

ДВНЗ «УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
Біологічний факультет

Лабораторний практикум з біотехнології.
Методичні рекомендації до лабораторних
робіт з циклу «Розмноження рослин *in vitro*»



для студентів біологічного факультету
денної та заочної форми навчання

Ужгород – 2023

Лабораторний практикум з біотехнології. Методичні рекомендації до лабораторних робіт з циклу «Розмноження рослин *in vitro*» для студентів біологічного факультету денної та заочної форми навчання/ упорядники Колесник А.В., Сікура А.О., Гедзур Т.І. – Ужгород, 2023. – 30 с.

Пропонований посібник присвячений питанням технології розмноження рослин в культурі *in vitro*. Містить методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт, які відповідають програмі нормативної дисципліни ОК 33 «Біотехнологія» та вибіркової дисципліни ВК 1 «Основи мікроклонального розмноження» для студентів біологічного факультету ДВНЗ «УжНУ». Метою посібника є ознайомлення студентів з темою та змістом лабораторних занять із циклу «Розмноження рослин *in vitro*», описом основних методів досліджень, набуття практичних навичок лабораторної роботи та кращого засвоєння теоретичного матеріалу, отриманого на лекціях та під час самостійної підготовки.

Рецензенти:

**доц. каф. плодовоовочівництва і виноградарства біологічного факультету ДВНЗ «УжНУ», к.б.н., доц. Н.П. Садовська
Національний парк «Синевір», к.б.н. Тях Ю.Ю.**

Рекомендовано:

**Рішенням кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології:
протокол № 11 від «11» червня 2023 року.**

**Рішенням Методичної комісії біологічного факультету ДВНЗ «УжНУ»:
Протокол №.5 від «26» червня 2023 року.**

ЗМІСТ

Передмова	4
Техніка безпеки роботи в лабораторії	6
Основні етапи мікроклонального розмноження	9
Стерилізація приміщення та обладнання	11
Приготування маточних розчинів та живильних середовищ для культивування	12
Відбір вихідного матеріалу для введення в культуру тканин	17
Стерилізація рослинного матеріалу	18
Субкультивування асептичних рослин	23
Індукція ризогенезу	25
Перенесення мікроживців у ґрунт та їх постасептична адаптація	26
Використана література	29
Додатки	31

ПЕРЕДМОВА

Біотехнологія – наука, що вивчає можливості використання живих організмів, систем або продуктів їх життєдіяльності для вирішення різноманітних завдань народного господарства, а також можливості створення живих організмів із заданими властивостями методами генетичної інженерії.

Сучасна біотехнологія – як наука та галузь виробництва розвивається в трьох головних векторах:

- Молекулярна біологія та генетична інженерія;
- Мікробіологія та мікробіологічне виробництво;
- Культура клітин і тканин *in vitro*.

Стосовно рослинних об'єктів, то дослідження традиційно охоплюють наступні напрямки:

1. Біотехнологія мікроклонального розмноження рослин.
2. Біотехнологія виробництва культури клітин, тканин і органів рослин.
3. Генетична інженерія.
4. Банк *in vitro* та кріоконсервація, їх значення для збереження генофонду рослин .

Біотехнологія мікроклонального розмноження рослин

Під терміном «мікроклональне розмноження» розуміють масове нестатеве розмноження рослин *in vitro*, при якому нові рослини генетично ідентичні вихідним. В основі методу лежить унікальна властивість рослинної клітини до клонування – здатності реалізовувати властиву їй тотипотентність. У відповідності з науковою термінологією клонування – це отримання ідентичних організмів з ідентичних клітин. Цей метод має ряд переваг перед існуючими традиційними способами розмноження:

- отримання генетично однорідного посадкового матеріалу;

- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемних культур;
- високий коефіцієнт розмноження;
- скорочення загальної тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільних до генеративних фаз онтогенезу;
- розмноження рослин з низькою природною репродуктивною здатністю;
- можливість проведення робіт як під час вегетаційного періоду, так і протягом всього року.

Програмні результати курсу

В ході виконання циклу лабораторних робіт з дисципліни студент повинен оформити результати досліджень у вигляді есе. Для цього кожен обирає згідно з власними вподобаннями, науковою доцільністю та технічною можливістю об'єкт дослідження і, згідно з методичними рекомендаціями, проводить увесь цикл робіт із введення обраного об'єкту досліджень в культуру *in vitro*.

Основні вимоги до написання есе:

1. Обсяг до 20 сторінок (в електронному або паперовому форматі).
2. Оформлення есе згідно вимог до оформлення курсових та дипломних робіт.
3. Основні розділи: «Вступ та актуальність дослідження», «Результати дослідження», «Практичне використання результатів дослідження», «Висновки», «Список використаної літератури».
4. Робота повинна бути ілюстрована власними світлинами, цифрові результати опрацьовані варіаційно-статистичними методами.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ

Перед лабораторним практикумом необхідно обов'язково ознайомитися з основними правилами безпеки роботи в біотехнологічній лабораторії та отримати уявлення про призначення, принцип дії базового обладнання лабораторії та методи підготовки посуду та інструментів для подальшого використання.

Техніку безпеки роботи в біотехнологічній лабораторії наведено згідно з «Інструкцією з техніки безпеки для працюючих в лабораторії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України»:

1. Слідкувати, щоб лабораторний посуд з розчином будь-якої речовини мав чіткий напис спеціальним олівцем для скла.
2. Не кидати шматки побитого посуду в раковину.
3. Не залишати пустий посуд немитим.
4. Не класти скляний посуд у шухляди разом з металевими предметами.
5. Не пробувати хімічні речовини на смак.
6. Не визначати хімічні речовини за запахом.
7. Тримати робочий стіл чистим (все, що пролите, розсипане або розбите має бути негайно прибрано).
8. Не захарашувати робочий стіл посудом, банками з реактивами та іншими речами.
9. Не класти на робочий стіл їжу.
10. Не розігрівати в лабораторному посуді чай.
11. Не приймати їжу та напої у приміщенні лабораторної кімнати.
12. Роботу із хімічними речовинами, які мають характерний неприємний запах, слід проводити у витяжній шафі.
13. Під час роботи з реактивами у витяжній шафі не вводити голову всередину шафи.
14. Відпрацьовані речовини, що різко пахнуть, виливати у ті раковини, над котрими є витяжна шафа.

15. Не працювати в приміщенні лабораторії наодинці.

16. Не захарашувати проходи, виходи, підходи до протипожежного інвентарю.

17. Під час переливання кислот, лугів та інших небезпечних рідин, а також під час подрібнення твердих речовин вручну здійснювати роботу в захисних окулярах з оправою, яка щільно прилягає до обличчя.

18. Не вносити шпаристі порошкові тіла (пемза, активне вугілля) в рідини, що нагріті до температури більше $+100\text{ }^{\circ}\text{C}$ – для запобігання бурхливого закипання і викидання гарячої суміші.

19. У випадку припинення дії вентиляції всі роботи, пов'язані з виділенням шкідливих речовин, газів і парів, негайно припинити.

20. Виходячи з лабораторії, не залишати увімкненими нагрівальні прилади, пальники, що горять.

21. Відпрацьовані кислоти, луги не можна зливати в одну посудину, бо у цьому разі відбувається нейтралізація, яка супроводжується розігрівом і сильним випаровуванням. Для кислот, лугів треба мати окремі скляні або глиняні банки, після роботи необхідно здійснювати нейтралізацію, і вміст банок виливати у спеціальні ями або каналізацію через раковину, промиваючи її потім не менш як 10-кратною кількістю води.

22. Роботи, пов'язані із застосуванням отруйних рідин, також треба проводити під витяжкою, при цьому працювати в гумових рукавичках, а після роботи, не знімаючи рукавичок, треба добре промити їх водою з милом і тільки після цього зняти. Знявши рукавички, треба ретельно вимити руки.

23. Слід стерегтися потрапляння хімічних речовин на одяг. У випадку пролиття рідин на одяг, його треба негайно зняти, обполоскати в мийці лабораторії.

24. Якщо рідина потрапила на тіло, то ці місця необхідно ретельно вимити і нейтралізувати місця потрапляння слабкими розчинами кислоти або лугу (залежно від рН рідини, що потрапила), які знаходяться на полиці біля мийки. Залишати робоче місце в змоченому сторонніми речовинами одязі заборонено.

25. У випадку проливання отруйної рідини на підлогу, потрібно негайно повідомити про це викладачу.

26. Під час роботи в лабораторіях необхідно пам'ятати про можливість утворення вибухонебезпечних сумішей парів газів і пилу з повітрям.

27. У приміщеннях лабораторій необхідно дотримуватись правил протипожежної безпеки.

28. Для надання першої допомоги у разі нещасного випадку необхідно скористатися медикаментами та перев'язувальними засобами, які знаходяться в аптечці.

ОСНОВНІ ЕТАПИ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ

Процес мікроклонального розмноження складається з чотирьох основних етапів:

1. Ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*. Цей етап передбачає вибір рослин культиварів, оптимальних типів первинних експлантів (рис.1), підбір режиму їх стерилізації;

2. Власне мікророзмноження. На цьому етапі необхідно підібрати оптимальні живильні середовища для різних типів росту й розвитку експлантів в культурі *in vitro*.

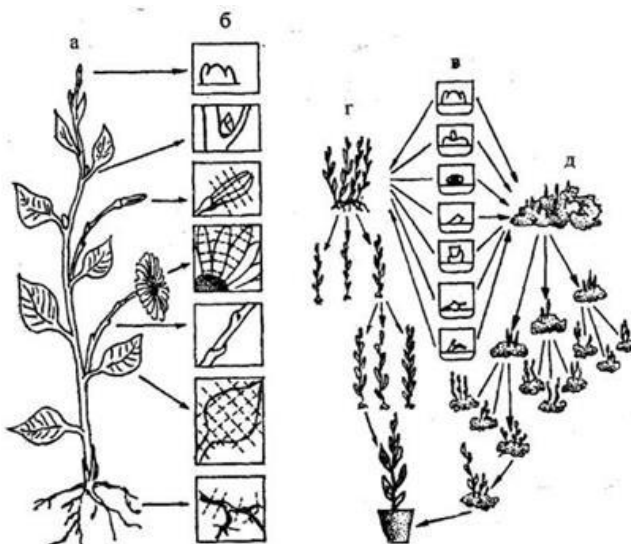


Рис. 1. Схема мікроклонального розмноження рослин:

- а - вихідна рослина;
- б - різні типи експлантів, які використовуються для мікророзмноження;
- в - ті самі експлантати в культурі *in vitro*;
- г - пряма регенерація рослин з існуючих в ізольованих експлантах меристем або з меристем які утворюються з диференційованих клітин (наприклад, епідермісу) без виникнення калюсу;
- д - регенерація рослин з калюсу шляхом органогенезу.

3. Укорінення мікропагонів. Етап передбачає підбір оптимального складу живильних середовищ для отримання біполярних рослин;

4. Адаптація мікророслин до умов *in vivo*. Розробка схеми переведення рослин із асептичних умов до септичних. Їх подальша постасептична адаптація.

Морфогенез ізольованих меристем у культурі *in vitro* і подальше мікророзмноження може бути реалізоване двома шляхами (рис.2):

1) регенерацією пагонів нормальних пропорцій з наступним їх поділом на "однобрунькові" мікроживці, які використовуються як вторинні експланти для повторного циклу розмноження;

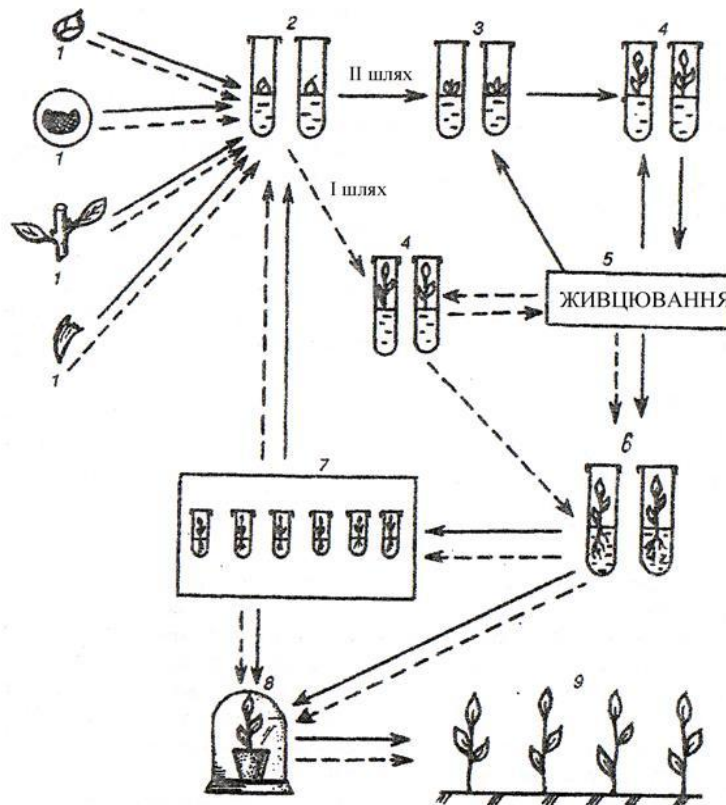


Рис. 2. Схема мікроклонального розмноження:

1 – відбір вихідного експланту; 2 – отримання стерильної культури; 3 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експланті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (живцювання); 6 – укорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при пониженій температурі; 8 – адаптація рослин-регенерантів до субстрату і умов закритого ґрунту; 9 – адаптація рослин до умов відкритого ґрунту.

2) стимуляцією розвитку всіх пазушних бруньок і меристематичних бугорків у результаті пригнічення апікального домінування первинного пагона.

Регенеранти мають вигляд пучків пагонів, кожен з яких може бути рекультивованим з аналогічним результатом.

СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПРИМІЩЕННЯ ТА ОБЛАДНАННЯ

Лабораторний посуд, що використовується для приготування, зберігання живильних середовищ, вирощування рослинного матеріалу і маніпуляцій з ним, піддається старанній очистці і стерилізації. Чисто вимитий стерильний посуд є обов'язковою умовою успішного культивування рослинних тканин.

Посуд попередньо замочують у розчині 0,3 % перекису водню, потім миють розчином детергенту (рідини для миття посуду, прального порошку, тощо) з подальшим ополіскуванням проточною водою, дистиллятом і бідистиллятом.

Перед використанням сухий посуд прожарюють у сухожаровій шафі за температури +160 °С протягом 2 год (з моменту встановлення потрібної температури). При такій стерилізації гинуть не тільки бактерії, але й їх спори.

Попередня стерилізація інструментів (скальпелів, пінцетів, голок і т. ін.) полягає в нагріванні сухим жаром у сушильній шафі протягом 2 год. за температури +140 °С. Металеві предмети не можна автоклаувати: під дією водяної пари вони іржавіють і затуплюються, що унеможлиблює їхнє подальше використання.

Перед початком і під час роботи інструменти ще раз стерилізують в ламінарному боксі, занурюючи їх у склянку з 96 %-м етиловим спиртом і обпалюючи в полум'ї спиртівки або витримують у стерилізаторі. Стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів маніпуляції повторюють.

Стерилізація ламінарної кімнати. Стерилізація ламінарної кімнати є обов'язковим процесом, в результаті якого повинні бути усунені джерела можливої інфекції рослинних культур – бактерії, гриби, тощо. Стерилізація складається з двох етапів. На першому етапі приміщення повинно утримуватися в належному порядку, тому його в першу чергу очищують від

пилу, бруду та дезинфікують. Другим етапом обробки є стерилізація ультрафіолетом, для чого використовують кварцові бактерицидні лампи з експозицією від 1 до 3 годин.

Стерилізація ламінар-боксу: ламінар-бокси, як правило, обладнані УФ лампами, які можна залишати на ніч ввімкнутими для стерилізації внутрішньої поверхні. Безпосередньо перед роботою в ламінар-боксі його робочу поверхню протирають 96% етиловим спиртом.

ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ ТА ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ

Незважаючи на постійне вдосконалення штучних живильних середовищ для рослин *in vitro*, вони за своїм складом лише невеликою мірою можуть наближатися до наявних у нативних умовах.

Рослинні об'єкти, будучи ізольованими, поглинають із живильного середовища як мінеральні так і органічні речовини. Надходження відбувається у вигляді водного розчину мінеральних солей, у вигляді обмінних процесів у клітинах, що контактують із штучним живильним середовищем. В рослинний організм елементи мінерального живлення надходять одні у вигляді іонів, інші зв'язуються з органічними сполуками, або включаються в ці сполуки лише після ряду окисно-відновних перетворень.

Основою створення живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і, оскільки, як вже зазначалося, живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводять в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози. Крім вуглецю, кисню і водню для росту тканин необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор – фосфату, сірка – сульфату та іони K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Загальна концентрація мінеральних елементів найбільш висока у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка (табл. 1 додатку).

Таблиця 1. Склад живильного середовища за Мурасіге та Скугом

№	Компоненти	Вміст мг/л
1.	NH_4NO_3	1650
2.	KNO_3	1900
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	370
5.	KH_2PO_4	170
6.	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
7.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
8.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
9.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
10.	KJ	0,83
11.	$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
12.	$\text{Na}_2\text{-ЄДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
13.	Тіамін - HCl	0,1
14.	Піридоксин - HCl	0,5
15.	Нікотинова кислота	0,5
16.	Мезоінозит	100
17.	Гліцерин	2,0
18.	Кінетин	0,2
19.	Сахароза	30

Для отримання і підтримання культур тканин та клітин використовують фітогормони. Для успішного органогенезу рослин важливо підібрати оптимальний склад основного живильного середовища та сприятливий баланс екзогенних регуляторів росту у відповідності з типом тканин біоматеріалу (цитокінінової, ауксинової, цитокініно-ауксинової природи).

Приготування маточних розчинів живильних середовищ.

Для економного використання часу та зусиль готують концентровані розчини макро-, мікросолей, вітамінів, гормонів (маточні розчини), які зберігають у холодильнику при температурі +4°C не більше місяця. Розчини вітамінів можна заморожувати і зберігати у невеликих кількостях протягом 2 тижнів.

Таблиця 2. Маточні розчини для середовища Мурасіге-Скуга

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1 л середовища, мл
Макросолі , г на 0,5 л маточного розчину			
KNO ₃	19,0	4 °C	50
NH ₄ NO ₃	16,5		
KH ₂ PO ₄	1,7		
MgSO ₄ ×7H ₂ O	3,7		
CaCl ₂ ×2H ₂ O	4,4		
H ₂ O довести до 0,5 л.			
Fe-хелат , мг на 200 мл маточного розчину			
Fe ₂ SO ₄ ×7H ₂ O	1114	4 °C	5
Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O	1490		
Мікросолі , мг на 100 мл маточного розчину			
H ₃ BO ₃	62	4 °C	10
MnSO ₄ ×5H ₂ O	241		
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	86		
KI	8,3		
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	2,5		
CoCl ₂ ×6H ₂ O	По 10 мг солей розчинити в 40 мл H ₂ O. 1 мл розчину додати до 100 мл стоку мікросолей.		
CuSO ₄ ×5H ₂ O			

В маточних розчинах макросолей концентрація останніх збільшена у 10 разів. Наважку солі згідно таблиці 2 для маточного розчину ретельно

розчиняють у 500 мл дистильованої води. Подібним чином готують і маточні розчини мікросолей (розчиняють у 100 мл дистильованої води).

Вихідний розчин Fe-хелату (200 мл) готують, розчиняючи послідовно 1,492г $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і 1,112г $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, після чого доводять його до кипіння.

Розчини вітамінів (табл. 3) готують, розчиняючи у бідистильованій воді або безпосередньо перед приготуванням середовища, або заморожують невеликими порціями, тривалість зберігання яких не більше 2 тижнів.

Використовують по 2 мл розчину вітамінів на 1 л середовища.

Таблиця 3. Склад розчинів вітамінів

Компоненти розчину вітамінів	Вміст компоненту у розчині, мг/л	Вміст компоненту у 500-кратному розчині, мг на 200 мл
біотин (H, B ₇)	5	1
нікотинова кислота (B ₃ , PP)	500	100
тіамін·HCl (B ₁)	500	100
піридоксин·HCl (B ₆)	500	100
Са-пантотенат (B ₅)	500	100
Довести загальний об'єм дистильованою H ₂ O		

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ІОК, ІМК і їх аналогів (наприклад, концентрацію 1мг/мл) готують шляхом розчинення 100мг речовини в 0,5 – 2 мл спирту, підігрівають та додають води до 100 мл.

Цитокініни (кінетин, Зеа, 6-БАП) розчиняють попередньо у невеликій кількості 0,5н HCl і при нагріванні додають потрібну кількість води.

Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (АБК), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму.

Гіберелову кислоту розчиняють безпосередньо у воді і додають у живильні середовища і фільтрують через мембранні фільтри.

Кокосове молоко добавляють у живильні середовища, попередньо підігрівачи протягом 30 хв. при $+60^{\circ}\text{C}$ й стерилізують фільтруванням (діаметр мембранного фільтра 0,2 – 0,45 мкм).

Антибіотики, гербіциди та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклавуванні, додають до живильних середовищ ($40 - +50^{\circ}\text{C}$) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6 – 5,8.

Приготування базового безгормонального живильного середовища
Мурасіге-Скуга.

1. У хімічний стакан об'ємом 1000 мл налити приблизно 200 мл дистильованої води, покласти у воду магніт, поставити стакан на магнітну мішалку. Увімкнути мішалку, відрегулювати швидкість обертів магніту (у разі відсутності магнітної мішалки ретельно перемішувати розчин після кожної операції).

і. Додати згідно з прописом середовища необхідну кількість маточного розчину макросолей (табл. 2).

2. Додати необхідну кількість маточних розчинів мікросолей і заліза в хелатній формі згідно з прописом (табл. 2).

3. Додати згідно з прописом даного середовища розчини вітамінів (табл. 3).

4. Зробити наважку сахарози (10 г), додати її в середовище. Вміст довести дистильованою водою до об'єму 500 мл.

5. Виміряти рН розчину. рН розчину має знаходитися в межах 5,6-5,8. У разі відхилення від цього значення до середовища по краплях потрібно додавати луг (0,1N KOH) або кислоту (0,1N HCl).

6. Наважку агару з розрахунку 7-8 г/л помістити у термостійку колбу (500 мл) або стакан, залити холодною водою, залишити на 20 хв. для набухання і нагрівати, постійно помішуючи до повного розчинення агару.

7. Долити в колбу (з усіма необхідними складовими для середовища та агаром) дистильованої води до об'єму 1 л, добре розмішати, після чого тепле середовище розлити у колби або пробірки і закрити фольгою. Простерилізувати в автоклаві за 1,2 атм, 105-110 °С.

8. У разі приготування живильного середовища з додаванням фітогормонів, готувати останні, користуючись вище зазначеними інструкціями.

ВІДБІР ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ДЛЯ ВВЕДЕННЯ В КУЛЬТУРУ ТКАНИН

Для успішного проведення робіт з мікроклонального розмноження рослин вибір експлантів відіграє першочергове значення. Найкраще використовувати матеріал, вилучений із візуально здорових (неінфікованих) сильних рослин, що мали оптимальні умови вирощування. Первиними експлантами можуть слугувати насіння, кінчики стебел, бруньки, зародки та інші меристематичні тканини, а в деяких випадках молоді листки, черешки, суцвіття, тощо (рис.1).

Вибір експлантів залежить від виду біоматеріалу, фази розвитку рослини-донора, сезону року. Незрілі молоді органи завжди більш пластичні з точки зору здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж старіючі зрілі тканини. При виборі експлантів слід віддавати перевагу меристематичним тканинам, оскільки вони швидко пристосовуються до умов ізольованої культури, мають високу інтенсивність росту і тотипотентність.

Розмір експланту залежить від розмірів рослини-донора і коливається в межах від 0,1мм до 2,0 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 та один або два листових примордія. Крупніші за розміром експланти краще виживають і швидше збільшують масу рослинного матеріалу в культурі *in vitro*.

Для зручності маточну рослину спочатку доцільно розділити на великі фрагменти (розміром 2-4 см), а вже після стерилізації розділяти на менші (0,5 - 1,0 см).

Для відокремлення первинних експлантів використовують гострі ланцети, щоб надрізи були рівними і не руйнували прилягаючі тканини. Однією рукою за допомогою пінцета підтримують рослину, другою рукою – легким натисканням під прямим кутом роблять надріз.

Відокремлений експлант стерилізують визначеними стерилізаторами, що є ефективними для конкретного виду рослин та типу тканин. Потім у мікроживців виділяють пошкоджені стерилізацією частини та переносять у культуральну пробірку на поверхню живильного середовища, після чого поміщають у контрольовані умови вирощування. Всі процедури проводять у стерильному ламінар-боксі.

СТЕРИЛІЗАЦІЯ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ

Для поверхневої стерилізації рослинних тканин використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулему), пероксид водню. Рідше використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

Гіпохлоридом натрію ($NaClO$) стерилізують насіння та інші рослинні тканини (0,5 – 5,0% розчином протягом) 1 – 20 хв. Річні стебла деяких хвойних дерев стерилізують 5% розчином 30 – 60 с. Стерилізацію нижніх тканин (листки та стебла сукулентів, поверхневі меристеми) проводять слабким розчином (0,5%) протягом 5 хв. Пиляки після полоскання у 95% етанолі стерилізують в 10% (за об'ємом) розчині $NaClO$ протягом 10 – 15 хв.

Гіпохлорид кальцію ($Ca(ClO)_2$) менш токсичний для тканин, ніж $NaClO$. У концентрації 90 г/л застосовують для стерилізації бульбо- і коренеплодів (протягом 20 – 25 хв.), пагонів деревних (15 – 30 хв.), пагонів та стебел трав'янистих культур – (10 – 15 хв.).

Хлорамін діє на рослинні тканини слабше, ніж $NaClO$ та $Ca(ClO)_2$. Всі розчини з активним хлором використовують один раз і готують безпосередньо перед вживанням.

Етиловий спирт (C_2H_5OH) застосовують у концентрації 70 – 95% для стерилізації і покращення дії інших стерилізуючих розчинів.

Бром (Br) у вигляді 1% розчину застосовують для стерилізації лише сухого насіння, оскільки бром токсичний і пошкоджує зародки, якщо вони мало захищені (наприклад, у злакових). Після стерилізації бромною водою насіння промивають дистильованою.

Фенолом (C_6H_5OH) стерилізують плоди і кісточки плодових порід дерев (персика, сливи, вишні) у вигляді 5% розчину протягом 5 хв.

Попередньо, перед стерилізацією, рослинні об'єкти ретельно промивають проточною водою з миючими засобами (рідке мило, пральний порошок, тощо), знову ретельно промивають та звільняють від надлишкових тканин. Із коренеплодів та кореневищ знімають шкірку, з пагонів – кору, з бруньок – покривні луски. Відмиті об'єкти поділяють на менші шматки і стерилізують різними стерилізуючими реагентами. Вибір реагентів та час експозиції залежать як від об'єкту, так і від особливостей самого реагенту, і визначаються переважно експериментальним шляхом.

Після стерилізації для повного видалення антисептика рослинні об'єкти 2-3 рази промивають стерильною водою, переносять або у стерильну чашку Петрі для подальшого висадження на живильне середовище, або безпосередньо у пробірку.

Під час проведення експерименту знімають наступні показники:

- Проростання при різних способах стерилізації;
- Приживання мікроживців на середовищі Мурасіге і Скуга;
- Визначення відсотку втрати та ефективності стерилізації за рахунок зараження мікроживців.

Результати заносять до таблиці, опрацьовують статистично та визначають найбільш оптимальний режим стерилізації для обраного об'єкту.

Для прикладу наведені детальні методики одержання стерильних експлантів з насіння та апікальних меристем при стерилізації розчином побутового хлорвмісного антисептику «Білизна».

Одержання стерильних експлантів з насіння

Хід роботи

1. Насіння - візуально здорове і непошкоджене - кладуть у полотняні мішечки по 10-15 шт., після чого ретельно промивають під проточною водою з використанням будь-якого калійного мила з вмістом антибіотика (наприклад, «Сейфгард») та ополіскують до повного відмивання мила.
2. Готують розчини «Білизни» з різними концентраціями: 1 частина препарату і 4 частини води (1:4); 1:3, 1:2 та 1:1.
3. У ламінарному боксі мішечки з промитим насінням поміщають на 1 хв. у стакан з 70% етанолом, після чого пінцетом їх переносять у стаканчики з відповідною концентрацією стерилізуючого розчину і витримують відповідний час. Час обирають експериментально залежно від розмірів насіння, товщини насінневої шкірки та концентрації розчину (орієнтовно від 10 до 30 хв).
4. Простерилізоване насіння промивають тричі по 10 хв. у стерильній дистильованій воді. Для цього стерильним пінцетом переносять мішечки із склянки зі стерилізуючим розчином у склянку із стерильною дистильованою водою. Витримують 10 хв. Промивання повторюють 3 рази, використовуючи нові порції води.
5. Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом переносять у стерильну чашку Петрі з проавтоклавованими стерильними паперовими фільтрами для усунення надлишку води.
6. Стерильним пінцетом переносять насіння на безгормональне живильне середовище у пробірки. Для цього пробірки відкривають, переносять насіння, намагаючись максимально скоротити час маніпуляції, і одразу закривають отвір пробірки парафіновою пробкою, або фольгою.
7. Підписують пробірки із зазначенням варіанту досліду.
8. Пробірки з насінням поміщають у термостат при температурі $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, або одразу у культуральну шафу і культивують при температурі

25±1°C та освітленні 400 лк. Через 4–7 днів перевіряють чистоту посіву та схожість насіння.

9. Результати досліджень записують у таблицю.

Таблиця 4. Показники ефективності стерилізації насіння

№	Концентрація розчину	Тривалість стерилізації, хв	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння через 7 днів		Схожість насіння		Ефективність, %
				шт	%	шт	%	
1	1:4	10						
2		15						
3		30						
4	1:3	10						
5		15						
6		30						
7	1:2	10						
8		15						
9		30						
10	1:1	10						
11		15						
12		30						

Одержання стерильних експлантів з меристем

Хід роботи

1. З життєздатних, візуально здорових пагонів рослин відрізати гострим ланцетом апікальні та латеральні бруньки. Очистити від покривних листків і лусок та помістити в полотняні мішечки по 10 шт. в кожен.

2. Ретельно промити бруньки мильним розчином, потім водою до повного змивання мила.

3. Приготувати розчини «Білизни» відповідної концентрації (як у табл. 5). Мішечки з підготовленими та промитими бруньками помістити у стаканчики з стерилізуючим реагентом і витримати відповідно до терміну стерилізації.

4. Простерилізований рослинний матеріал промивають у стерильній дистильованій воді (час експозиції в стакані з водою – 10 хв). Промивання повторюють 3 рази, використовуючи кожного разу нову порцію води.

5. Стерильним пінцетом у стерильній чашці Петрі розгорнути мішечки та перенести по одному експланту на іншу стерильну чашку Петрі. Підтримуючи верхівку бруньки очним пінцетом, очним ланцетом відділити 2-3 зовнішні листкові примордії та зробити тонкий зріз в основі бруньки. Всі маніпуляції виконувати виключно стерильними інструментами, після кожної операції ополіскуючи в етанолі та фламбуючи над полум'ям спиртівки.

Таблиця 5. Показники ефективності стерилізації меристем

№	Концент- рація розчину	Трива- лість стери- лізації, хв	Загальна кількість експлантів	Кількість сте- рильних екс- плантів через 6 днів		Кількість рослин суні- ці через 30 днів	
				шт	%	шт	%
1	1:4	10					
2		15					
3		30					
4	1:3	10					
5		15					
6		30					
7	1:2	10					
8		15					
9		30					
10	1:1	5					
11		10					
12		15					

6. Ізольовану меристему перенести на живильне середовище з додаванням фітогормонів.

7. Пробірки підписати та помістити в шафу для культивування при температурі $25 \pm 1^\circ\text{C}$ та освітленні 400 лк.

8. Через 4 – 6 діб підрахувати кількість стерильних експлантів та визначити ефективність стерилізації. Через 25 – 30 діб визначити кількість

життєздатних мікроживців та порівняти інтенсивність приросту у кожному варіанті досліду.

9. Результати досліду занести в таблицю. Зробити висновки щодо ефективності стерилізації.

СУБКУЛЬТИВУВАННЯ АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН

Метод культури тканин успішно використовують для масового й прискореного розмноження рослин, отримання в короткі строки великої кількості посадкового матеріалу. Для цього в культурі *in vitro* кожні 3–6 тижнів проводять субкультивування (пасажування) отриманих асептичних експлантів.

За умови вирощування на штучних живильних середовищах важливим є підбір найбільш оптимальних концентрацій фітогормонів (переважно ауксинового та цитокінінового ряду) для швидкого росту й розвитку мікроживців, а також індукції ризогенезу для утворення життєздатних біполярних рослин з метою їх наступної постасептичної адаптації.

В культурі тканин фітогормони, добавлені в різних пропорціях, регулюють синтез ендогенних гормонів рослин, що проявляється у відмінних морфогенетичних реакціях клітин та тканин.

В 1955 р. Скуг та Міллер висунули гіпотезу гормональної регуляції в культурі клітин і тканин, яка на сьогодні відома як правило Скуга-Міллера: якщо концентрації ауксинів і цитокінінів у живильному середовищі приблизно однакові, чи концентрація ауксинів тільки в незначній мірі перевищує концентрацію цитокінінів, то утворюється калюсна культура; якщо концентрація ауксинів в значній мірі перевищує таку у цитокінінів, то спостерігається ризогенез; якщо навпаки – концентрація ауксинів значно менша за цитокінінів – то формуються бруньки й пагони. Отже, регулюючи вміст та співвідношення фітогормонів у живильному середовищі, можна добитися бажаних результатів морфогенезу в культурі *in vitro*.

При розмноженні в культурі тканин розрізняють два типи клонування: вертикальне та горизонтальне. Тип розвитку залежить від багатьох чинників і, насамперед, від співвідношення фітогормонів у середовищі для вирощування.

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

Мікроживці висаджують на свіже (оновлене) середовище, що стимулюватиме розвиток бокової бруньки, яка знаходиться між стеблом і черешком 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. 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. При перенесенні клону на свіже живильне середовище з цитокінінами знову спостерігається масове закладання і наростання бруньок в пазухах листків.

Періодично проводячи маніпуляції з субкультивуванням рослин та висадженням їх на модифіковані гормонами живильні середовища, в короткі строки отримують необхідну кількість саджанців.

Хід роботи

1. Вирощені в пробірках рослини стерильним пінцетом виймають і кладуть у стерильну чашку Петрі.
2. Підтримуючи пінцетом, стерильним ланцетом розрізають на фрагменти таким чином, щоб кожен із живців мав точку росту.
3. Одержані мікроживці висаджують у нові пробірки з живильним середовищем, останні підписують із зазначенням варіанту досліду. Культивування проводять при температурі $25\pm 1^\circ\text{C}$ та освітленні 400 лк.
4. Через 2-3 тижні знімають показники, результати заносять до таблиці, формулюють висновки щодо ефективності різних середовищ та вибору найбільш оптимального режиму вирощування.
5. Інтенсивність органогенезу оцінюють за наступною схемою: +++ - відмінна; ++ - задовільна; + - незадовільна; * - відсутня

Таблиця.6. Ефективність різних модифікацій живильного середовища для субкультивування мікроживців

Модифікація живильного середовища	Кількість експлантів, шт.	Дата висадки	Дата індукції органогенезу	Інтенсивність органогенезу експлантів	Загальний розмір експлантів на 30-й день субкультивування

ІНДУКЦІЯ РИЗОГЕНЕЗУ

Після отримання необхідної (запрограмованої) кількості клонів, їх переносять на середовище для укорінення та отримання повноцінних рослин.

Основними індукторами коренеутворення, як уже зазначалося, є ауксини. Для формування коренів мікроживці пасажують на живильне середовище для ризогенезу, що містить підвищені концентрації регуляторів росту ауксинової природи. Це основне правило ризогенезу *in vitro*.

Під впливом ауксинів відбувається стимуляція проліферації 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 інтенсифікувати процеси ризогенезу, в останнє живильне середовище додають вищі концентрації гіберелінової кислоти (для видовження пагона) та зменшують або повністю виключають вміст цитокінінів. Через 15–25 діб після висадки рослин на середовище формується добре розвинена коренева система і рослинний матеріал готовий для постасептичної адаптації та перенесення в ґрунт.

ПЕРЕНЕСЕННЯ МІКРОЖИВЦІВ У ГРУНТ ТА ЇХ ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ

Перенесення рослин 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. При перенесенні рослин з оптимальних культуральних умов вирощування у природні умови необхідно провести їх акліматизацію і адаптацію до нотальних умов температурного режиму, освітлення, вологості тощо.

Відомо два способи адаптації:

- адаптація рослин безпосередньо у біотехнологічній лабораторії;
- проміжне укорінення рослин при використанні фітотронів (або ж теплиць).

Перший спосіб передбачає використання адаптаційних кімнат, оснащених за типом культуральних приміщень, де поступово оптимальні умови вирощування рослин підводяться до природних умов, куди буде пересаджуватись посадковий матеріал. Рослини після адаптації з пробірок переносять безпосередньо в ґрунтові природні умови під плівку.

Спосіб проміжного укорінення передбачає перенесення рослин із пробірок у ящики чи горщечки та культивування їх в тепличному комплексі з контрольованими параметрами мікроклімату.

Як субстрат використовують 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 наступним чином: в субстраті роблять глибоке заглиблення, у ньому вертикально розміщують коріння клонів, старанно ущільнюють субстрат навколо рослин, потім їх поливають і накривають ємності плівкою чи склом.

Через 7–10 діб після висадки, коли рослини приживуться і почнуть відростати, їх загартовують. Спочатку знімають плівку (скло) на 10–15 хвилин на добу, згодом час провітрювання продовжують до 1–2 годин. Після 10–15 діб загартовування плівку можна зняти зовсім. Через 30–50 діб адаптації рослини

утворюють інтенсивно розвинену надземну і міцну розгалужену кореневу системи. Такі рослини придатні для пересадки в польові умови вирощування.

Рослини на перших етапах росту можуть мати незначні морфологічні відмінності органів (листоків та стебла), проте до кінця вегетації рослини набувають типового вигляду, що є характерним для рослини-донора вихідного експланту.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Сільськогосподарська біотехнологія Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія»/Укладачі: Лобова О.В., Пилипчук О.О. – Київ, 2014. –20 с.
2. Біотехнологія рослин: Навчально-методичний посібник / Н. С. Задерей, Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2015. – 84 с.
3. Гнатюк І. С., Маринченко Л. В., Банникова М. О. Молекулярні основи клонування багатоклітинних організмів. Дедиференціація та вторинна диференціація в культурі *in vitro*. Лабораторний практикум. – Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022. – 83 с.
4. М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Київ, 2014. – 247 с.
5. Мацкевич В.В., Подгаєцький А.А., Філіпова Л.М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій): науково-практичний посібник. – Біла Церква: БНАУ, 2019. –85 с.
6. Мацкевич О.В., Кімейчук І.В., Мацкевич В.В., Павліченко А.А. Трофічні та фітогормональні детермінанти онтогенезу *in vitro*// Вісник Сумського національного аграрного університету. – 2022. – Сер. Агронімія і біологія, вип. 2 (48). – С. 111 – 123.
7. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Підручник. – Київ: Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
8. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт із дисципліни «Біотехнологія в сільськогосподарському виробництві» студентами спеціальності 7.09010102 «Агрохімія та ґрунтознавство» денної та заочної форми навчання /Упорядник: Олійник О.О. –Рівне: НУВГП, 2013. – 16 с.
9. Подгаєцький А.А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. – Біла Церква: БНАУ, 2018. – 209 с.

10. Рябовол Л. О., Рябовол Я. С. Мікроклональне розмноження рослинного матеріалу. Методичні вказівки для лабораторних занять студентів з дисципліни «Основи біотехнології в рослинництві». – Умань, 2019. – 16 с.

ДОДАТОК

СКЛАД СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ КАЛЮСНИХ
ТКАНИН РОСЛИН

Компоненти середовища	Основне середовище, мг/л				
	Гамборга - Евелєга	Мурасіге - Скуга	Ніча - Ніч	Шєнка - Хільдебрандта	Уайта
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$				300	
NH_4NO_3		1650	720		
KNO_3	2500	1900	950	2500	80
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	150	440	166	200	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (безв.)					208,50
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	250	370	185	400	360
KH_2PO_4		170	68		
KCl					65
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	169,6				18,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134				
Na_2SO_4					200
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	28,0	27,8	27,8	15,0	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	37,3	20,0	
H_3BO_3	3,0	6,2	10,0	5,0	1,5
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	8,6	10,0	1,0	3,0
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,2	0,001
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025		0,1	
KI	0,75	0,83		1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,1	0,0025
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	13,2	22,3	25,0	13,2	7,0
Мєзоінозит	100,0	100,0	100,0	1000,0	
Гліцин		2,0	2,0		3,0
PP	1,0	0,50	5,0	5,0	0,5
Фолієва кислота			0,5		
Біотин			0,05		
B_1	10,0	0,10	0,5	5,0	0,1
B_6	1,0	0,5	0,5	0,5	0,1
ІОК		0,2			
2,4-Д	2,0			0,5	
Кінетин		0,2			
Сахароза	20000	30000	20000	30000	20000
Агар	7000	8000	7000	6000	7000
pH	5,6-5,8				

Мікророзмноження гвоздики (картоплі)

1. Пагони розділяють на мікроживці довжиною 3-5мм з однією пазушною брунькою (в випадку черенкування гвоздики) або двома пазушними бруньками при черенкуванні картоплі.

2. Живці поміщають в пробірки на живильне середовище, яке містить:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Кінетин	0,25 мг
Сахароза	20 г
Агар	8 г
H ₂ O	870 мл
рН 5,6-5,8 до автоклавування	

3. Культивують в світловій культуральній кімнаті при температурі +23-25 °С, 14 - годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 2000 лк.

4. Мікрочеренки укорінюються і утворюють пагони протягом 3-4 тижнів після введення в культуру *in vitro*.

Прискорене мікроклональне розмноження (гвоздики, смородини, картоплі)

1. Пагони стерилізують за допомогою розчину “Білизни” (1:3) протягом 20 хвилин і промивають стерильною дистильованою водою три рази по 10 хвилин.

2. Вичленяють верхівкові та пазушні бруньки і поміщають на рідке живильне середовище, склад якого:

Макросолі МС	100 мл;
Мікросолі МС	1 мл;
Вітаміни МС	1мл;
БАП	5 мг/л;
Сахароза	20 г;
Вода	878 мл;
рН 5,5 - 5,8 до автоклавування	

Іноді за основу беруть середовище Уайта або Гамборга.

3. Культивують бруньки на світлі при температурі +25-28°C протягом 2-3 тижнів до початку інтенсивної проліферації адвентивних бруньок.
4. Через 2-3 тижні культивування, експлантати переносять на рідке живильне середовище того ж складу, але зі зниженим вмістом БАП (до 2 мг/л).
5. Культивують експлантати при температурі +25-28°C, 14-годинному фотоперіоді, вологості 60-70%. Через 1,5-2 тижні культивування починається інтенсивне утворення погонів.
6. Відокремлюють сформовані пагони і пересаджують в окремі пробірки на тверде живильне середовище для укорінення.

Склад живильного середовища:

Макросолі МС	100 мл;
Мікросолі МС	1 мл;
Вітаміни МС	1мл;
ІОК	0,15 мг/л;
Сахароза	20 г;
Агар	6 г;
Вода	871 мл;
рН	5,6 - 5,8 до автоклавування.

7. Повністю сформовані рослини-регенеранти пересаджують в умови відкритого ґрунту.

Визначення ростових характеристик рослин-регенерантів

Для обліку рослин-регенерантів використовують низку показників, які характеризують їх ріст і розвиток.

1. Сиру та суху масу рослин-регенерантів, яку визначають в кінці досліду або через кожні 7 діб протягом періоду культивування для визначення динаміки їх росту.
2. Кількість та довжину міжвузлів.
3. Індекс росту (відношення кінцевої довжини рослини-регенеранту до величини вихідного експлантату).
4. Площу листової поверхні.
5. Коефіцієнт розмноження (кількість рослин-регенерантів, яку можна отримати з одного експлантату за певний проміжок часу).

Вплив ауксинів, цитокінінів та гіберелінів на ріст і розвиток мікроживців стевії, картоплі, гвоздики

1. Приготувати живильні середовища з розчинами досліджуваних регуляторів росту різної концентрації, які автоклавують при 1 атм протягом 25 хвилин.
2. В ламінар-боксі за допомогою ланцету розділяють рослини-регенеранти (гвоздика, картопля, стевія) на мікроживці.
3. Живці поміщають на живильні середовища з різним вмістом регуляторів росту.
4. Культивують експлантати в культуральній кімнаті при температурі +25- 26°C, 14-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 1000 лк та вологості повітря 60-70%.
5. Через кожні 7 діб визначають ростові характеристики, утворених рослин-регенерантів (індекс росту, кількість міжвузлів та їх довжину).
6. В кінці досліду (на 35 - 40 день) підраховують коефіцієнт розмноження та будують графіки дії регуляторів росту на ріст і розвиток рослин-регенерантів і роблять відповідні висновки.

Склад живильних середовищ з різним вмістом регуляторів росту

Склад живильного середовища	Вміст регуляторів росту		
	Ауксини, мг/л	Цитокініни, мг/л	Гібереліни, мг/л
Макро- по МС – 100 мл	0,1	0,1	0,1
Мікро- по МС – 1мл	0,5	0,5	0,5
Fe-хелат – 1 мл	1,0	1,0	1,0
Вітаміни по МС – 1 мл			
Сахароза – 20 г			
Агар – 8 г			
pH – 5,6 – 5,8 до автоклавування			