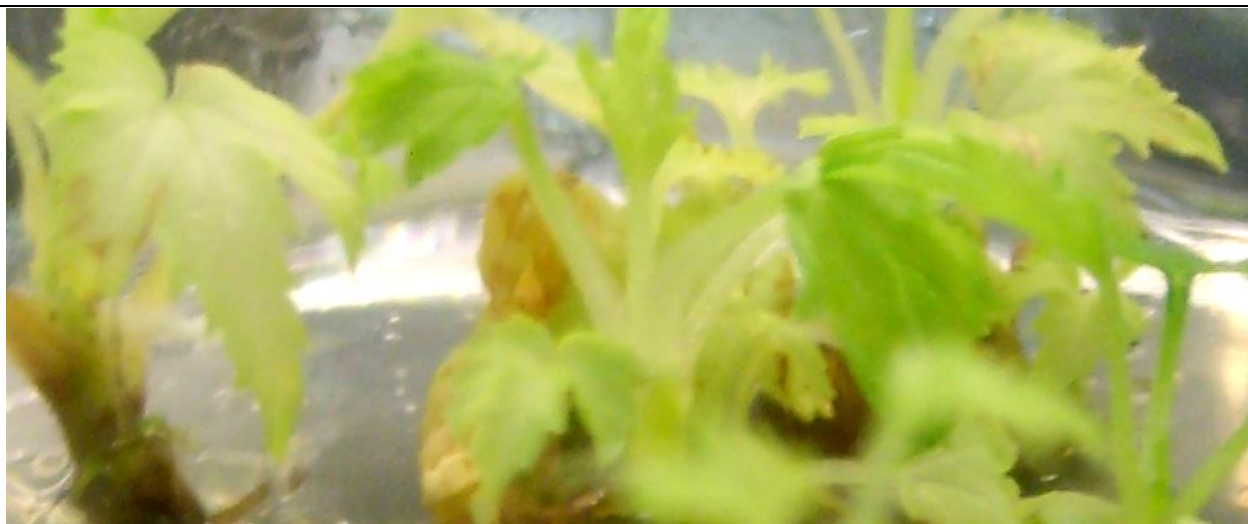


Рис. 55 . **Особливості розвитку регенерантів смородини:** зліва - рослини вирощені на середовищі із інгібітором етилену ($\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$); справа – без інгібітора етилену; внизу – старіння та відмирання листових пластинок рослин отруєних етиленом.

Серед культур, які найбільш активно виділяють етилен та самоотрууються ним розоцвіті (яблуня, троянда). Водночас, фундук порівняно з цими культурами може мати довші періоди (до року) між субкультивуваннями і бути без значних ознак самоінтоксикації етиленом.

7.3. Абіотичні фактори патофізіології рослинних об'єктів *in vitro*

З абіотичних факторів слід виділити дві підгрупи: компоненти, стан живильного середовища та умови мікроклімату культиваційних кімнат. Аналізуючи патологічний вплив мінеральної частини живильного середовища аналіз проводять враховуючи закони живлення, а саме закони мінімуму та надлишку елементів живлення. Окрім, умісту того чи іншого елементу враховують і на доступність. Наприклад, на перший погляд відмирання верхівок та вкорочені пагони є одними із ознак дефіциту, тобто не достатньої

кількості іонів Са. Проте можливі і випадки що при достатній кількості цього елемента за прописом від є важкодоступним за низкою причин, як то надлишок нітрогену чи низька кислотність.

Ознаки дефіциту Са: коротке товсте стебло; верхівки відмирають; можливе передчасне обпадання листків; коренева система вкорочена.

Ознаки надлишку нітрогену: листки збільшених розмірів не типового темно-зеленого забарвлення; в кісточкових часто виникає розеточність; із-за зростання осмосу тканин надмірне обводнення тканин та хрупкість листків; блокування засвоєння кальцію, інгібування ризогенезу.

Проблеми з ферумом; дефіцит - верхівкові листки мають міжжилковий хлороз; надлишок - гіпергідратація та надмірно темно-зелене забарвлення; листкова пластинка верхівки пагона звужена.

Не відповідне, низьке *pH*: дефіцит N, P, K часто проявляє себе за низької кислотності і типовий, як і для рослин *in vivo*, що детально вивчається в розділі мінеральне живлення курсу “Фізіологія рослин”.

Наприклад, живці смородини висаджені на «кисле» середовище регенерують невеликі рослини з 2-3 міжвузлями (рис. 56). Висота регенерантів, порівняно з контролем, у два-три рази менша. На нижніх листках через погане засвоєння фосфору і калію пластинки були звичайних розмірів темно-зелені з червоними та фіолетово-синіми відтінками, тобто забарвлення типове для нестачі P і K. Верхівкові листки дрібні, часто вузькі, світло-зелені. У багатьох листків через погане засвоєння кальцію відмирають верхівки. У результаті втрати апікального домінування за таких умов з пазух нижніх листків проростають дрібні пагони у них, з часом, також відмирають верхівки.



Рис. 56. Вітрифікація викликана «кислим» середовищем (регенерант смородини червоної)

Уцілому в більшості технологій склад елементів у середовищі не коригують протягом періоду культивування відповідно різних вікових вимог регенерантів, тому можливі прояви і накопичення фітотоксичних ефектів при тривалому пасажуванні на одному й тому ж пропису живильного середовища. Для цього в технологіях передбачають періодичну зміну, або чергування різних прописів живильного середовищ. Наприклад, для фундука для багатьох сортів ефективним є чергування середовищ NRM та DKW, а для інших NRM та NAM. Зокрема 4-6 пасажів живцюють на основному для сорту середовищі, потім на один пасаж пересаджують на інше.

Температура. Відхилення від оптимальної температури впливає, як на ріст так і розвиток, у тому числі й морфогенез. Для більшості культур оптимальна температура $24 \pm 2-3$ °C. Слід враховувати що температура в закритих культуральних ємностях дещо вище температури, ніж в приміщенні (+2-6 °C).

Температура вище оптимуму прискорює розвиток. Внаслідок цього регенеранти швидше старіють порівняно із об'єктами, що культивуються за оптимальних температур, мають менші розміри. Швидке старіння є причиною,

як накопичення етилену так і втратою вегетативним потомством здатності до регенерації.

У свою чергу низькі позитивні температури стимулюють відтік органічних речовин із листків, до бруньок, запасаючих органів та органів вегетативного розмноження. Наприклад, перенесення пробірок із живцями картоплі у приміщення із низькими позитивними температурами (2-4 °C) на 10-15 днів повністю гальмує ріст фотоасимілюючого пагону. Проте із пазухи листка розвивається столон на верхівці, якого формується мікробульба. У виробничих умовах це застосовують для отримання мікробульб за “технологією одного вузла”.

Тривала дія низьких позитивних температур (для хости 3 - 4 °C, для павловнії 6-10 °C) призводить до входження регенерантів у стан спокою. Посилюється цей ефект скороченням фотоперіоду.

Освітлення. Світло для автотрофних рослин є система із домінуючих детермінантів. Це зокрема: фотоперіод, інтенсивність освітлення, спектр світла.

За короткого фотоперіоду (8 і менше годин на добу) регенеранти формуються менших розмірів, з пригніченим коренеутворенням та швидким старінням в т.ч. із- за синтезу надлишку етилену.

За недостаєного освітлення регенеранти утворюються з дрібними листками тонким витягнутим стеблом. На етапі постасептичної адаптації недостатнє освітлення призводить до витрати пластичних речовин на дихання більше компенсації їх синтезу. За тривалого часу (2-3 тижні) рослини гинуть.

На стан регенерантів впливає також і спектр світла. Наприклад, переважання синього спектру подібне дії надлишку цитокінів.

Синтетичні біологічно активні речовини. Надлишок гормонів та інших біологічно активних речовин проявляє фітотоксичний вплив (рис. 56).

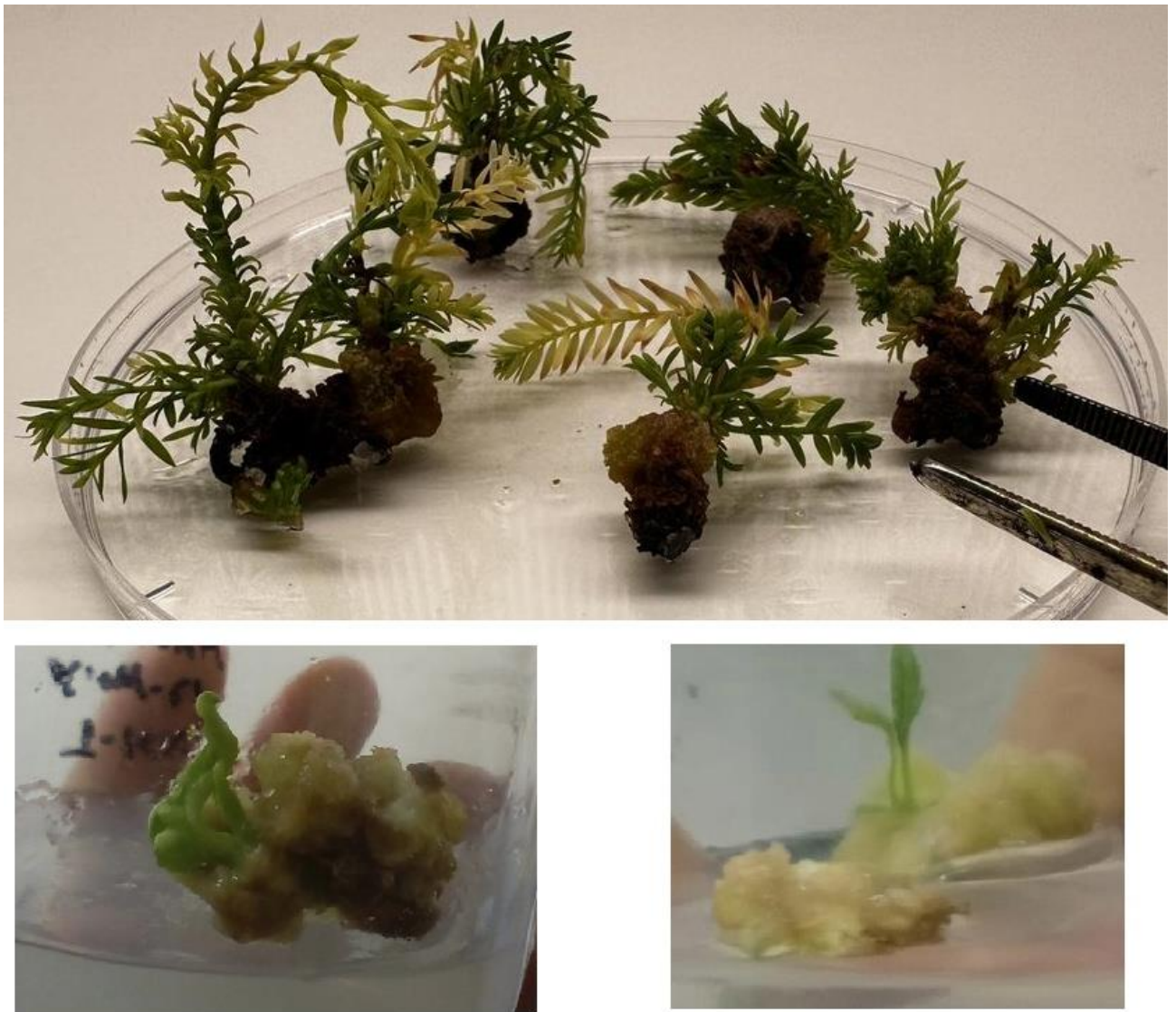


Рис. 56. Фітотоксичний вплив надлишку гормонів

Гіпергормональна фітотоксичність при тривалому МКР на середовищах із завищеним умістом гормонів має накопичувальний ефект. Наприклад, на регенерантах павловнії за першого живцювання на середовище із 1,5 мг/л БАП лиш окремі регенеранти мають часткові ознаки гіпергідратації, то за третього живцювання таких 3/4 від загальної кількості. На п'ятому пасажу 100 % регенерантів вітрифіковані, зменшених розмірів, без коренів.

Надмірно високий уміст ауксинів інгібує розвиток бруньок натомість відбувається спонтанний калюсогенез, можливе утворення фенолоподібних речовин без вивільнення їх назовні (в живильне середовище).

Низька вологість у культуральних кімнатах може бути причиною в'янення регенерантів, яке розпочинається з наймолодших частин пагона (верхівки). Надмірна вологість є причиною спалаху контамінування значної кількості об'єктів *in vitro* у світлових кімнатах. Таке можливе через 10-15 днів також після тривалих дощів у випадку не повноцінного фільтрування повітря, яке надходить у лабораторні приміщення.

8. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЯ

Регеновані за більшістю технологій МКР (окрім автотрофних методів) в асептичних гетеротрофних умовах рослини потребують проміжного культивування між *in vitro* та закритим ґрунтом. За цей час мають відбутися, як анатомічні так і фізіолого-біохімічні зміни в рослинах. Це зокрема, пристосування до поглинання та контролю витрати води; інтенсифікація процесів фотоасиміляції; активізація антистресових систем, в т.ч. і синтез абсцизинів.

Такі контрольовані поступові зміни відбуваються в “умовах вологої камери”. Вологою камерою може бути, як окремий лоток (міні бокс) з прозорою кришкою (рис. 57) так і цілий тепличний комплекс.

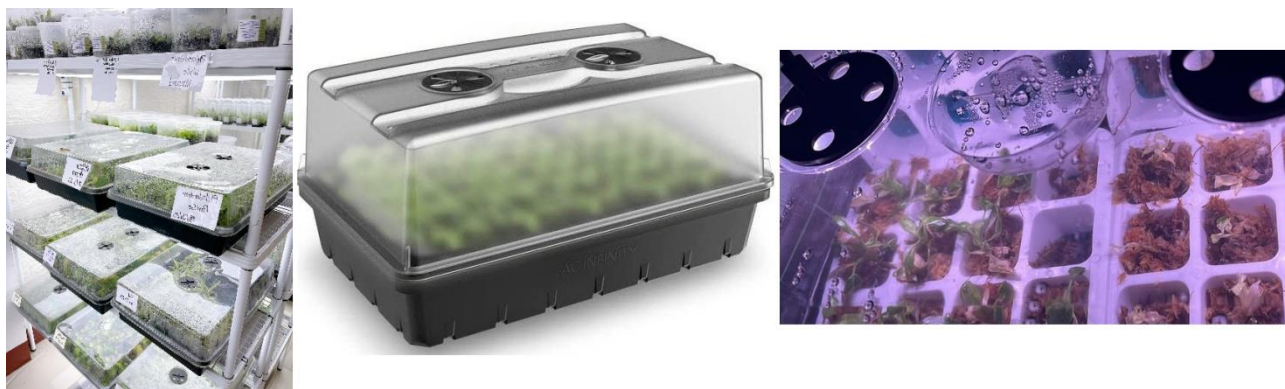


Рис. 57. Мінібокс для адаптації рослин *in vitro*

Після утворення кореневої системи регенеранти відмивають від живильного середовища, щоб унеможливити розвиток мікроорганізмів на його органічній частині. Залежно від біологічних особливостей регенерантів та технології використовують субстрати (рис. 58) органічного походження (наприклад, мох- для орхідей, торф'яний - для лохини, кокосові волокна -для фундука), мінерального (перліт, вермикуліт для павловнії, картоплі): синтетичні (гідрогелі).

Для укріття камер використовують прозорі матеріали (плівка, пластик), які добре пропускають світло і мінімально нагріваються. Для живлення додають розчини мінеральних солей. Це можуть бути мінеральні частини живильних середовищ, або спеціально розроблені розчини, які враховують вимоги рослин на етапах росту. Наприклад, різне співвідношення фосфору та нітрогену.

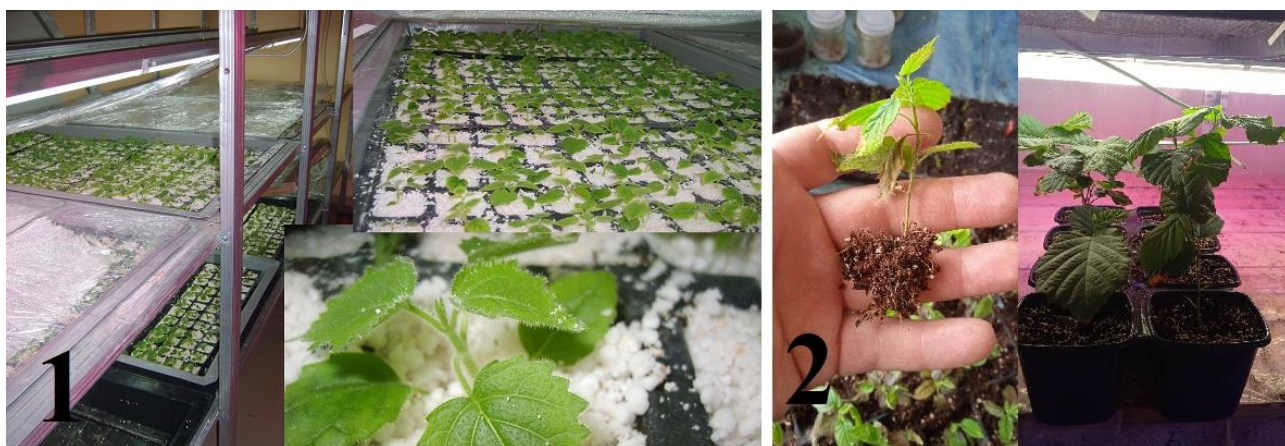


Рис. 58. **Постсептична адаптація:** 1 - павловнії у вологій камері на перлітовому субстраті; 2 - фундук на суміші кокосові волокна + перліт (1:1)

Для пристосування до факторів нестатичних 2-5 тижнів умов вологості поступово знижують, а інтенсивність освітлення збільшують, також застосовують профілактичні обробки пестицидів у боротьбі із грибними, бактеріальними хворобами, пошкодження кліщами, грибним комариком та іншими шкідниками.

Для більшості культур у вологих камерах за умови збереження ювенільності адаптованих рослин проводять 2-5 пасажувань методом живцювання, а для культур яким властива важка укорінюваність успішними є методи постасептичного живцювання фотоавтотрофним методом у спеціальних контейнерах з інтенсивним освітленням (рис.59) та повітрям, збагаченим вуглекислим газом (рис. 60). Інтенсивність освітлення залежно від варіантів 11,0 і більше кЛух. Модулі для фотоавтотрофного розмноження можуть бути, як для промислового виробництва (розглядали в частині першій у підрозділі 6.4. «Фотоавтотрофний метод») з обсягами виробництва в декілька сотень тисяч регенерантів, так і малооб'ємні для аматорського використання для 30-50 рослин (рис. 61).



Рис. 59. Контейнер для фотоавтотрофного МКР (вид зсередини)

Використовують перлітові, вермикулітові та кокосові субстрати, а як поживні розчини застосовували мінеральні основи середовищ, комерційні розчини комплексних добрив для гідропоніки. Для захисту від патогенів рослини обробляють фунгіцидами (наприклад Превікур Енерджі 840 SL; Світоч).



Система контролю подачі
вуглекислого газу



Контейнери із газопроводами

Рис. 60. Система подачі вуглекислого газу в контейнери з рослинами за фотоавтотрофного МКР

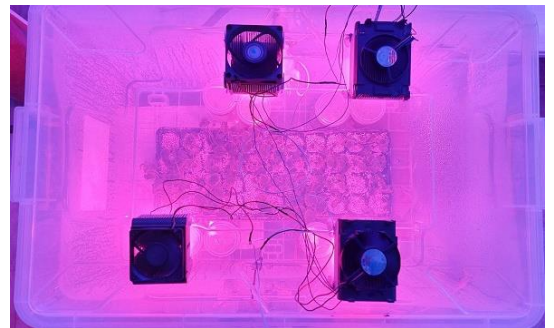
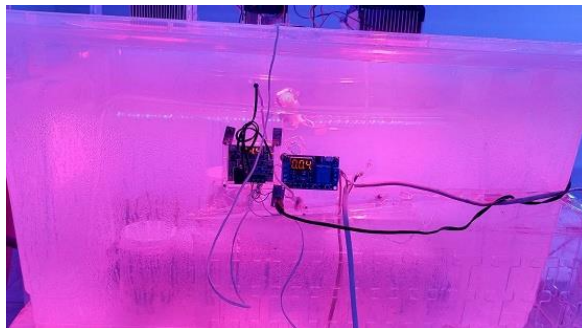
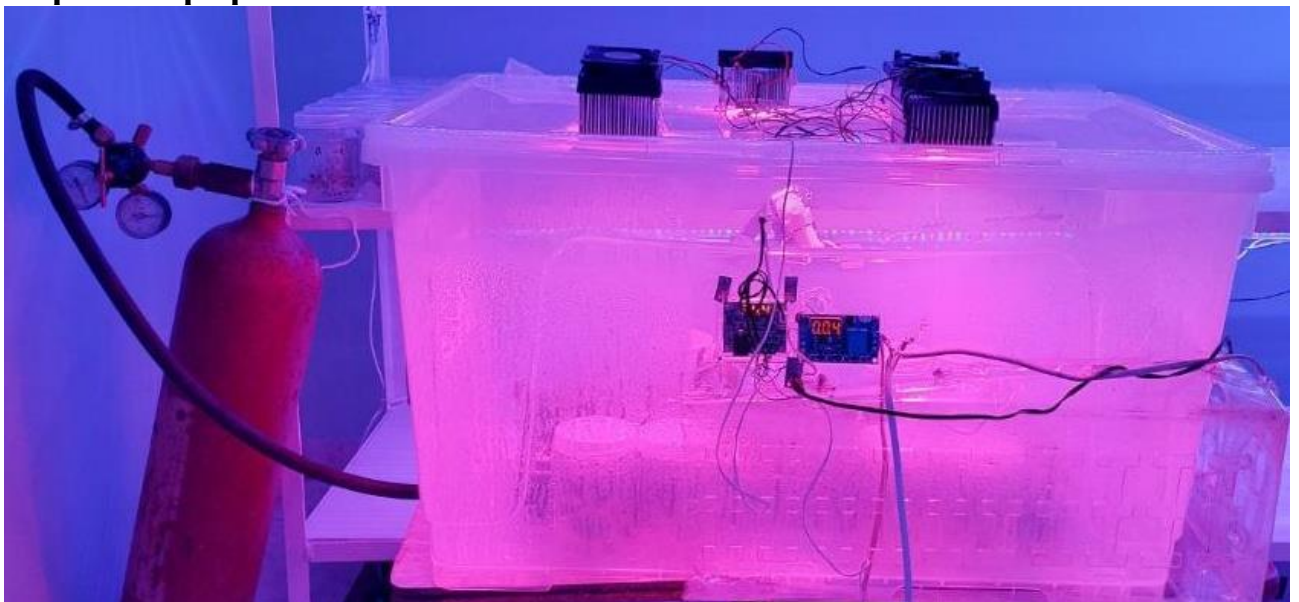


Рис. 61. Малооб'ємний модуль для фотоавтотрофного мікроклонального розмноження

ЧАСТИНА ТРЕТЯ

ПРИКЛАДИ ПРОТОКОЛІВ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ОКРЕМИХ ВИДІВ РОСЛИН

Більше століття методи МКР розроблено. В наші дні ці технології давно вийшли за межі суто наукових лабораторій. Розробка заново технологій, відповідно динамічних змін ринку потребує певного часу затрат матеріальних та інших ресурсів тому комерційно важливими є протоколи технологій.

Протокол технології МКР - це документ, який містить запис послідовності технологічних процесів з урахування біологічних особливості рослинного об'єкта. Вагому частину протоколу становить **пропис середовища**. Це список компонентів штучного живильного середовища з указанням їх умісту. Найчастіше кількість компонента подаю в грамах (міліграмах) на один літр готового середовища, рідше в молярній масі.

Протоколи МКР представлені, згідно чотирьох етапів цього процесу: 1 - отримання асептичної культури; 2 - мультиплікація; 3 - індукція ризогенезу; 4- постасептична адаптація.

Оскільки даний посібник може бути використаний в навчальних програмах спеціальностей окрім спеціальності “Біотехнологія і інженерія” в таких: “Агрономія”, “Садово-паркове господарство”, “Лісове господарство”, “Екологія” тому і орієнтовні протоколи подаються з тих культур, які можуть бути корисними для тієї чи іншої спеціальності. Представлені протоколи розроблені й апробовані авторським колективом в умовах промислового комерційного виробництва.

I. ХОСТА

1. Добір рослин донорів експлантів. Найкращий період для ізоляції експлантів – це поява перших скручених в трубку листків в кущах, що вийшли із стану спокою. За візуальними ознаками, а за потреби інструментальним аналізом, відбирають кущі вільні від вірусних хвороб. Відмивають їх від субстрату та ізолюють бруньки.

Для стерилізації застосовують свіжий розчин гіпохлориту натрію (15-30 діб після розфасування на підприємстві) і дистильовану автоклавовану воду у співвідношенні один до трьох. До отриманого розчину додають перманганат калію. Експозиція обробки експлантів становить 20 хвилин. Потім стерильний рослинний матеріал двічі-тричі промивають в автоклавованому дистилаті до зникнення слідів забарвлення деконтамінуючого розчину. Після стерилізації та промивання експланти переносять у стерильні чашки Петрі. Видаляють відмерлі, або з слідами опіків тканини, бруньки висаджують на поживне модифіковане середовище за Мурасіге й Скугом з додаванням 0,5 мг/л ІМК та 2,5 мг/л БАП (табл. 6).

Таблиця 6. **Живильне середовище для розмноження та вкорінення хости**

Компонент	Кількість мг/л		Компонент	Кількість мг/л	
	розмн.*	укоп.**		розмнож.	укоп.
NH_4NO_3	1250	1250	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3
KNO_3	1100	1100	Тіамін-НСІ	0,1	0,1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	440	440	Піридоксин-НСІ	0,5	0,5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	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
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	Гліцин	0,5	0,5
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	ІМК	0,5	4,0
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	БАП	2,5	0,5
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	Сахароза	30000	10000

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	Агар	7000	7000
KJ	0,83	0,83	Активоване вугілля	-	4000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8			

Примітка: *скороченню розмн. відповідає розмноження; ** скороченню укор. відповідає укорінення.

У випадку появи ознак ендофітного контамінування експланти повторно обробляють розчином гіпохлориту натрію та перманганату калію. У живильні середовища, залежно від походження контамінуючої мікрофлори, додають антибіотики або фунгіциди. Найчастіше на хості ендофітами є бактерії (*Erwinia*, *Pseudomonas* та інші). У випадку такої контамінації додають у живильне середовище левоміцетин (діюча речовина хлорамфенікол) в кількості 250 мг/л та нітрат срібла в кількості 3-5 мг/л.

Якщо неможливо встановити тип забруднення, або ж встановлено, що контамінування має грибне походження перед стерилізацією гіпохлоритом натрію і перманганатом калію експланти замочують у розчині фунгіциду Превікур Енерджі 840 SL (1-2 мл на 100 мл дистилату).

Для того, щоб краще проявлялись ознаки розвитку контамінантів у штучному живильному середовищі агар-агар замінюють на гелам гумі (гуарова камедь) у кількості 5 г/л. Цей гелеутворювач надає порівняно із агаром більш прозорої консистенції середовищу.

3. мультиплікація. Для розмноження використовують середовище з вмістом компонентів наведених у таблиці 6. Щоб приготувати середовища застосовують заздалегідь заготовлені маточні розчини (див. табл. 7, 8, 9, 10, 11).

Таблиця 7. **Макросолі** (розчиняти в літровій колбі), колба №1

№ п/п	Хімічна формула компонента	Грам на 1 л маточного розчину
-------	----------------------------	-------------------------------

1	NH_4NO_3	50,000
2	KNO_3	44,000
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30,800
4	KH_2PO_4	38,800

Таблиця 8. **Мікросоли за Мурасіге і Скугом** (розчиняти в літровій колбі), колба №2

№ п/п	Хімічна формула компонента	Г на 1 л маточного розчину
1	KJ	0,830
2	H_3BO_3	6,200
3	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22,300
4	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,600
5	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
6	$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025
7	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

Таблиця 9. **Fe-хелат** (розчиняти в літровій колбі), колба №3

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,112
2	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,512

Таблиця 10. **Кальцій*** (розчиняти в літровій колбі), колба №4

№ п/п	Хімічна формула компонента	г на 1 л маточного розчину
1	<i>Ca(NO₃)₂ 4H₂O</i>	44,000

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

Таблиця 11 – Маточні розчини біологічно активних речовин (розчиняти в окремих колбах)

№ п/п	Хімічна формула компонента	Кількість речовини, мг	Об'єм колби, мл
1	Вітамін В ₁ (тіамін)	250	250
2	Вітамін В ₆ (піридоксин)	250	250
3	Вітамін С (аскобінова кислота)	250	250
4	Нікотинова кислота	250	250
5	Гліцин	50	50
6	Інозитол	2500	250
7	*Аденін	250	250
8	БАП	250	250
9	ІМК	250	250

*аденін, ІМК, БАП спочатку розчиняють в невеликій кількості етанолу або 1М розчину КОН

Таблиця 12.– Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл (варіант для розмноження)

№ п/п	Інгредієнт середовища	на			Розведення в маточному розчині
		1 літр	2 літри	4 літри	
1	Макросолі	25	50	100	1:40
2	Мікросолі	1,0	2,0	4,0	1:1000
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10	20	40	1:10
4	Fe-хелат	25	50	100	1:40
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	6,4	1:1*
6	Вітамін В ₆	1,0	2,0	4,0	1:1
7	Вітамін С (аскобінова кислота)	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	20	1:1
12	БАП	2,5	5,0	10	1:1
13	ІМК	0,5	1,0	2,0	1:1

Примітка: * один міліграм в одному мілілітрі

Живцювання проводять одних із двох способів (рис. 62.):

- поділом стебла;
- поділом куща на окремі пагони.

За першого способу живцювання повторне субкультивування проводять через 25-35 діб, а за другого 45-60 діб та збільшують вміст сахарози до 40 г/л. Перший спосіб передбачає розділення на сегменти наземну частину пагона. Залежно від товщини пагона його можна поділити на 2-4 частини. Зняття таким чином апікального домінування обумовлює пробудження значної кількості бічних бруньок. Цей спосіб є більш доцільним за потреби швидкого нарощування кількості рослин в асептичних умовах. Для стимуляції в потомстві ризогенезу останній пасаж перед вкоріненням краще проводити

другим методом – поділом куща на мікропагони. Окремі пагони мають добре розвинуті апікальні бруньки, які є джерелами ендогенних ауксинів, що значно покращує утворення кореневої системи в розсади ще в асептичних умовах.



Рис. 62.Способи живцювання хости: поділом стебла (вверху); поділом куща на окремі пагони (внизу).

Під час поділу рослин на сегменти (живці) важливим є уникнути травмування бруньок, тобто рух ланцета має бути між бруньками як це

зображено на рисунку 63. Травмовані бруньки можуть бути джерелами калюсоутворення, а, як відомо, калюсогенез є джерелом соматичної мінливості. Навіть, якщо й травмовані бруньки розвиватимуться шляхом прямого морфогенезу вони все рівно відстають у рості, а це, в свою чергу, за нашими спостереженнями, одна з причин асинхронності розвитку регенерантів.

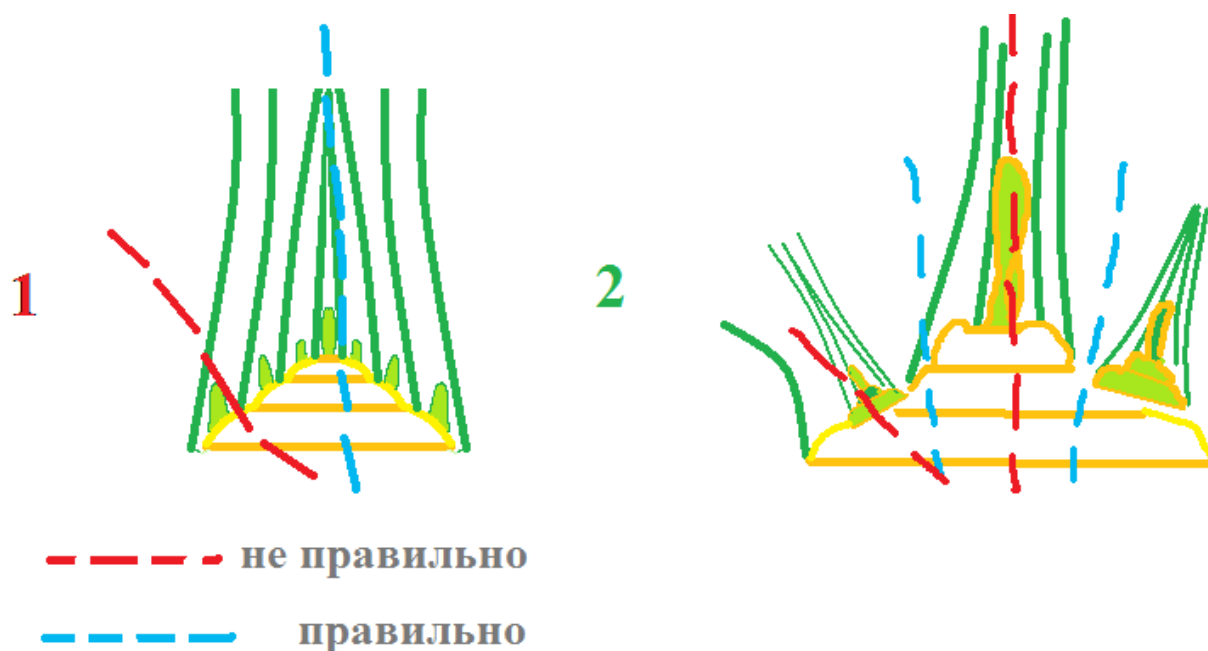


Рис. 63. Рух ланцета під час поділу рослин хости:

1. поділом стебла; 2. поділом куща на окремі пагони.

3. Укорінення. Проводять *in vitro*. Для цього в живильному середовищі змінюють склад гормонів: зменшують вміст БАП із 2,5 мг/л до 0,5 мг/л та збільшують вміст ІМК з 0,5 мг/л до 3,0-4,0 мг/л також додають активоване вугілля та зменшують вміст сахарози до 10 г/л. Якщо є загроза з причини тривалого періоду культивування (більше 45-60 діб) переростання розсади вміст мінеральної частини зменшують вдвічі.

4. 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 (щільність 20-30 г/м²).

Використовують субстрат на основі торфу з рН близькою до 6.0. У перші періоди слідкують за появою мікрофлори, яка знищує ніжні рослини. За появи перших ознак інфікування розсаду обробляють фунгіцидами. Впродовж двох-трьох місяців розсада формує 7-10 листків і придатна до висадки у відкритий ґрунт (рис. 64).



Рис. 64. Рослини хости після постасептичної адаптації

II. КАРТОПЛЯ

Основою насінництва картоплі є біотехнологічні методи, що передбачають оздоровлення та прискорене розмноження тестованого безвірусного матеріалу. У технології оздоровлення сортів картоплі зазначеним методом виділяють такі етапи: термотерапія бульб – виділення меристеми – регенерація рослин з меристеми – клональне мікророзмноження рослин *in vitro* – вирощування рослин у культиваційних спорудах та в полі (рис. 65).

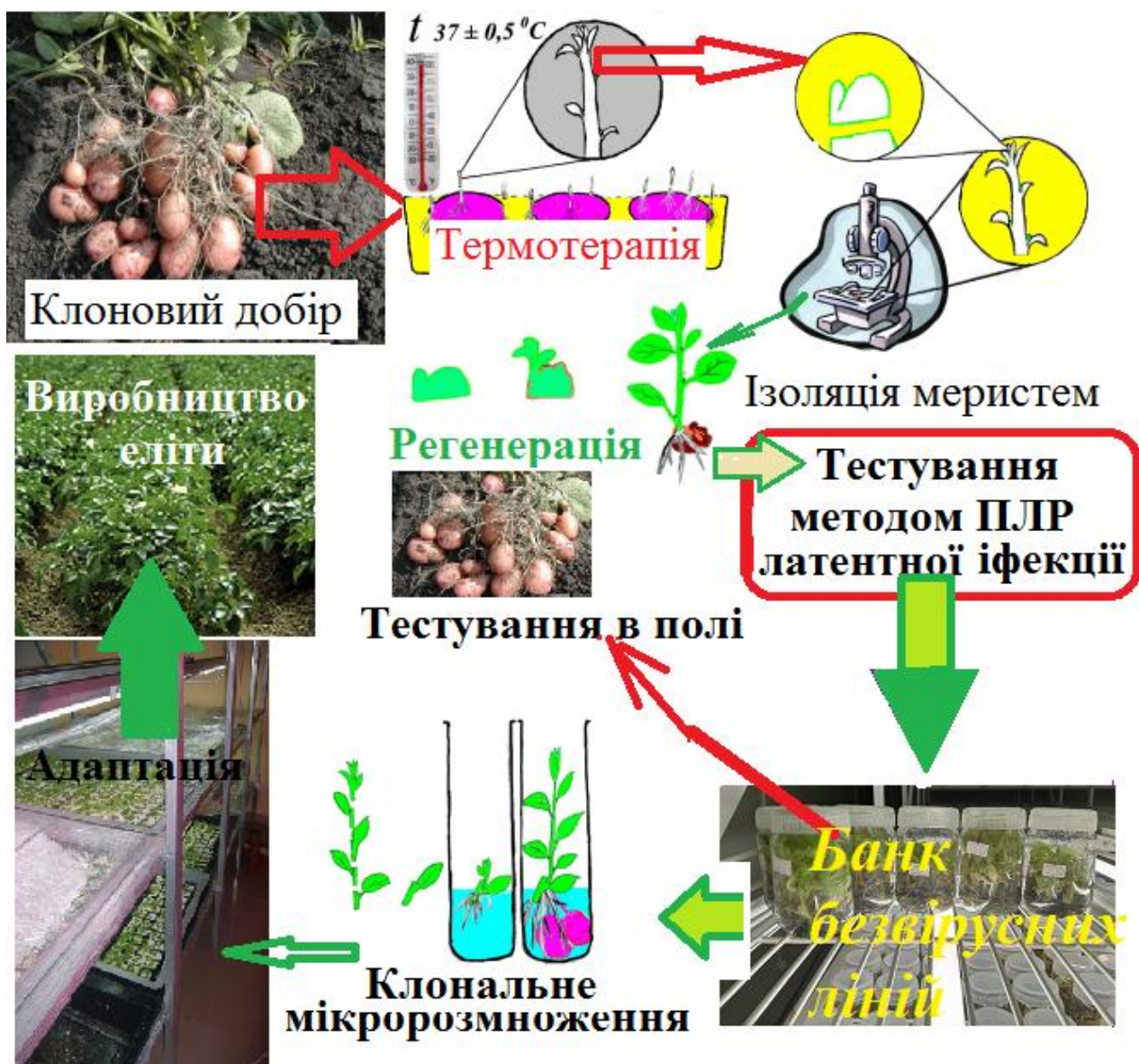


Рис. 65. Схема технологічного процесу отримання безвірусного насіннєвого матеріалу картоплі

1. Добір материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування. На цьому етапі застосовують наступні прийоми: добір кращих кущів, термо- та хемотерапію, ізоляцію та культивування меристем.

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

Термотерапія бульб. 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 стерильним піском. Кювети з бульбами ставлять на термотерапію у затемнений термобокс з автоматичним регулюванням температури в межах 37–39 °С. Вологість повітря підтримують не нижче 75 %, світло в боксі включають лише під час огляду бульб. За вказаного режиму на бульбах утворюються довгі етиольовані паростки. Тривалість та параметри режиму термотерапії визначаються, як видовим складом вірусів, так і біологією сорту. Зазвичай вона триває від 2 до 12 тижнів.

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

Ізольовують меристеми з паростків під бінокулярним стереомікроскопом з масштабною сіткою та збільшенням не менше як у 24 рази. Виконують операцію добре загостреними великими медичними голками (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 покриву.

Меристемний купол розміром 100–200 мк, з одним примордіальним листком, відокремлюють двостороннім підрізанням голкою і на її вістрі переносять на агаризоване живильне середовище пробірки, уколом голки в агар та плавним розрізуванням голкою агару на $\frac{1}{2}$ діаметра пробірки (рухом від центру до стінки) залишають меристему в пробірці.

Потім пробірки ставлять у спеціальні камери з регульованим світловим та волого-температурним режимом. Температура культивування меристем становить 24 - 25 °С, освітленість 4 - 12 тис. люкс з 16 -годинним фотоперіодом. Період регенерації рослин *in vitro* з меристем становить 2- 8 місяців. Впродовж цього періоду меристемні експланти через кожні 10-15 діб пересаджують на

нову порцію середовища. Його склад змінюють залежно від стану регенерантів кількісно і якісно. Перш за все, це вміст таких гормонів: ІОК, кінетин та гіберелін.

Отримані рослини розмножують і одночасно трикратно перевіряють на зараженість вірусами, застосовуючи методи імуноферментного аналізу та полімерланцюгових реакцій.

2. 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 з пробірок, розрізають на частини, кожна з яких містить відрізок стебла з листком та пазуховою брунькою (рис. 66). Частина стебла над листком в 2–3 рази коротша частини стебла розміщеної нижче листка. Живці висаджують на поживне середовище, розроблене в Інституті картоплярства НААН.

Базовий склад цього середовища (в мг на 1л) такий: макросолі: - NH_4NO_3 – 1250; KNO_3 – 1100; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 440; KH_2PO_4 – 970; мікросолі за Мурасіге-Скугом, однак кількість $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ збільшено до 770; органічні добавки: B_1 – 1,6, B_6 – 1,0, аскорбінова кислота – 1,6; кінетин – 0,25; аденін – 0,25; ІОК – 1,0; агар – 700, сахароза – 1000. Подальше живцювання регенерованих з живців рослин проводять через кожні 30 діб.

Живці висаджують у пробірки з живильним середовищем на глибину міжвузля. Через 18-22 доби рослини відростають, їх використовують для повторного живцювання до одержання необхідної кількості рослин, з яких одержують мікро-, мінібульби і розсади. Використання методу живцювання рослин у пробірках дозволяє протягом 3–4-х місяців отримати із однієї вихідної рослини 2-3 тис. регенерантів, придатних для пересадки в ґрунт, тобто за 8–10 місяців від однієї рослини більше 20 тис. рослин.



Рис. 66. Поділ рослин картоплі на живці

Для отримання мікробульб у пробірках використовують живильні середовища з високим рівнем мінерального та вуглеводного живлення і регульований фоторежим. Зокрема для столоно- і бульбоутворення підвищують концентрацію сахарози в середовищі до 4-8 % та встановлюють 16 годинний фотоперіод впродовж перших 10-15 діб, а потім – 35-45 діб короткоденний 4-10 годинний фотоперіод. Більшість сортів утворюють бульби в пробірках за 55-60 діб.

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

Характерно, що короткотривале витримування живців впродовж 1-2 доби в умовах 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, тому, що освітлювальний період скорочується до 7 діб в ранньостиглих та до 10 діб середньостиглих сортів.

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

В асептичних умовах раціональні наступні модифікації живильного середовища:

- заміна кінетину на 20 мг/л аденіну або за умови занесення до “списку дозволених до використання...” на препарат 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 субстраті у вологих камерах та укоріненням верхівок і пазухових пагонів, та іншими методами. У якості субстратів застосовують перліт, мох сфагнум, гідрогелі, пластагар. В усіх субстратах рН доводять до 5,6-6,0. Джерелом елементів живлення використовують мінеральну основу за Мурасіге й Скугом.

III. 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 рослину при її травмуванні. Неприпустим є обрізування сікатором не висохлого листа, 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.

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.

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 унеможлиблює швидкий дальній транспорт вірусів.

Ізолюючи такий апекс, 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.

Застосовується технологія оздоровлення сортів часнику. На першому етапі проводимо добір та випробування клонів (рис. 67, 68.).



Рис. 67.Добір типових для сорту цибулин з високими клонів. урожайними показниками.



Рис.68.Випробування відібраних

Другим кроком є закладка матеріалу в термостат для термотерапії (рис. 69).



Рис.69.Термостат для термотерапії

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

Після термотерапії зубки обробляють антисептиком (наприклад, Бланідас 300), виокремлюють бруньку (рис. 70.) і переносять на предметний столик мікроскопа, ізолюючи меристему (рис. 71., 72., 73).

Ізольовані меристеми висаджуються на штучні живильні середовища з мінеральними та біологічно активними речовинами. Протягом 1–2 місяців з них регенеруються мікророслини (рис.74., 75.). 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. 76, 77). Останні є технологічно кращими, оскільки їх можна накопичувати протягом тривалого часу. Культивування екплантів успішно проводиться на середовищі з макросолями, кальцієм, згідно пропису Данстена і Шорта (BDS). Мікросолі, Хелат заліза використовують, згідно пропису Мурасіге і Скуга.



Рис. 70. Виокремлення бруньки із зубка часнику, що пройшов термотерапію



Рис.72.Відокремлення останніх криючих листків бруньки



Рис. 73. Брунька під мікроскопом.

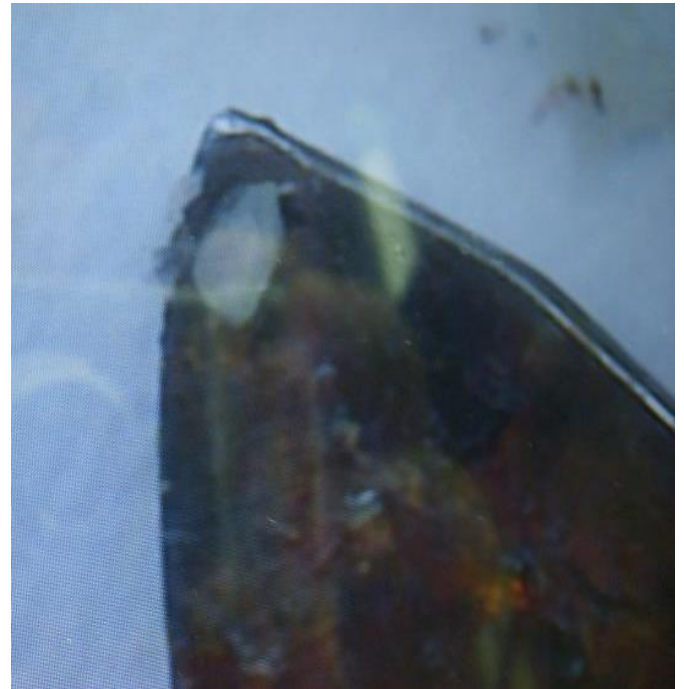


Рис.74. Меристема на вістрі інструмента.



Рис. 74. Морфогенез меристемного експланта



Рис. 75.Регенерант із меристеми



Рис.76. Початок утворення мікроцибулин



Рис. 77. Дозріла мікроцибулина

На етапах введення 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 13 і 14.

Таблиця 13. Кількість макросолей – BDS для приготування маточного розчину (1:40)

№ п/п	Компонет	Кількість, г/л	№ п/п	Компонет	Кількість, г/л
1	KNO_3	101,2	4	NH_4NO_3	12,8
2	MgSO_4	9,88	5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,36
3	NaH_2PO_4	6,88	6	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	9,2

Таблиця 14. Маточний розчин Са – BDS (1:40)

№ п/п	Компонент	Кількість, г/л
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	101,2

IV. МАЛИНА

1. 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 дистилляту).

Після замочування у фунгіциді об'єкти промивають автоклавованим дистиллятом. 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 дистилляті 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. 15) з додаванням 2–2,5 мл/л РРМ.

Під час ізолювання меристемних експлантів користуються правилом: бруньку препарують одним інструментом (голка, зйомне лезо ланцента), а відокремлюють іншим. Це зменшує ймовірність потрапляння із соком пошкоджених тканин вірусних часток. Також, ізолюють меристемний купол із одним-два примордіальними листками. Інші частини росту як це показано на рисунку 78 є технологічно неприпустими оскільки в них вірусні частки легко проникають.

Таблиця 15. Живильне середовище для розмноження та вкорінення
малини

Компонент	Кількість, мг/л		Компонент	Кількість, мг/л	
	розмн.	укор.		розмн.	укор.
NH_4NO_3	1250	625	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	55,6	55,6
KNO_3	1100	550	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	74,6	74,6
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	440	220	Тіамін-НСІ	1,6	1,6
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	770	385	Піридоксин-НСІ	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
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,3	11,15	Мезоінозит	100	100
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0125	Гліцин	0,5	0,5
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0125	Аденін	0,2	0,1
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	4,3	ІМК	0,1	2,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,125	Бензиламінопурин	1,5	0,1
<i>KJ</i>	0,83	0,415	<i>Сахароза</i>	30000	10000
			<i>Агар</i>	7000	7000
рН 5,6					

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

У разі застосування замість $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ препарату Ferrilene 4.8 Orto – Orto його додають 183,4 мг/л.

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

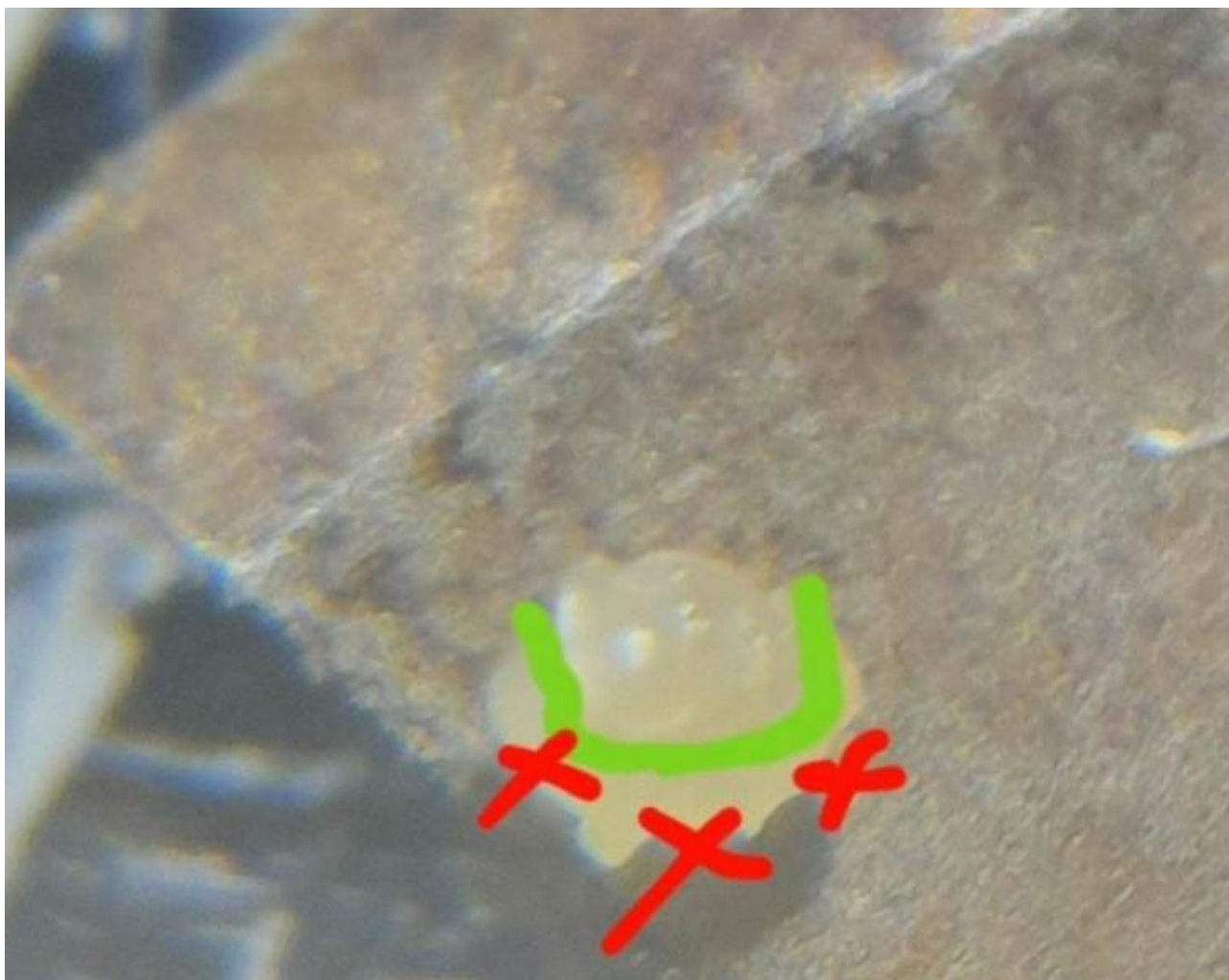


Рис. 78 Приклад неправильно ізолюваного меристемного експланту малини на вістрі леза ланцета

2. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище з умістом компонентів, представлених у таблиці 16 його готують із маточних розчинів аналогічно протоколам по хості.

Живцювання проводять шляхом поділу конгломерату пагонів (рис. 79). Для отримання конгломератів уміст БАП збільшують, а для отримання регенерантів із одним пагоном – зменшують.

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	25	75	150
2	Мікросолі	1	3	6
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	10	30	60
4	Fe-хелат або Ferrilene 4.8 Orto – Orto	50	150	300
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В 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

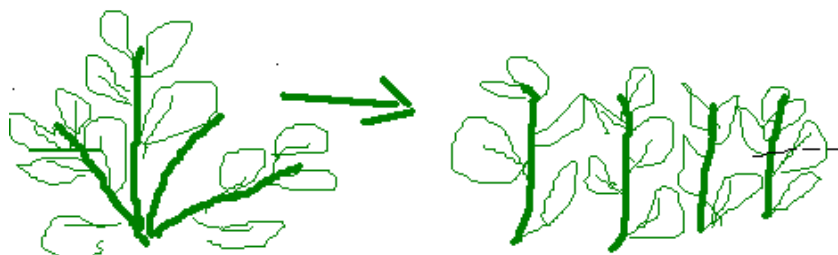


Рис. 80. Спосіб живцювання малини *in vitro*.

3. Укорінення проводять *in vitro*. Для цього змінюють середовище (табл. 17), зменшуючи уміст мінеральної частини та цитокінінів.

4. 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 рН 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).

Таблиця 17. 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	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5	15	30
4	Fe-хелат або <i>Ferrilene 4.8 Orto-Orto</i>	50	150	300
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В 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

За 1,5 місяці розсада формує 5–7 листків і стає придатною до висадки у відкритий ґрунт (рис.80). Завдяки ювенілізації *in vitro* адаптовані регенеранти здатні до 1–2 живцювань, але вже в умовах закритого ґрунту. Це дозволяє знизити собівартість посадкового матеріалу.



регенеранти після 30 діб адаптації



регенерант після 45 діб адаптації



регенерант після постасептичного живцювання

Рис. 80. Адаптовані регенеранти малини, сорт Брусвяна

Також за незначної кількості регенерантів *in vitro* успішним є їх живцювання. Укорінення таких живців відбувається одночасно із адаптацією (рис.81) на перлітовому субстраті у вологій камері, яка більш детально описана в протоколі по павловнії.



Рис. 81. Укорінення живців малини *in vitro* на перлітовому субстраті

V. ОЖИНА

1. Добір рослин-донорів експлантів та введення в асептичні умови проводять аналогічно порядку дій на малині (див. Підрозділ . Малина).
2. Розмноження, нарощування необхідної кількості рослинного матеріалу *in vitro*. Для розмноження використовують середовище із вмістом компонентів, представлених у таблиці 18.

Для приготування середовища застосовують заздалегідь приготовлені маточні розчини аналогічно описаним у протоколі для хости (підрозділ 1 частини три). 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 16 .

Таблиця 18. Живильне середовище для розмноження та вкорінення ожини

Компонент	Кількість, мг/л		Компонент	Кількість, мг/л	
	розмн.	укоп.		розмн.	укоп.
NH_4NO_3	1250	1250	Ferrilene 4.8 Orto–Orto	137,55	-
KNO_3	1100	1100	AgNO_3	1,0	1,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	440	440	Тіамін-НCl	1,0	1,0
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	770	770	Піридоксин-НCl	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
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	Мезоінозит	100	100
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	Гліцин	0,5	0,5
$\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	Аденін	0,2	0,1
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	ІМК	0,1	4,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	БАП	0,5	0,2
<i>KJ</i>	0,83	0,83	<i>Сахароза</i>	30000	10000
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	-	27,8	<i>Агар</i>	7000	7000
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	-	37,3	Активоване вугілля	-	1000
pH 5,6					

Таблиця 19.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) ₂ ·4H ₂ O	10	30	60
4	Fe-хелат, або Ferrilene 4.8 Orto–Orto	35	105	210
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	9,6
6	Вітамін В 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	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	-	-	-

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.

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.

4. Постасептичну адаптацію проводять у два етапи:

А. 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.

Б. 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 або подібні за характеристиками на основі фрезерного торфу із рН 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. 82).



Рис. 82. Адаптовані регенеранти ожини в Р 9.

VI. АКТИНІДІЯ

Відомо близько 30 видів актинідії. Цей протокол розроблено та успішно апробовано на таких видах актинідії: *А. аргута*, *А. коломікта*, *А. китайська* (рис. 83) та *А. делікатесна* (ківі).

1. 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.

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 антиоксидантному розчині (перші 60 хв – у розчині аскорбінова кислота 200 мг/л + цистеїн 5 мг/л, наступні 60 хв – у розчині полівінілпіролідону 10 г/л).

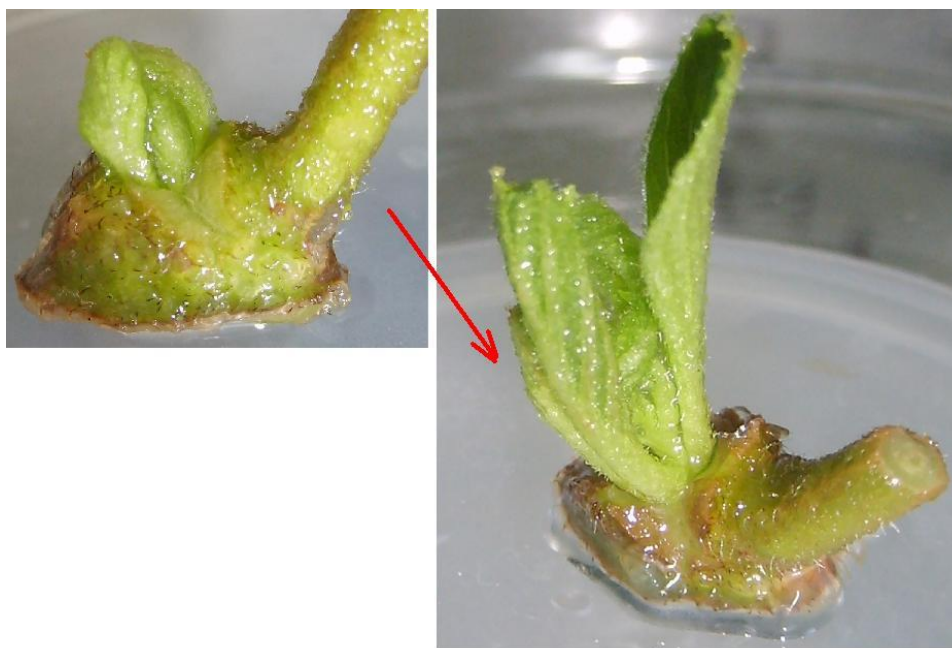


Рис. 83. Регенерація бруньки *Actinidia chinensis*.

Для захисту від глибинного контамінування бруньки переносять у розчин системного фунгіцида “Превікур Енерджі 840 SL”. Після цього застосовують 20 хвилинну обробку розчином натрієвої солі дихлорціануронової кислоти (0,7 г препарату Бланідас 300 на 100 мл автоклавованого дистиляту). Промивання матеріалу проводять тричі у автоклавовану дистиляті. Бруньки звільняють від верхніх листків.

Їх висаджують на таке живильне середовище:

Макросолі: NH_4NO_3 - 417; KNO_3 - 367; KH_2PO_4 - 324; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – **257 г**; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - **293 г** (маточний розчин кальцію готується окремо і додається перед самим приготуванням середовища).

Мікросолі , Fe – хелат за прописом Мурасіге і Скуга

Цитокиніни: БАП (0,25 мг/л)+кінетин (0,5 мг/л).
Ауксин - ІМК в кількості 0,2 мг/л.
Гіберелін - ГКЗ - 0,75 мг/л.
Вітаміни (в мг/л): В1 - 1,6; В6 - 1,0; С - 3,0; РР - 1,0.
Інші органічні добавки: амінокислота гліцин - 1,0 мг/л;
Сахароза 30 г/л;
агар 7,0 г/л.
рН 5,5-5,7.

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

2 і 3. Розмноження та ризогенез *in vitro*. Для культивування використовують живильне середовище із вмістом ІМК 0,5 мг/л і кінетину 0,1 мг/л також для розмноження використовують варіант середовища з надлишком БАП (рис. 84), а для індукції ризогенезу – надлишок ауксину (ІМК).

Також для ризогенезу можна застосовувати середовище Куаріна і Лепувра з половинним умістом мінеральних елементів та додаванням ауксину ІМК. Поділ 30 денних 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 рН (5,5) субстрату та вологості (рис. 85). Готують субстрат на основі верхового торфу до його додають мінеральну частину середовища, що застосовувалося *in vitro*.

Низька вологість, особливо у поєднанні з високим рН, викликає фізіологічні опіки рослин, які можна прийняти за ураження грибною інфекцією.



Рис. 84. Гормональна детермінація онтогенезу рослин *A. arguta in vitro*, сорт Оригінальна, 30 доба асептичного культивування:

1. БАП - 1,5 мг/л;

2. ІМК - 2 мг/л

Якщо за низької вологості збереглися бруньки, то в умовах підвищеної вологості до 100% регенеранти відновлюються (рис.86). За два-три тижні після висадки вологість поступово знижують, через місяць рослини стають готовими до реалізації, або пересаджування у більші ємності (рис. 87).

За даною технологію успішно ведеться виробництво саджанців різних ботанічних видів, сортів роду Актинідія, зокрема й посадковий матеріал ківі який представлений на рисунку 88.



рН субстрату 6,5; вологість 75%

рН субстрату 5,5; вологість 100%

Рис. 85. Вплив вологості повітря та кислотності субстрату на особливості постасептичної адаптації актинідії аргута



Рис. 86. Відновлення рослин актинідії аргута після низької вологості



Рис. 87. Адаптовані впродовж одного місяця рослини актинідії аргута



Рис. 88. Регенеранти ківі після 75 днів адаптації в теплиці, сорт Ківі Карпат Стратона Валентайн

VII. ПАВЛОВНІЯ

Живильні середовища для культивування павловнії *in vitro*. Залежно від етапу МКР павловнії нами застосовується один з варіантів штучного живильного середовища (табл.20). Змінюються за етапами такі складові: макросолі; кальцію нітрат; фітогормони.

Середовище готують з маточних розчинів. Склад макросолей, кальцію нітрату наведений у таблицях 21, 22, 23, Fe-хелату у підрозділі 1. Хоста, які містять збільшені в 40 разів концентрації необхідних компонентів такі маточні розчини у кількості 25 мл додають до 1л середовища.

Уміст мікросолей у маточному розчині збільшено в 1000 разів, тобто на 1л середовища додають 1 мл розчину мікросолей.

Гормони, вітаміни, гліцин готують кожен окремо, розчиняючи в розрахунку 1 мг компонента на 1 мл дистилату. Наприклад, 100 мг вітаміну С в 100 мл дистилату. Для БАП і кінетину, як розчинник використовується спочатку КОН (2-3 мл 1 М розчину на 100 мг гормону), потім додають дистилат

та 2-3 мл етилового спирту. Спирт запобігає випаданню осаду. ІМК розчиняють в етанолі, а отриманий розчин стабілізують 1-3 мл 1М розчину КОН на 100 мг.

Таблиця 20. Компоненти штучних живильних середовищ

Компонент	Кількість, мг/л			Компонент	Кількість, мг/л		
	В*	М*	Р*		В*	М*	Р*
Макросолі							
NH ₄ NO ₃	1250		400	KH ₂ PO ₄	970		270
MgSO ₄ x7H ₂ O	770		360	KNO ₃	1100		1800
Ca(NO ₃) ₂ x4H ₂ O	440		834				
Мікросолі							
H ₃ BO ₃	6,2			CuSO ₄ xH ₂ O	0,025		
MnSO ₄ xH ₂ O	22,3			ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6		
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025			Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25		
KJ	0,83						
Fe-хелат							
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8			Na ₂ ЕДТАx2H ₂ O	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	Гіберелін	0,75		
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»

Таблиця 21. 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	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30,800
4	KH_2PO_4	38,800

Таблиця 22. 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, <u>або х 2,047</u>	7,12
4б	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,39

Примітка: *молярна маса MgSO_4 безводний $\sim 120,37$; Молярна маса $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \sim 246,37$; співвідношення цих молярних мас становить 2,047

Таблиця 23. 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	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	44,000
2	варіант для ризогенезу		33,352

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

1. Введення в асептичну культуру. Для отримання стерильних рослин рекомендовано використовувати, як основний антисептик препарат Бланідас 300 (0,7 г на 100 мл води) та у разі ендогенного контамінування, як допоміжний – препарат РРМ (1,5-2,5 мл на 1 л живильного середовища). Оптимальний період відбору експлантів грудень-січень. Для цього з відібраних за господарсько-цінними ознаками здорових рослин зрізують однорічні гілки й ставлять їх в тепломісці у воду. Воду міняють один раз у три доби. Ці гілки знаходяться в стані вимушеного (не глибокого) спокою, тому через два-три тижні на них пробуджуються бруньки. Якщо необхідно ізолювати експланти в серпні-жовтні, стеблові живці обробляють гібереловою кислотою (ГК₃, або сумішшю ГК₄+ГК₇). Через 7-10 діб бруньки пробуджуються.

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

Якщо у середовищі інтенсивно виділяються фенолоподібні речовини, то у складі середовища акусин ІМК (0,5 мг/л) замінюють на суміш ІМК та НОК (ІМК 0,4 мг/л + НОК 0,1 мг/л). Впродовж перших трьох субкультивувань вміст БАП зменшують до 0,75-1,0 мг/л.

2. Мультиплікація. Живильне середовище для розмноження готують з маточних розчинів, згідно з таблицею 7.5. Для павловнії середній інтервал часу між субкультивуваннями становило 15-30 діб (рис.73). Після 15-20 діб культивування пагони регенерантів особливо не змінювались у розмірах.

Таблиця 24. **Об'єми маточних розчинів для приготування середовищ у мл (варіант для розмноження)**

№ п/п	Інградієнт 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	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	25	50	100	1:40
4	Fe-хелат	25	50	100	1:20
5	Вітамін В ₁ (тіамін)	1,6	3,2	6,4	1:1*
6	Вітамін В 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
910	Гліцин	0,5	1,0	2,0	1:1
11	Інозитол	10	20	40	1:10
12	Аденін	5	10	40	1:1
13	Кінетин	0,8	1,6	3,2	1:1
14	ІМК	0,3	0,6	1,2	1:1

Примітка: * “1:1” один міліграм речовини одному мілілітрі розчинника

Водневий показник живильного середовища впливав на засвоєння елементів живлення, ріст і розвиток регенерантів (рис. 89). Оптимальним було рН 5,5-5,8. За рН живильного середовища 5,3 і, особливо, 5,0 у регенерантів

виявляються типові ознаки нестачі фосфору та калію внаслідок ускладнення їх засвоєння. Регенеранти з темно-зеленими листками відстають у рості.

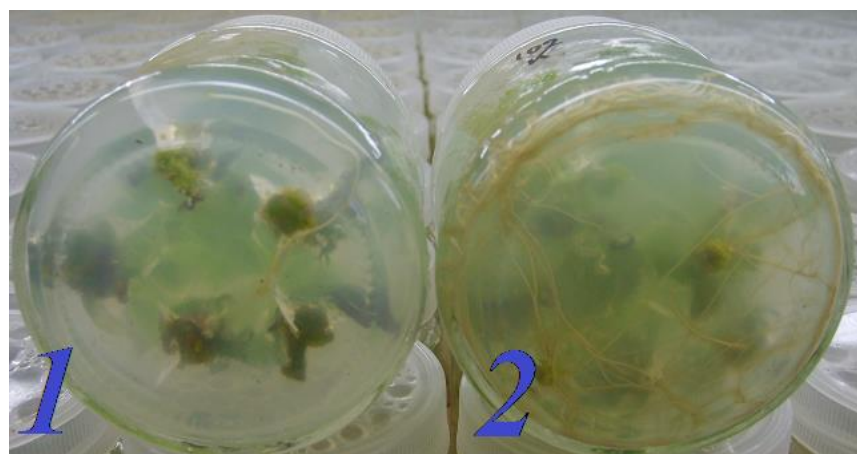
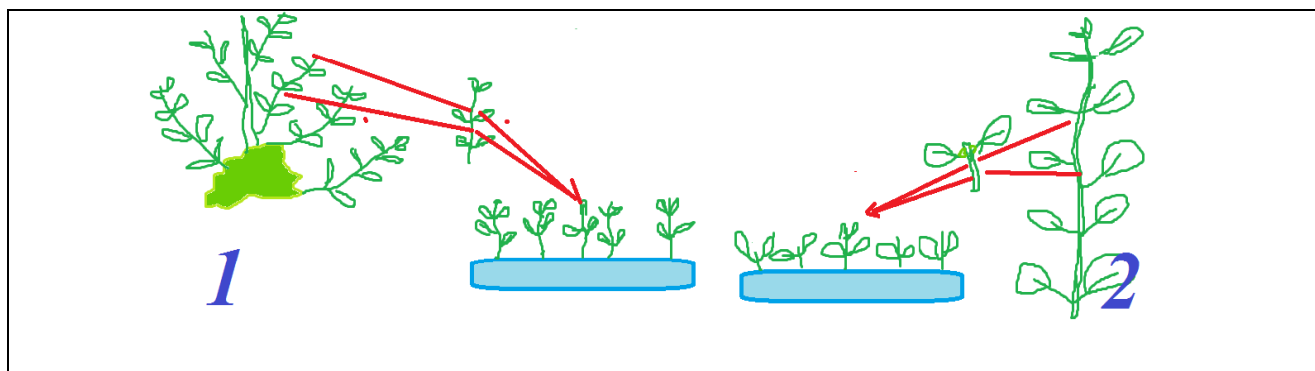
Для швидкого накопичення значної кількості рослин прямим морфогенезом, тобто з бруньок, а не з калюсних клітин, використовують один з шляхів живцювання (рис.90): 1) поділом конгломерату мікропагонів; 2) одновузловими живцями.



Рис. 89. Стан регенерантів павловнії *in vitro* в добах



Рис. 90. Вплив рН на розвиток регенерантів павловнії



**Рис. 91. Розвиток регенерантів павловнії за різних шляхів живцювання:
1 - поділом конгломерату пагонів; 2 – одновузловими живцями.**

Перший спосіб живцювання досягається застосуванням цитокиніну БАП, однак має два недоліки: 1) за утворення конгломерату відбувається часткове калюсоутворення, і таким чином, виникає потенційна можливість прояву

мутагенезу (рис. 92); 2) наявність БАП у живильному середовищі перешкоджає нормальному коренеутворенню. Міцні пагони, що придатні для отримання одноузлових живців одержують за невеликих концентрацій іншого цитокініну – кінетину на фоні ауксину ІМК.

Передозування БАП, чи кінетину фітотоксичне і призводить до появи регенерантів з гіпергідратованими тканинами (вітрифікованими). Фітотоксичний ефект цитокінінів може накопичуватись з покоління у покоління, тому після перших 3-4 пасажувань кількість цитокініну зменшують. Для зняття фітоксичного впливу цитокінінів у випадку масової появи вітрифікованих регенерантів роблять проміжне живцювання з додаванням гіберелової кислоти (ГК₃) або суміші ГК₄+ГК₇.



конгломерат пагонів з калюсним регенеранти з гіпергідратованими утворенням в базальній частині тканинами регенерантів

Рис. 92. Прояв надлишку БАП при культивуванні павловнії *in vitro*

З і 4. Ризогенез та постасептична адаптація. У павловнії *in vitro* корінь дуже ламкий, тому найчастіше за масового розмноження висаджують рослини, обламуючи коріння. При цьому враховують надзвичайну ламкість стебла регенерантів у зоні кореневої шийки та опушеність, що вимагає обережного

поливу на перших етапах росту в умовах закритого ґрунту. Ризикованим також є полив перші 15 діб туманно-утворюючими установками. Це пов'язано з товстистим листям, на якому наявне інтенсивне опушення із солодкими виділеннями. За умов туману на таких листках можуть поселятись мікроорганізми, як сапрофітні, так і патогенні.

Як субстрат найчастіше використовують торфосубстрати, кокосовий ґрунт, кокосові «пігулки» (рис. 93), або перліт.



Рис. 93 – Використання кокосових «пігулок» джіфі для постасептичного зеленого живцювання павловнії

Вирощування на субстратах з домішками органічних речовин, особливо за недотримання технології (контроль грибної інфекції, кислотності) ризиковане внаслідок втрати розсади через ураження комплексом збудників, які викликають фузаріозне в'янення та чорну ніжку. 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).

Застосування, як субстрату агроперліту дозволяє уникнути вище зазначених проблем. Агроперліт – це крупна фракція спученого перліту (2,5-5 мм), 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. Отже, 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 та її утримувати, хоча може легко і віддавати.

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. 25.).

Таблиця 25. Об'єми маточних розчинів для приготування поживного розчину у розрахунку на 1 л

№ п/п	Інградієнт середовища	Об'єм, мл	Розведення в маточному розчині
1	Макросолі	25	1:40
2	Мікросолі	1	1:1000
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	25	1:40
4	Fe-хелат	30	1:20
5	AgNO_3	3-5	1:1

За використання цього субстрату уникають надмірних поливів, особливо поверхневого. Це пов'язано із загрозою появи синьо-зелених водоростей. Самі водорості не є небезпечними для рослин, але продукти їх гниття пригнічують ріст розсади.

За постасептичної адаптації павловнії так само, як і в природних умовах, властиві швидкі темпи росту, як пагона, так і кореневої системи. Якщо на п'яту добу у базальній частині відмічається утворення напливу, то на десятю добу 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, вирощених «на агарі», їх можна ще 2-3 рази переживцювати в постасептичних умовах. Після 4-5 живцювань втрачається ювенільність, а отже, і регенераційні властивості, в т.ч. утворення адвентивних коренів. Однією з ознак втрати ювенільності в павловнії *ex vitro* є утворення трубчастого стебла.

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



Рис. 94. Укорінення живців павловнії на 6-у добу за другого постасептичного живцювання.



Рис. 95. Саджанці отримані за другого постасептичного живцювання в Р₉ через 15 діб після живцювання.

VIII. МИГДАЛЬ

Мигдаль солодкий, цінна із господарської точки зору горіхоплідна культура. Однак ботаніки її відносять до кісточкових культур роду Слива (*Prunus*), який входить до підродини мигдалеві (*Amygdaloideae*), або сливові (*Prunoideae*) родини розових (*Rosaceae*). Отже, класичні середовища для горіхоплідних, як наприклад, DKW не є вдалим для мигдалю.

Також середовища QL, MS, на яких успішно культивуються представники роду Слива не є оптимальними для мигдалю, який еволюційно походить із регіонів з ґрунтами з не високим умістом елементів живлення зокрема, нітрогену. Натомість мигдаль є типовим кальцієфілом.

Турецькі вчені [Nas M., Read P. (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae*. 101(1-2): 189–200.] розробили гіпотезу, що близьким до оптимального є середовище, яке за своїм умістом подібне до умісту сім'ядолей. Згідно, з цією гіпотезою розроблено прописи таких середовищ:

- для мигдалю NAM (Nas Almond Medium);

- для фундука NRM (Nas Read Medium).

Для МКР пропонується, як основне модифіковане середовище NAM (табл. 26) і як “розвантажувальне” раз через 5-7 пасажів модифіковані середовища QL, або NRM.

Табл. 26. Пропис основного та розвантажувального середовищ для МКР мигдалю.

Компонент	Уміст в 1 л середовища	
	QL _{mod}	NAM _{mod}
NH ₄ NO ₃	400,00	900,00
KNO ₃	1800,00	250,00
KH ₂ PO ₄	270,00	1550,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	360,00	2050,00
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	833,80	1050,00
CaCl ₂ ×2H ₂ O	—	45,00
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,800	—
Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O	37,30	—
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	—	114,63
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,76	6,00
H ₃ BO ₃	6,20	11,00
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,60	11,0
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	3,20
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,10
CoCl×6H ₂ O	0,025	—
KJ	0,08	—
ВАР	1.5 введення, 1,0 мультиплікація і 0,3 ризогенез	
ІВА	0,2 введення, 0,3 мультиплікація і 1.5 ризогенез	

Вітамін В ₁	1,00
Вітамін В ₆	0,60
Вітамін РР	1,00
Вітамін С	3,00
Мезо-інозитол	100,00
Гліцин	1,00
Сахароза	30×10 ³

Особливості приготування маточних розчинів мінеральної частини середовища представлені в таблиці 27 Решта розчинів однокомпонентні і готуються за принципом один міліграм в одному мілілітрі (1:1). Для приготування робочого розчину додаються компоненти за таблицею 28.

Таблиця 27. Приготування маточних розчинів мінеральної частини середовища NAM (Nas Almond Medium)

Компонент		кількість	
		мг/л готового середовища	г/л в 1 л маточного розчину
Макросолі (1:40)			
1	NH ₄ NO ₃	900	36.0
2	KNO ₃	250	10.0
3	KH ₂ PO ₄	1550	62.0
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2050	82.0
Ca (1:100)			
1	Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1050	105,00
2	Ca Cl ₂ ·2H ₂ O	45	4,5
Мікросолі (1:1000)			

1	H ₃ BO ₃	11.0	11.0
2	CuSO ₄ x5H ₂ O	3.2	3.2
3	MnSO ₄ xH ₂ O	6.0	6.0
4	NaMoO ₄ x2H ₂ O	0.1	0.1
5	ZnSO ₄ x7H ₂ O	11.0	11.0
Хелат заліза			
1	Ferrilene 4.8 Orto-Orto	114,63	9,17

Таблиця 28. Використання маточних розчинів для приготування середовища NAM (Nas Almond Medium)

Компонент	На 1 літр	На 4 літри
Макросолі NAM	25.00	100,00
Мікросолі NAM	1,00	4,00
Кальцій NAM	10,00	40,00
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	12,5	50,00
B ₁	0,5	2,0
B ₆	0,3	1,2
Нікотинова кислота (PP)	3,0	12,0
Аскорбінова кислота	1,5	6,0
Гліцин (глютамін)	1,0	4,0
Аденін	0,5	2,0
Кінетин	1,0	4,0
БАП *м/р	0,2/0,1	0,8/0,4

ІОК *м/р	0,25/1,0	1,0/4,0
ІМК *м/р	0,25/0,5	1,0/2,0
Інозитол	0,1 г	0,4 г
Агар	7,0г	28,000г
Цукор	30.000	120,000
рН 5,8-6,0		

* скороченню м/р відповідає мультиплікація/ризогенез

1. Для введення в асептичні умови застосовують одну з двох стратегій:

А. Серед маточних рослин за результатами ПЛР діагностики відокремлюють безвірусні донори первинних експлантів бруньок;

В. Із донорів ізолюють меристемні експланти.

2. Мультиплікацію проводять з інтервалами не менше 60 днів. Застосування в якості первинних експлантів *in vitro* призводить до розеточності та гіпергідратації регенерантів (рис.96). За 3-5 пасажу експланти втрачають морфогенетичний потенціал.



Рис. 96. Початкова стадія патології мигдалю: вкорочення пагону (розеточність) та гіпергідратація

У випадку появи такої патології експланти інколи і патологічні регенеранти переносять на середовище з мінімальним умістом цитокінінів (0,1 мг/л) та зменшеною в 2 рази концентрацією мінеральних елементів.

3. Для індукції ризогенезу змінюють цитокінінауксиновий індекс, згідно таблиці 32 вбік переважання ауксинів (див. Правило Скуга - Мілера).

4. Адаптацію проводять на субстраті, який складається із кокосового волокна та перліту (1 : 1) в умовах вологої камери.

ІХ. ФУНДУК

1. Для зменшення контамінування донори первинних експлантів вирощують згідно з методикою описаною в другій частині посібника підрозділі

3.1. (Підготовка донорів та початкові роботи з первинними експлантатами)
Важливим правилом для розмноження, як регенерантів з первинних експлантів так і на етапі мультиплікації є живцювання материнських рослин-регенерантів із визрівшими бруньками в пазухах листків. Оптимальними донорами експлантів *in vitro* є 75-95 днів.

2. Для МКР багатьох сортів успішно застосовується комбінація модифікованих живильних середовищ NRM (основне) та DKW (розвантажувальне) представлені в таблиці 29.

Таблиця 29. Уміст мінеральних елементів в модифікованих середовищах NRM та DKW при мікроклональному розмноженні фундука

Компонент	NRM		DKW	
	мг/л робочого розчину	г/л маточного розчину	мг/л робочого розчину	г/л маточного розчину
Макросолі мг/л				
NH ₄ NO ₃	530	21,2	1416	56,64
KNO ₃	550	22,0	-	-
KH ₂ PO ₄	1300	52,0	265	10,60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1650	66,0	740	29,60
K ₂ SO ₄	-	-	1599,0	63,96
Кальцій				
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	700	70,00	1664,4	166,40
CaCl ₂ ·2H ₂ O	90	9,00	112,50	11,25
Хелат заліза				
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	137,6	9,17	137,6	9,17

Мікросолі				
H ₃ BO ₃	6,5	6.5	4,8	4,8
CuSO ₄ x5H ₂ O	2,5	2.5	0,25	0,25
MnSO ₄ xH ₂ O	20,00	20.0	33,5	33,5
NaMoO ₄ x2H ₂ O	0,25	2.5	0,39	0,39
ZnSO ₄ x7H ₂ O	8,6	8.8	-	-
Zn(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	-	-	17	17

Орієнтовне чергування середовищ: NRM-NRM-NRM-DKW-NRM-NRM-NRM-NRM-DKW-NRM... В якості розвантажувального середовища особливо для сортів які схильні до гіпергідратації застосовують середовище NAM (описане для мигдалю в попередньому розділі 8.).

Готові розчини живильного середовища готують із маточних, згідно таблиць 30, 31 в якості вуглеводу використовують глюкозу рН середовища 5,8.

Табл. 30. Об'єми маточних розчинів в готовому розчині середовища, мл/л

Маточний розчин	NRM	DKW
Макросолі (1 : 40)	25	25
Мікросолі (1 : 1000)	1	1
Кальцій (1 : 100)	10	10
Хелат заліза (1 : 100)	15	15

Таблиця 31. Уміст органічних компонентів в модифікованих середовищах NRM та DKW при мікроклональному розмноженні фундука

Вітамін В ₁	1,00
Вітамін В ₆	0,60
Вітамін РР	1,00

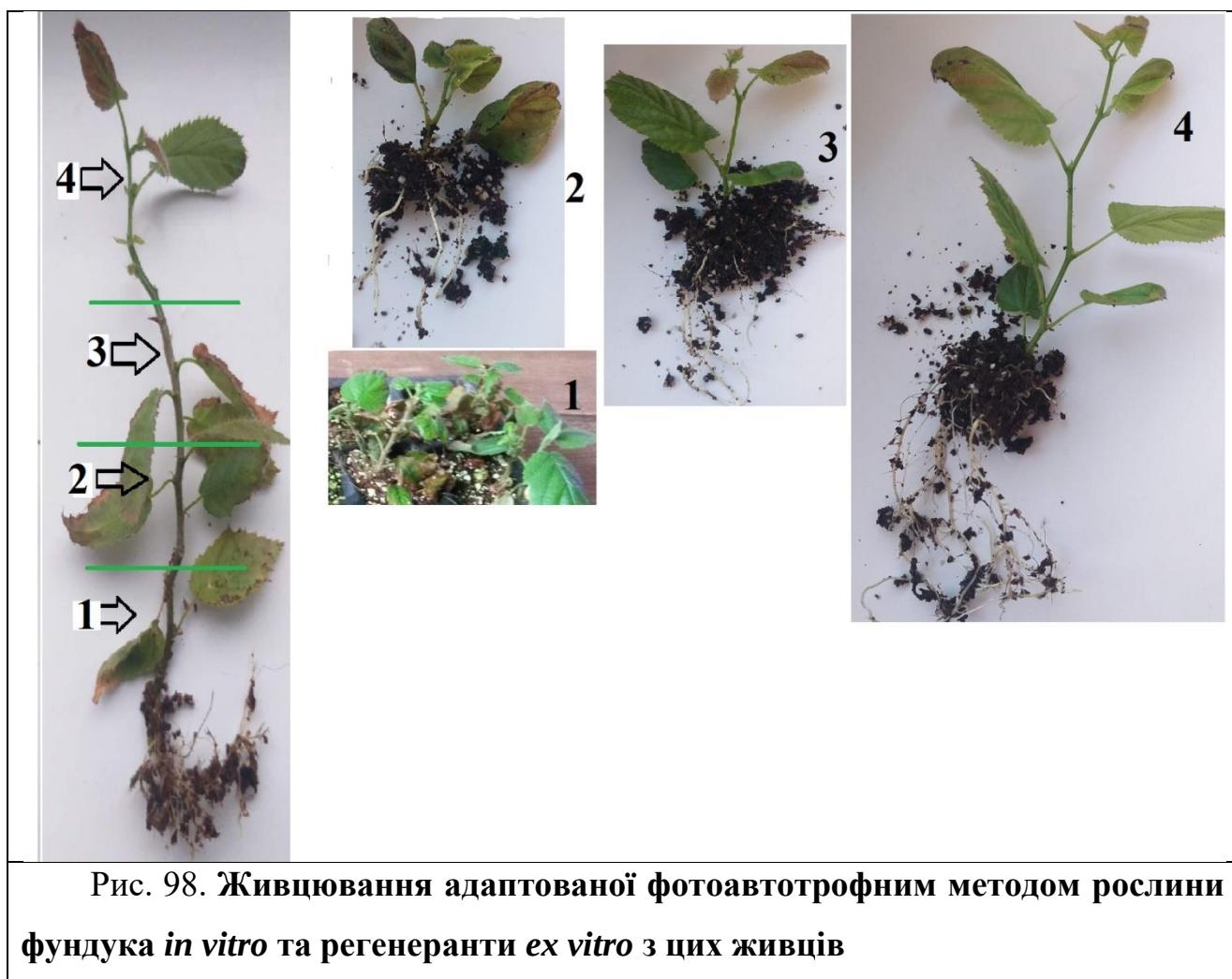
Вітамін С	3,00
Мезо-інозитол	100,00
Гліцин	1,00
Аденін	0,5
Кінетин	1,0
БАП *м/р	0,2/0,1
ІОК *м/р	0,25/1,0
ІМК *м/р	0,25/0,5
Інозитол	0,1 г
Агар	7,0г
Глюкоза	15×10^3

Оптимальною густиною є висадка 5 живців в культуральну ємність загальним об'ємом 200 мл (рис. 97).

	
А. Розміщення 5 регенерантів в культуральній ємності загальним об'ємом 200 мл	В. Регенерант із апікальним домінуванням та розвинутою кореневою системою
Рис. 97. Фундук <i>in vitro</i>	

3. Для коренеутворення (рис. 97.В) в живильному середовищі змінюють співвідношення гормонів згідно правила Скуга-Мілера, а саме: зменшують уміст цитокінінів та збільшують уміст ауксинів як це вказано вище в таблиці 31.

4. Постасептичну адаптацію проводять у звичайних вологих камерах або фотоавтотрофним методом (описаний в підрозділі 6.4. частини першої; та розділі VIII частини два). За цього методу можлива як постасептична адаптація так постасептичне живцювання (рис.98). В якості субстрату використовують суміш кокосових волокон і перліту (1 : 1). Субстрат збагачують мінеральною частиною живильного середовища *NRM*.



Список використаних джерел

1. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2018. 209 с. (монографія).
2. Власенко М. Ю., Вельямінова-Зернова Л. Д., Мацкевич В. В. Фізіологія рослин з основами біотехнології. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2006. 504 с. (підручник).
3. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2010. 135 с. (навчальний посібник).
4. Подгаєцький А. А., Кабанець В. М., Кравченко Н. В., Подгаєцький А. Ан., Мацкевич В. В., Бордун Р. М. Розмноження та оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі. Суми: ПБКФ Видавництво «МакДен», 2019. 164 с. (навчальний посібник).
5. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій). Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2019. 84 с. (науково-практичний посібник).
6. Мацкевич О. В., Філіпова Л. М., Мацкевич В. В., Андрієвський В. В. Павловнія. Біла Церква: Білоцерківський національний аграрний університет, 2019. 80 с. (науково-практичний посібник).
7. Мацкевич В.В., Лященко С.А. Вплив віку вихідних рослин картоплі на ріст та розвиток регенерантів при живцюванні // *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Картоплярство»*. 2006. Вип. 34-35. С. 79-84.
8. Мацкевич Н.О., Пустовіт О.С., Власенко М.Ю. Мацкевич В.В. Особливості індивідуального розвитку картоплі при клональному

- мікророзмножені. // *Вісник Білоцерківського державного аграрного університету*. 2007. Вип. 46. С. 27-31.
9. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Войніцький І.І. Вплив хлорохолінхлориду та термоіндукції на бульбоутворення в рослин картоплі в умовах *in vitro*. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Картоплярство»*. 2007. Вип. 37. С. 33-37.
10. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Хоменко В. В. Особливості бульбоутворення з живців рослин *in vitro* сорту Подольська залежно від компонентів живильного середовища // *Науково-виробничий журнал «Картоплярство України»*. 2009. № 3-4 (16-17). С. 23-27.
11. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Кононенко О.І., Шовкун І.Ю. Індукування бульбоутворення та генезис асимілюючих органів рослин картоплі в асептичних і нативних умовах // *Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. Серія «Агрономія»*. Умань. 2009. Вип. 71. С. 44-50.
12. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Філіпова Л.М. Ефективність тривалого клонального мікророзмноження *Thuja occidentalis* 'Smaragd' залежно від компонентів живильного середовища та стану експлантів. *Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. Серія «Агрономія»*. Умань. 2010. Вип. 74. С. 324-329.
13. Мацкевич В.В., Власенко М.Ю., Філіпова Л.М. Детермінація онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro* новими синтетичними фітогормонами // *Таврійський науковий вісник. Херсонський державний аграрний університет*, Херсон. 2010. Вип 71. Ч. 2. С. 12-18.
14. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Власенко М.Ю., Дульнєв П.Г. Застосування нових синтетичних фітогормонів для детермінації онтогенезу рослин картоплі в умовах *in vitro*. *Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Серія «Агрономія»* Умань. 2011. Вип. 75. Ч. 1. С. 115-121.

15. Мацкевич В.В., Козак Л.А., Л.М. Філіпова Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Astrophytum myriostigma* та *Sclerocactus* sp. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Серія Агробіологія.* Біла Церква. 2012. Вип. 8 (94). С. 115-118.
16. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Стадник А.П. Особливості введення *in vitro* та клонального мікророзмноження *Hosta* // *Агроекологічний журнал.* 2012. Вип. 4. С. 81-88.
17. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Удосконалення технології клонального мікророзмноження *Miscanthus giganteus*. // *Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. Серія «Агрономія».* Умань, 2012. Вип. 80, Ч. 1. С. 129-136.
18. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Особливості регенерації рослин картоплі з живців залежно від субстрату та площі живлення. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Серія Агробіологія.* Біла Церква. 2013. Вип. 10 (100). С. 30 –33.
19. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Дибя Р.Д. Особливості стерилізації експлантів хости. // *Науковий вісник НЛТУ: збірник науково — технічних праць.* Львів: РВВ НЛТУ України. 2013. Вип. 23.5. С. 183-187.
20. Matskevych V., Filipova L., Dyba R. *In vitro* regeneration introduction in dormancy state as a way of post-aseptic adaptation. *Агробіологія.* 2013. № 11 (104) С. 19-23.
21. Філіпова Л., Мацкевич В. Утворення регенерантами фенолподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин. *Вісник Львівського національного аграрного університету. Серія «Агрономія».* 2013. № 17 (2). С. 233-239.
22. Стадник А.П., Філіпова Л.М, Мацкевич В.В. Екологічні особливості трофічної та гормональної детермінації ризогенезу *in vitro* регенерантів хости. *Агроекологічний журнал.* 2014. N 3. С. 75-80.

23. Стадник А.П., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Пасічник Т.В. Деконтамінація та первинне культивування експлантів *Agarantus sp.* *Агроекологічний журнал*. 2015. № 2. С. 106-111.
24. Matskevych V., Filipova L. Using cytokinin sinberries clonal micropropagation. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Серія Агробіологія*. Біла Церква. 2015. № 1 (117). С. 91-95.
25. Matskevych V., Filipova L. Exogenous phytohormones influence on the blackberry (*Rubus Fruticosus* L.) regenerates development and tools of their reduction in postaseptic culture. *Збірник наукових праць Білоцерківського державного аграрного університету. Серія Агробіологія*. Біла Церква. 2015. № 2 (118). С. 133-137.
26. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості використання форми і кількості заліза за вирощування *in vitro* ожини і малини. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Агрономія і біологія*. 2015. - Вип. 9 (30). С. 46-51.
27. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Врублевський А.Т. Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів. *Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Агрономія і біологія*. 2016. Вип. 9(32). С. 156-160.
28. Скрипченко Н.В., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кибенко І.І. Особливості мікроклонального розмноження представників роду *Actinidia*. *Інтродукція рослин: Міжнародний науковий журнал*. 2017. N 1. С. 88-96.
29. Андрієвський В.В., Врублевський А.Т., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Мацкевич О.В. Проблеми мікроклонального розмноження фундука. *Агробіологія*. 1'2019. С. 74-84
30. Мацкевич В. В. Особливості детермінації онтогенезу павловнії *in vitro* синтетичними гормонами. *Науковий журнал Вісник Сумського*

- національного аграрного університету. Серія Агрономія і біологія. 2018. Вип. 9(36). С. 76-82.
31. Мацкевич В. В. Оптимізація введення в культуру *in vitro* кизилу. Науковий журнал Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Агрономія і біологія. 2018. Вип. 3(35). С. 113-118.
32. Filipova L.M., Matskevych V.V., Karpuk L.M., Stadnyk A.P., Andriievsky V.V., Vrublevsky A.T., Krupa N.M., Pavlichenko A.A. Features of Rooting Paulownia *in vitro*. *Egypt.J.Chem.* 2019. 72nd. P.57-63. Журнал індексований у метричній базі Scopus.
33. Мацкевич В.В., Таран О.П. Развитие туи западной (*Thuia occidentalis* L.) в асептической культуре и усовершенствование культуры *ex vitro*. Сборник статей «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Волгоград. 2010. С.235-240.
- 34.. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кравченко Н. В., Гнітецький М.О. Адаптивність рослин на етапі *in vitro-ex vitro*. *East European Science Journal*. 2020. 4 (56). Part 2. P. 25-33.
- 35.Sarwat, B. Ghaderi, S. Keshtgar, M. Seifalian, A. (2010). Semiconductor quantum dots as fluorescent probes for *in vitro* and *in vivo* bio-molecular and cellular imaging. *Nano Rev.*, V. 1, P. 1–15.
36. Monah Ram H.Y. A passion for plant life// *J. Biosci.* 2002. V.27, N 7.
37. Quiroz-Figueroa F.R., Rojas-Herrera R., Galas-Avalos R.M., LoyolaVargas V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiations in plants// *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 2006. V. 86. P. 285-301.
38. Puigderrajols P., Mir G., Molinas M. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.)// *Annals of Botany.* 2001. V. 87. P. 443-462
39. Suprasanna P., Bapat V. Differential gene expression during somatic embryogenesis// *Somatic embryogenesis/ Mujib A., Samaj J. – SpringerVerlag Berlin Heidelberg, 2005.*

40. Fehe'r A., Pasternak T.P., Dudits D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state// Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. V. 74. P. 201-228.
41. Plant Propagation by Tissue Culture/ George E.F. et. al. – Springer, 2008. 401 p.
42. Williams E.G., Maneswaran G. Somatic embryogenesis: factor influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group// Annals of Botany. 1986. V.57. P. 443-462.
43. Murashige, T. Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plantarum.*, V. 15, P. 473–497.
44. Matskevych V., Yukhnovskyi V., Kimeichuk I., Matskevych O, Shyta O. (2022). Peculiarities of determining the morphogenesis of plants *Corylus avellana* L. and *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. in vitro culture. *Folia Forestalia Polonica, Series A - Forestry*. Vol. 65(1). p. 1-14

Навчальний посібник

Колектив авторів:

Мацкевич В.В. д.с.-г.н. - доцент кафедри лісового господарства Білоцерківського національного аграрного університету,

Кравченко Н.В. д.с.-г.н. - професор кафедри біотехнології та фітофармакології Сумського національного аграрного університету

Подгасцький А.А., д.с.-г.н. - професор кафедри біотехнології та фітофармакології Сумського національного аграрного університету

Мацкевич О.В. - магістр Національного університету біоресурсів і природокористування

Шита О.П., здобувач (Phd) Білоцерківського національного аграрного університету

Гнітецький М.О., доктор Phd, старший викладач кафедри біотехнології та фіто фармакології Сумського національного аграрного університету.

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

Навчально-методичний посібник

Відповідальний за випуск:

Гнітецький М.О. доктор Phd, старший викладач кафедри біотехнології та фітофармакології СНАУ.

Видавець:

Редакційно-видавничий відділ Сумського національного аграрного університету, м. Суми, вул. Г. Кондратьєва 160.

Підп. до друку: 25.082023. Формат 60x84x16. Гарнітура Times New Roman
Тираж: 300 пр.. Ум. друк. арк.10,16 Обл.-вид.арк. 11.84. Зам. № 1

Виготовлювач:

ВВП “Мрія”. Суми, Кузнечна, 2
Тел. 679-215, 23-13-23. Вид.№ 20.