

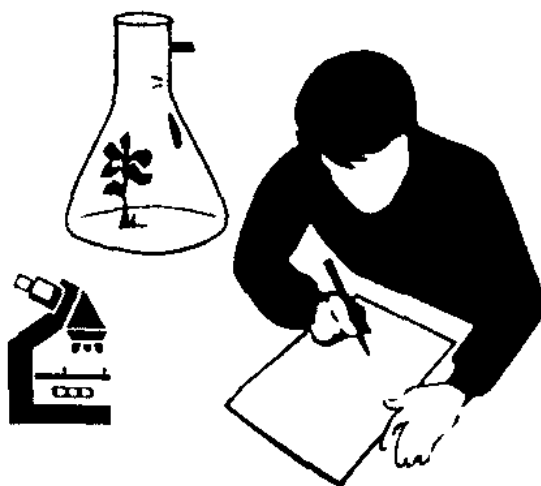
**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА**

Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол

**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ
РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ**

Методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни
«Основи біотехнології в рослинництві»
зі спеціальностей 201 «Агрономія», 202 „Захист і карантин рослин”,
203 „Садівництво та виноградарство ” вищих аграрних закладів освіти
III–IV рівнів акредитації



Умань 2019

УДК 575:378.001.12

Рецензенти: доктор сільськогосподарських наук С. П. Полторецький;
доктор сільськогосподарських наук, професор О. І. Улянич
(Уманський національний університет садівництва)

Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ

Методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни «Основи біотехнології в рослинництві» зі спеціальностей 201 «Агрономія», 202 „Захист і карантин рослин”, 203 „Садівництво та виноградарство” вищих аграрних закладів освіти III–IV рівнів акредитації. Умань: УНУС, 2019. 16 с.

Рекомендовано до видання: кафедрою генетики, селекції рослин та біотехнології (протокол засідання кафедри № 5 від 15.01. 2019 року) та методичною комісією факультету агрономії Уманського НУС (протокол засідання № 5 від 21.02. 2019 року)

ВСТУП

Основним питанням за використання методів ізольованої культури тканин є стан генетичної інформації рослинного матеріалу, що вирощується в контрольованих умовах *in vitro*.

Контролюючи фізико-хімічні параметри вирощування біоб'єктів, можна забезпечити з одного боку збереження генетичної інформації клітини при звільненні її від впливу материнського організму і перенесенні в культуральні умови, з іншого боку не виключається можливість мутагенного впливу на клітину в умовах *in vitro* окремих чинників, якими можуть бути компоненти живильного середовища та інші експериментальні умови вирощування, що призводять до зміни генотипу рослинного матеріалу.

Клональне мікророзмноження рослин використовується, коли ставиться завдання отримання генетично ідентичного біоматеріалу.

Мікроклональне розмноження – це масове (вегетативне) розмноження рослин в стерильних умовах *in vitro* при забезпеченні оптимального фізико-хімічного балансу, що виключає появу генетично змінених форм.

Культура ізольованих меристем широко використовується для вирішення таких практичних питань, як розмноження рослин, отримання безвірусних зразків та створення банку генетичного матеріалу.

Біологічна суть цього методу базується на регенераційній здатності тотипотентних рослинних клітин.

1. Етапи мікроклонального розмноження рослин

Технологія мікроклонального розмноження рослин складається з п'яти основних етапів:

1. Відбір експлантів та введення їх в культуру *in vitro*.
2. Активація розвитку меристем з експланту.
3. Розмноження рослинного матеріалу до необхідних об'ємів.
4. Укорінення рослин.
5. Адаптація біоматеріалу та перенесення одержаних рослин із стерильних умов *in vitro* в ґрунтові природні умови вирощування.

2. Підбір експлантів та введення їх в культуру *in vitro*

Для успішного проведення робіт з мікроклонального розмноження рослин вибір експлантів відіграє першочергове значення. Найкраще використовувати матеріал, вилучений із здорових (неінфікованих) сильних рослин, що мали оптимальні умови вирощування (площа живлення, забезпечення NPK, полив тощо).

Вибір експлантів залежить від виду біоматеріалу, фази розвитку рослини-донора, сезону року.

Незрілі молоді органи завжди більш пластичніше з точки зору здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж старіючі, зрілі тканини. За відбору експлантів слід віддавати перевагу меристематичним тканинам, оскільки вони швидко пристосовуються до умов ізолюваної культури, мають високу інтенсивність наростання і тотипотентність.

Розмір експланту залежить від виду біоматеріалу і коливається в межах від 0,1мм до 1,0 см.

Апікальну меристему – конус наростання клітин, що активно діляться висотою 0,1мм і шириною 0,25мм важко відділити без ушкоджень та індукувати

до росту. Тому часто відділяють власне меристему і один або два листових примордія. Крупніші за розміром експланти краще виживають і швидше збільшують масу рослинного матеріалу в культурі *in vitro*.

Не рекомендується виділяти меристеми для мікроклонального розмноження з квітконосних пагонів.

Перед виділенням меристем та введенням їх в ізольовану культуру верхівки пагонів стерилізують визначеними стерилізаторами, що є ефективними для конкретного біовиду та типу тканин.

Вичленування меристем проводять у стерильному ламінар-боксі за використання біокулярного мікроскопу зі збільшенням в 20-40 разів.

Для виділення меристем використовують такі інструменти як препаративні голки, леза, пінцети з тонким кінчиком тощо.

Техніка виділення меристеми

Притримуючи верхівку пагонів на столику мікроскопа пінцетом однією рукою, другою рукою беруть голку і легким натисканням відділяють прилягаючі до меристеми листочки та листові примордії, або меристему разом з одним-двома листовими примордіями вичленовують лезом. Для цього роблять під прямим кутом чотири надрізи у основи меристеми.

Виділений експлант поміщають у культуральну пробірку на поверхню живильного середовища та переносять у контрольовані умови вирощування.

3. Активація розвитку меристем з експланту

Щоб активізувати розвиток апікальної меристеми з експланту, необхідно створити фізико-хімічний баланс умов, які були б оптимальними для біовиду, з яким працюють.

Для успішного органогенезу меристем важливо підібрати оптимальний склад основного живильного середовища та сприятливий баланс

екзогенних регуляторів росту у відповідності з типом тканин біоматеріалу (цитокінінової, ауксинової, цитокініно-ауксинової природи).

Живильне сере/ювище для введення меристем збагачують на 15 % вищими концентраціями регуляторів росту, ніж базові живильні субстрати на розмноження. Це стимулює розвиток початкового наростання рослинного матеріалу в ізольованій культурі та сприяє подоланню незначної інгібуючої дії антибіотиків, що вводять до живильного середовища з метою звільнення від грибоксо-бактеріальних інфекцій меристем на початковому етапі їх розвитку.

Висаджені на живильне середовище матеріали розміщують у культуральних кімнатах і забезпечують оптимальними фізичними умовами вирощування:

температурний режим 22–26 °С;

відносна вологість 75–80 %;

16-ти годинний фотоперіод за інтенсивності освітлення 3–5 кілолюкс.

Спочатку іде розвиток експланту. Він швидко збільшується в розмірах, іноді змінюючи свій колір. Згодом у пазухах листочків починають закладатися бруньки. Після 20–30 діб (що залежить від біотиду, генотипу, живильного субстрату) утворені пагони звільняють від вихідних тканин і переносять на середовище для розмноження. Іноді регенерація бруньок з'являється тільки після повторної пересадки експлантів.

4. Розмноження рослинного матеріалу

Збільшення кількості рослинного матеріалу досягається черенкуванням (клонуванням) отриманих з меристем рослинокю.

За мікроклональному розмноження розрізняють два типи клонування: вертикальне та горизонтальне. Тип залежить від орієнтації розвитку і наростання біоматеріалу та закладення вегетативних бруньок.

Вертикальний тип клонування характерний для тканин ауксинової природи (картопля, спаржа, гвоздика).

Для цього типу тканин у ростове живильне середовище додатково вводять високі концентрації ауксинів, що стимулюють розвиток апікальної меристеми і пригнічують формування бокових пагонів. Матеріал швидко наростає, формуючи одне центральне стебло з листочками.

У фазі 7–10 листків рослина здатна до клонування. Її виймають з пробірки і гострим скальпелем ділять на клони. Кожен клон має частину стебла з одним листочком. Проклонований матеріал висаджують на свіже (оновлене) ростове живильне середовище, що стимулюватиме розвиток бокової бруньки, яка знаходиться між стеблом і черенком листка.

Такий тип клонування дозволяє отримати з однієї рослини 7–10 клонів.

Горизонтальний тип клонування характерний для тканин цитокінінової природи (буряк цукровий, цикорій, суниця тощо). Для розвитку та розмноження такі рослини потребують введення до живильного субстрату високих концентрацій цитокінінів (6-бензиламінопурин, кінетин).

Цитокініни пригнічують апікальне домінування і стимулюють закладання та розвиток адвентивних (бокових) бруньок.

Висока брунькоутворююча здатність рослин під впливом цих регуляторів росту дає змогу з однієї рослини отримати 15–35 клонів. Кожен клон має апікальну меристему і вільно відокремлюється від загальної колонії.

За перенесення клону на свіже живильне середовище спостерігається масове закладання і наростання бруньок в пазухах листків

Висаджені на ростове середовище рослини вирощують у контрольованих умовах культуральної кімнати.

Періодично оновлюючи живильний субстрат рослинний матеріал розмножують до необхідних об'ємів.

5. Укорінення рослин

Після отримання необхідної (запрограмованої) кількості клонів, їх переносять на середовище для укорінення та отримання повноцінних рослин. Основними індукторами коренеутворення є ауксини.

Для формування коренів пагони розділяють і висаджують на живильне середовище для ризогенезу, що містить підвищені концентрації регуляторів росту ауксинивої природи. Це основне правило коренеформування *in vitro*.

Під впливом ауксинів (нафтилоцтова кислота, гетероауксин) стимулюється поділ клітин паренхіми пагона, що призводить до диференціації клітин у базальній частині клону та утворення корневих зачатків.

Найкраще укорінюються клони, висота яких перевищує 7 мм.

Щоб пагони краще укорінювались, в останнє живильне середовище для розмноження додають вищі концентрації гіберелінової кислоти (для видовження пагона) та зменшують або повністю виключають (що залежить від біовиду) вміст цитокінінів.

Через 15–25 діб після висадки рослин на середовище для ризогенезу формується добре розвинена коренева система і рослинний матеріал готовий для адаптації та перенесення в природні умови вирощування.

Тканини ауксинової природи можуть формувати корені на ростовому середовищі. Цей процес стимулюється фітогормонами, що продукуються самою рослиною в культурі. Це скорочує період клонального мікророзмноження та зменшує економічні затрати на укорінення рослинних матеріалів.

Інтенсивність ризогенезу рослин *in vitro* залежить від періоду їх культивування (клонування) до укорінення. Зі збільшенням кількості пасажів процес укорінення рослин ауксинової природи активізується і скорочується термін утворення коренів біоматеріалу, а тканин цитокінінової природи – ускладнюється.

6. Адаптація культурального матеріалу та перенесення рослин у ґрунтові умови вирощування

Перенесення рослинного матеріалу з контрольованих умов *in vitro* в умови *ex vitro* важливий, складний і найтрудомісткіший заключний етап мікроклонального розмноження.

Найдоцільнішим для пересаджування є період, коли у рослин добре розростається коренева система для поглинання мінеральних елементів з ґрунту, а молоді листочки здатні до продуктивного фотосинтезу.

За перенесення рослин з оптимальних культуральних умов вирощування у природні умови необхідно провести їх акліматизацію і адаптацію матеріалу до нотальних умов температурного режиму, освітлення та вологості.

Відомо два способи адаптації:

- адаптація пробірочних рослин у біотехнологічній лабораторії;
- проміжне укорінення рослин за використання фітотронів (теплиці).

Перший спосіб передбачає використання адаптаційних кімнат, оснащених за типом культуральних приміщень, де поступово оптимальні умови вирощування рослин підводяться до природних умов, куди буде пересаджуватись матеріал.

Рослини після адаптації з пробірок переносять безпосередньо в ґрунтові природні умови під плівку.

Спосіб проміжного укорінення передбачає перенесення пробірочних рослин в ящики чи горщечки та культивування матеріалу в тепличному комплексі з контрольованими параметрами мікроклімату.

Субстратом можна використовувати суміш перліту і піску до якого перед висадкою рослин вносять необхідні елементи живлення. На три частини перліту і одну частину піску доцільно вносити в діючій речовині 1–2 г азоту, 2 г фосфору і 2 г калію.

Для дорощування рослин також можна використовувати легку з доброю

повітряною проникністю і водоутримуючою здатністю суміш: 2 частини ґрунту, 1 частина торфу і 1 частина перегною. Для підвищення приживання рослин на поверхню суміші насипають шар перліту товщиною 2–3 см. Висота поживного субстрату повинна бути не меншою 7–10 см, а площа живлення рослин не меншою аніж 5x5 см.

Субстрат змочують поживним розчином, до якого вводять регулятори росту, що стимулюють ризогенез.

Температуру в фітотроні доцільно підтримувати у межах 20–25°C, вологість – 70–80 %, тривалість світлового періоду не менше 14 годин на добу. Висаджені в субстрат рослини накривають плівкою.

Висаджування рослин у ґрунтову суміш проводять вручну. В субстраті роблять невелике заглиблення, розміщують у ньому вертикально коріння клонів, старанно ущільнюють субстрат навколо рослини, потім їх поливають і накривають посудини плівкою чи склом.

Через 7–10 діб, після того, як рослини приживуться і почнуть рости, необхідно провести їх загартування. Спочатку знімають плівку (скло) на 10–15 хвилин на добу, згодом час загартування подовжують до 1–2 годин. Після 4–6 діб плівку можна зняти зовсім.

Через 30–50 діб адаптації рослини утворюють інтенсивно розвинену надземну і міцну галужену кореневу системи. Такі рослини придатні для пересадки в польові умови вирощування.

Рослинний матеріал на початковому етапі росту може мати незначні морфологічні зміни листкового апарату та стебла, проте до кінця вегетації рослини набувають типового вигляду, що є характерним для рослини-донору вихідного експланту.

Обов'язкову ідентифікацію біоматеріалу проводять за допомогою цитологічного методу досліджень.

Схеми мікроклонального розмноження рослин подано на рисунках 1, 2.

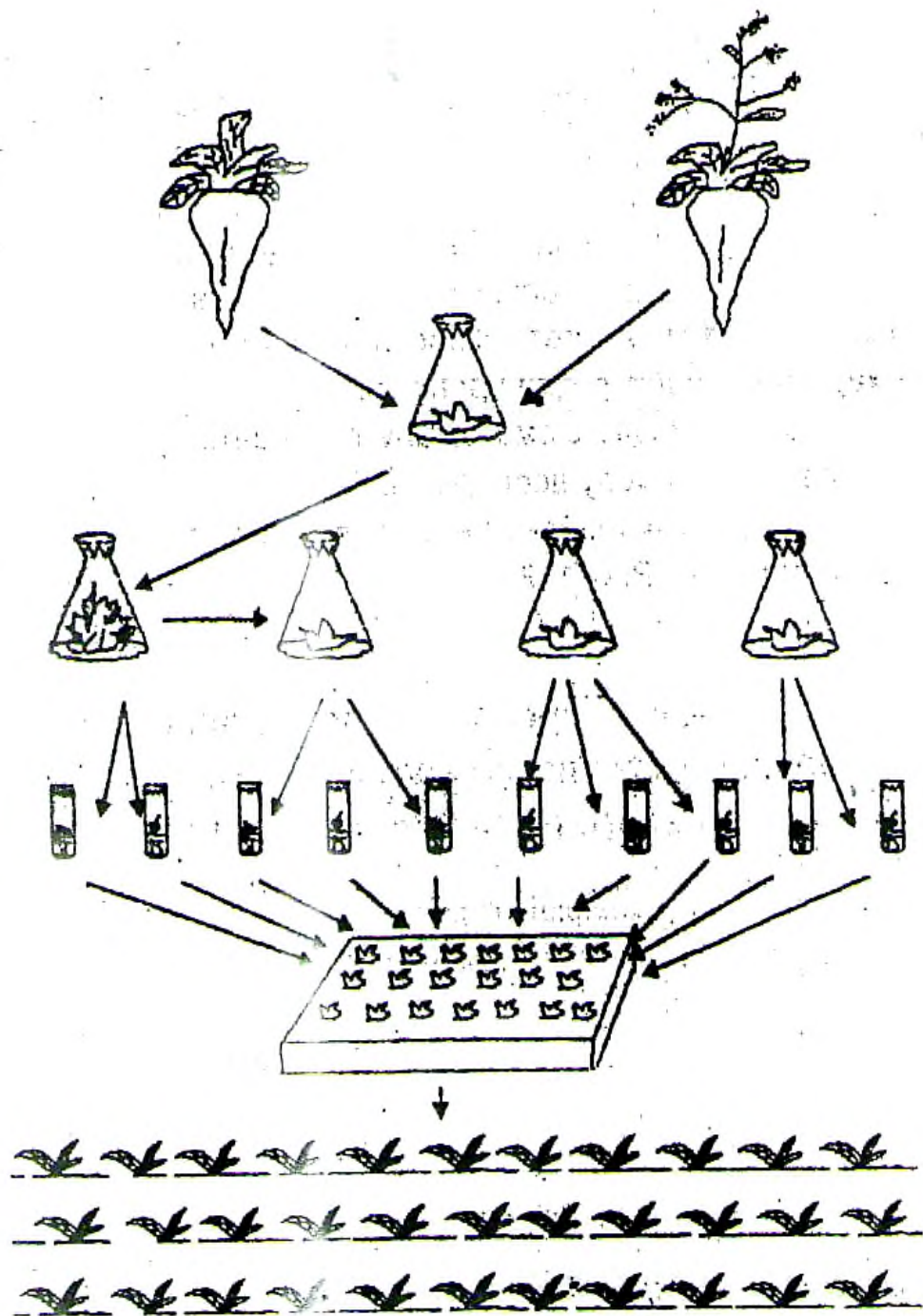


Рис. 1. Схема мікроклонального розмноження рослин буряку

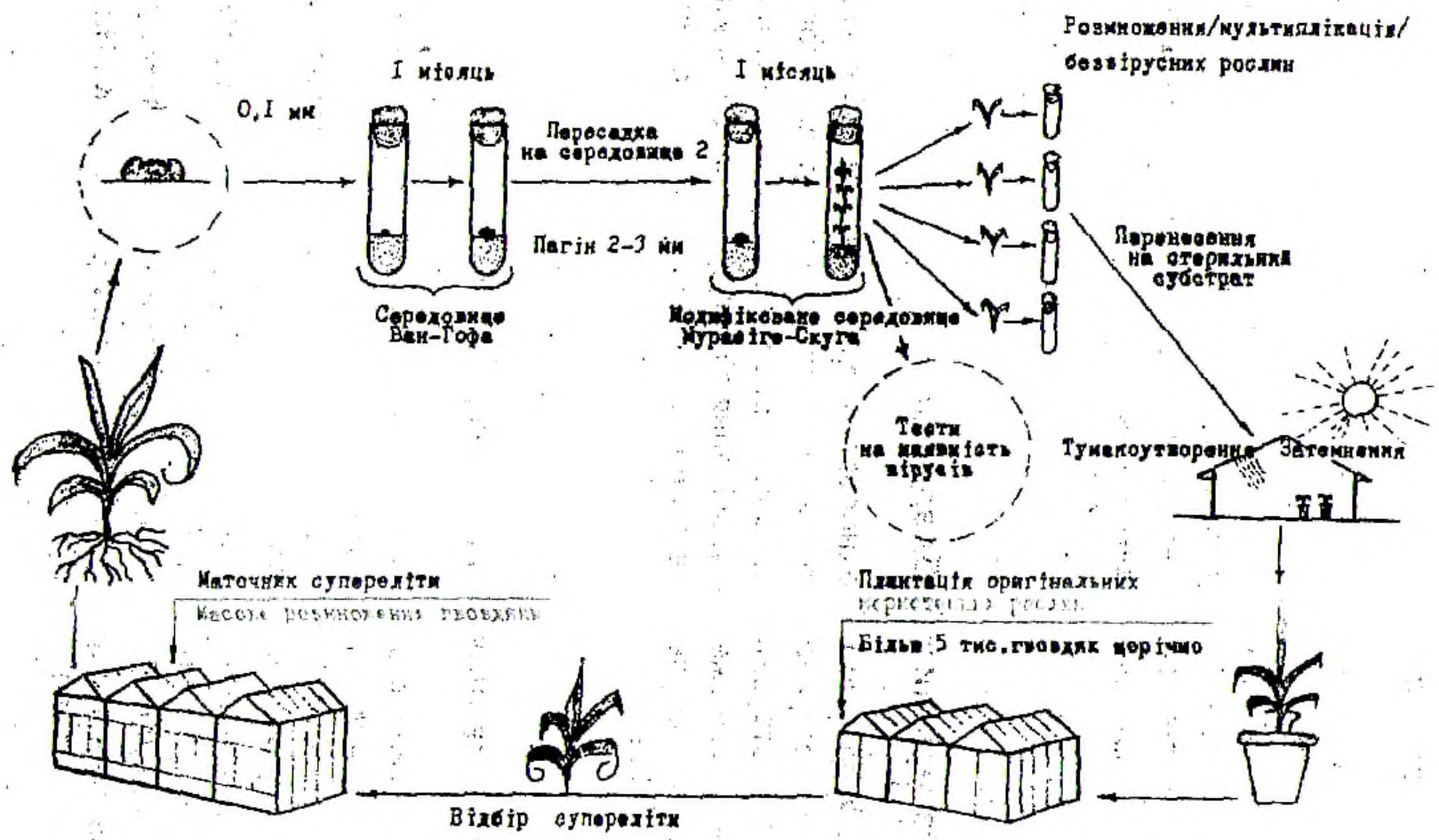


Рис. 2.

7. Основні переваги мікроклонального розмноження перед традиційними методами вегетативного розмноження рослин

- 1). Високий коефіцієнт розмноження зразків.
- 2). Можливість розмноження цінного генетичного матеріалу протягом року незалежно від погодних умов календарного року.
- 3). Одержання безвірусного оздоровленого садивного матеріалу.
- 4). Створення "банку" неінфікованого цінного селекційного матеріалу.
- 5). Можливість широкого обміну рослинним матеріалом між регіонами і країнами.

Завдання

1. Вивчення методики мікроклонального розмноження рослин.
2. Ознайомлення з основними етапами клонального мікророзмноження біоматеріалу.
3. Провести розмноження рослин з горизонтальним та вертикальним типом клонування.

Матеріали та обладнання

Лабораторія біотехнології: обладнання культуральної кімнати, операційної (ламікар-бокс); пінцети, скальпелі, голки, леза, фільтрувальний папір; середовище в колбочках для проведення розмноження та укорінення біоматеріалу; рослинний матеріал для введення в стерильну культуру; матеріал для клонування.

Рекомендована література

Базова

1. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Підручник. Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. 520с.
2. Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 272с.
3. Ніколайчук С. І., Горбатенко І. Ю. Генетична інженерія. Ужгород, 1999. 101с.
4. Бутенко Р. Г. Биология культивируемых клеток и биотехнологии растений. Москва: Наука, 1991. 236 с.

Допоміжна

1. Биотехнология растений: культура клеток. Под ред. Р. Г. Бутенко. Москва: Агропромиздат, 1989. 284 с.
2. Уотсон Дж., Туз Дж., Куртц Д. Рекомбинантные ДНК. Москва: Мир, 1989. 159 с.
3. Экспериментальная полиплоидия у культурных растений. Москва: Изд-во Наукова думка, 1974. 192с.
4. Гаплоидия и селекция. Хохлов С. С., Тырнов В. С. Гришина Е. В. и др. Москва: Наука, 1976. 221 с.
5. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений, 1988. 210 с.
6. Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. И., Прокофьева М. И. Основы химической сельскохозйственной биотехнологии. Москва: Наука, 1990. 258 с.
7. Муромцев Г. С., Чкаников Д. И., Кулаева О. Н., Гамбург К. З. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. Москва: Агропромиздат, 1987. 234 с.
8. Никелл Дж. Регуляторы роста растений. М.: Колос, 1984. 287 с.
9. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка, 1984. 159с.
10. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.
11. Шевелуха В. С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология: состояние и перспективы развития. Москва: ВНИЦ, 1989. 254 с.

Підписано до друку 26.02.2019 р. формат 60x90/20
Обсяг 1,2 умов. друк. арк. Наклад 100 прим.
Замовлення № 112.

Редакційно-видавничий центр Уманський НУС.
Свідоцтво КВ № 17791-6641 ПР від 17.03.2011р.
20305, м. Умань, вул. Інституцька ,1
тел. 8(04744) 4-69

