

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КАРТОПЛЯРСТВА

***ОЗДОРОВЛЕННЯ СОРТІВ КАРТОПЛІ МЕТОДОМ
КУЛЬТУРИ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ В
ПОЄДНАННІ ІЗ ХІМІОТЕРАПІЄЮ***

Методичні рекомендації

Немішаєве 2015

УДК 635.21:631.526.32:578.24

Рекомендовано до видавництва Вченою радою Інституту картоплярства НААН України, протокол № від 2013 р.

Автори:

Т.М.Олійник, кандидат сільськогосподарських наук

А.А.Бондарчук, доктор сільськогосподарських наук

С.О.Слободян, зав.сектором ДНК-технологій

Н.А.Захарчук, кандидат біологічних наук

І.П. Тимошенко, молодший науковий співробітник

С.Л. Гуторчук, молодший науковий співробітник

І.М. Конишева, агроном

Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем у поєднанні із хіміотерапією/ Методичні рекомендації/
/Т.М.Олійник [та ін.]; Інститут картоплярства НААН України. – Немішаєве, 2013. – 52с.

Рецензенти: Рязанцев В.Б.

Вишневська О.В.

В методичних рекомендаціях висвітлено питання оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем у поєднанні із хіміотерапією, вимоги до лабораторії; живильні середовища та вірусінгібуючі препарати, які використовуються для культури картоплі *in vitro*; етапів введення в умови стерильної культури; процесів регенерації та клонального мікророзмноження різних сортів та ліній картоплі, вільних від бактеріальної, грибною та вірусної інфекції; підтримку колекції *in vitro* оздоровлених сортів. Діагностика вірусів методом полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотньою транскрипцією та ідентифікація сортотиповості ліній з використанням RAPD- та ISSR - ПЛР

Призначені для спеціалістів в галузі біотехнології, екології, картоплярства, наукових працівників, викладачів та студентів вищих навчальних закладів.

Тел: (04577) 41-533, 41-594

E- mail: upri@visti.com

WEB: www.potato.com.ua

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

RAPD праймери – олігонуклеотиди довжиною 10 кроків;
ІФА – імуноферментний аналіз;
ЗТ-ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією;
ІОК – індоліл оцтова кислота;
РНК-аза – рибонуклеаза;
ПЛР – полімеразно-ланцюгова реакція;
кДНК – синтезована ДНК (кДНК) на РНК матриці;
dNTP – суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів;
U – одиниця активності ферменту;
Tag-полімераза – термостабільна ДНК полімераза;
РНК – рибонуклеїнова кислота
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
п.н. – пари нуклеотидів;
ТВЕ – трис-боратний буфер;
ХВК – Х вірус картоплі;
МВК – М вірус картоплі;
УВК – У вірус картоплі;
СВК – S вірус картоплі.

ВСТУП

Сучасні методи оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі передбачають поряд з природними факторами (клоновий добір) оздоровлення методом культури меристем. Метод культури апікальних меристем став головним терапевтичним методом лікування та звільнення рослин від вірусної інфекції. На даний час методом культури меристем оздоровлено ряд таких культур як картопля, суниця, гвоздика, деякі плодово-ягідні культури – яблуня, шовковиця, черешня, смородина та інші. Найбільш детально розроблено умови культивування меристем для картоплі.

Віруси, як і любий організм, під впливом зовнішнього середовища здатні до мінливості. Вони змінюють свою будову, стають більш шкодочинними.

В умовах *in vitro* мутації вірусу спричинені дією підвищених температур, хімічних речовин та умов культивування.

Із мінливістю вірусів та появою нових, різних за стікістю сортів виникає потреба у пошуку більш ефективних заходів оздоровлення.

Проведення хіміотерапії для інактивації фітопатогенних вірусів доцільне у випадках значного інфікування сорту. При сильному, інколи 100%-вому ураженні рослин вірусами, метод хіміотерапії в поєднанні з культурою апікальних меристем є єдиним і найбільш радикальним методом отримання безвірусних рослин. Позитивний результат спостерігається у зовнішньому стані рослин та підвищенні врожайності. По різних сортах підвищення урожайності коливається в межах 30 – 50%.

При використанні методу хіміотерапії особливу увагу звертають на збереження ідентичності параметрів вихідного сорту. Тому, поряд із контролем вірусологічного стану (імуноферментний аналіз, полімеразно-ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)) при роботі по отриманню безвірусного вихідного матеріалу необхідно проводити ідентифікацію оздоровлених ліній, сортів на рівні ДНК методом ПЛР-аналізу.

Технологія оздоровлення сортів картоплі з використанням методу культури апікальної меристеми в поєднанні з хіміотерапією включає наступні етапи:

- підготовка бульб для виділення меристем (пророщування в темноті), діагностика їх початкового ураження (методом ІФА, ЗТ-ПЛР);
- виділення меристем із етиольованих паростків, культивування (1-й пасаж);
- пересадка меристем на живильне середовище із вірусінгібуючими речовинами (із 2-го пасажу до повної регенерації);
- живцювання регенерантів та 2-3 разова діагностика вірусоносійства (ЗТ-ПЛР). Уражені рослини вибраковують;
- встановлення ідентичності сорту (ПЛР). Мінливі лінії вибраковують;
- випробування ліній в полі в умовах просторової ізоляції, діагностика вірусоносійства (ЗТ-ПЛР), підтвердження ідентичності сорту (ПЛР). Добір ліній за комплексом господарсько-цінних показників.
- занесення зразків до колекції Банку *in vitro* оздоровлених сортів.

ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ

1. ОСНОВНІ ВИМОГИ ДО ЛАБОРАТОРІЇ

Для роботи з культурою *in vitro* необхідно передбачити наступні кімнати:

1. - кімната для миття посуду;
2. - кімната для приготування середовищ;
3. - автоклавна;
4. -стерильна кімната (бокс) оснащена ламінар-боксами для виділення меристем та стерильного живцювання культури;
5. - культуральна кімната з кліматконтролем "світлова" для вирощування меристем та рослин - регенерантів.

Кімната для миття повинна бути забезпечена холодною та гарячою водою, примусовою вентиляцією. В обладнання кімнати входять глибокі раковини чи ванна для миття великої партії посуду. В кімнаті обов'язково повинні бути стелажі для сушіння лабораторного посуду та сушильні шафи

для стерилізації з режимом роботи 160-180 °С. Цю ж кімнату обладнують дистиллятором.

Кімната для приготування середовищ - це лабораторна кімната, в оснащення якої входять технічні, аналітичні й торсіонні ваги, рН-метр, магнітні мішалки, водяні бані, електроплитки, дистиллятор, бідистиллятор, витяжна шафа, холодильник для зберігання реактивів, лабораторні меблі, лабораторний посуд та інструменти.

Автоклава - приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів та посуду. В ній встановлюють горизонтальні (ГК-100)* та вертикальні автоклави класу "В" (АВ - 75, ВК - 60, ВК - 75)*. Кімнату обов'язково обладнують примусовою вентиляційною системою.

Стерильна кімната (бокс) призначена для стерильних пересаджувань культур. В оснащення кімнати входять ламінар-бокси (типу УОБГ, УОВВ, БП-4-00-4, КПП-1, КП-5, СМ-5)*. Стерилізацію кімнати проводять бактерицидними лампами типу ОБП-300, БУФ-15, БУФ-30*.

* - прилади та обладнання для кімнат підбирають, як вітчизняного так і зарубіжного виробництва.

Культуральна кімната — термостатоване приміщення з регульованою температурою (20-24 °С), відносною вологістю 70%, світловим днем 16 годин та кондиціонуванням повітря.

2. ЖИВИЛЬНІ СЕРЕДОВИЩА

Успішне вирощування рослин *in vitro* забезпечується перш за все правильним підбором живильних середовищ, що відповідають фізіологічним особливостям культивованих рослин [16, 17]. Мінеральний склад живильних середовищ повинен забезпечувати збалансоване і достатнє живлення меристем необхідними поживними елементами. Кращим для культивування меристем є середовище з мінеральною основою Мурасіге-Скуга [18]. Джерелом вітамінів є В₁, В₆, аскорбінова кислота. Позитивний вплив на ріст меристем має додавання до середовища біотину, мезоінозиту, нікотинової кислоти, гідролізату казеїну та регуляторів росту. Із групи регуляторів росту застосовують ауксини. Вони

стимулюють ризогенез і подальший ріст корінців. Як правило використовують ІОК (β -індоліл-3-оцтова кислота) в концентрації 1-2 мг/л. Ріст стебел індукують гібереліном в концентрації 0,2 мг/л. Для стимуляції клітинного поділу та диференціації бруньок використовують цитокиніни, а саме кінетин в концентрації 0,02 – 0,1 мг/л. Необхідним джерелом органічного вуглецю є сахароза.

Для прискореного отримання регенерантів із меристем застосовують різні середовища та поетапні пересадки. На першому етапі використовують середовище для регуляції морфогенезу. Для цього потрібно додати регулятори росту кінетин та аденін в концентрації 0,25 мг/л, гібереліну – 1,0 мг/л, ІОК – 0,5 мг/л, аскорбінову кислоту в концентрації 3 мг/л та сахарозу 20 г/л. На другому – індукують коренеутворення, ріст стебла та листків. Для цього потрібно додати лише ІОК в концентрації 1,0 мг/л.

Для росту меристем оптимальною є кислотність середовища рН 5,7. При відхиленнях рН від рекомендованої потрібно довести її до оптимальної, шляхом додавання 0,1 N КОН або 0,1 N НСІ. Середовище повинне володіти достатньою буферною ємністю, оскільки в процесі культивування меристем воно буде підкислюватись.

Живильні середовища готують із реактивів високої хімічної чистоти (якої?) з перевіреним терміном придатності. Компоненти середовища розподіляють на шість груп. Цей розподіл відображає порядок приготування та зберігання концентрованих (маточних) розчинів.

- 1 - макроелементи (основні неорганічні поживні речовини);
- 2 - мікроелементи;
- 3 - джерело заліза;
- 4 - органічні добавки (вітаміни, амінокислоти);
- 5 - джерело вуглецю (сахароза, глюкоза, маніт);
- 6 - регулятори росту (ауксини (ІОК), цитокиніни (кінетин), гібереліни (гіберелін)).

Для зручності в роботі готують більш концентровані маточні розчини (Табл. 1) макроелементів (у 10 разів) і мікроелементів (у 100 разів).

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують згідно властивостей розчинності в зручних концентраціях. Розчини зберігають у холодильнику при температурі $4 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом двох місяців.

Необхідно суворо дотримуватися порядку введення кожного компоненту в поживне середовище. Гормони та вітаміни необхідно додавати останніми.

Приготування звичайного живильного середовища для культивування досить просте.

- Готують вихідні розчини неорганічних солей, мікроелементів, вітамінів і регуляторів росту рослин.
- Для приготування 1л середовища в склянку об'ємом 1л піпеткою переносять необхідний об'єм кожної з вихідних речовин.
- Додають сухі реактиви, повністю розчиняючи їх.
- Дистильованою (або бідистильованою) водою доводять до мітки 950 мл (для рідкого середовища, 600 мл для агаризованого).
- Доводять рН середовища.
- Переносять у мірні колби або циліндри і доводять до повного об'єму 1л.
- Для агаризованого середовища окремо розчиняють в 400 мл агар та з'єднують його з рідким середовищем (600 мл).
- Розливають середовище порціями в пробірки, закупорюють ватно-марлевими пробками чи фольгою. Пробірки з розлитим середовищем, ставлять у металеві бікси або в пакети з матерії й переносять в автоклав для стерилізації.
- Автоклавують залежно від об'єму середовища, відповідно 15 хв.+15 хв. під текучим паром при $t = 115-120^\circ\text{C}$ (0,7-0,8 атм). При збільшенні об'єму середовища автоклавують 25 хв. + 25 хв. під текучим паром. Слід пам'ятати, що деякі регулятори росту термолабільні, тому їх не можна автоклавувати. В такому випадку розчини цих компонентів попередньо фільтрують через скляний фільтр з порами №3,

Таблиця 1

Приготування маточних розчинів для середовища МС
(Murashige, Skoog, 1962).

Компоненти	Кількість речовини	Об'єм на 1л середовища, мл	Примітка
Макроелементи, г/л: NH_4NO_3 KNO_3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	 16,5 19,0 3,7 1,7 4,4	100	Всі інгредієнти по чергово розчиняють бідистильованою водою в концентрації, яка в 10 разів перевищує необхідну. Солі кальцію готують окремо, щоб запобігти утворенню осаду.
Мікроелементи, мг/л: KI^* H_3BO_3 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	 83 620 2230 860 25 2,5 2,5	5	Концентрація перевищує у 100 разів необхідну. * - розчиняють окремо і вводять у вигляді розчину.
Джерело заліза, мг/100 мл 1. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^1$ 2. $\text{Na}_2 \text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}^2$ (трилон - Б)	 557 745	5	Солі розчиняють при нагріванні окремо. Змішують при суворо дотриманій черговості 1+2
Органічні речовини, мг/мл Мезоінозит, мг Гідролізат казеїна, мг Тіамін HCl (B_1) Піридоксин - HCl (B_6) Нікотинова кислота Фолієва кислота Аденін сульфат Гліцин Біотин 6 – Бензил-амінопури́н (БАП) 6 – Фурфуроламінопури́н (Кінетин) Індолі́л - 3 - оцтова кислота (ІОК) 1- Нафтілоцтова кислота (НОК)	 100 1000 1:1 1:1 1:1 1:10 1:1 1:1 1:4 1:5 1:5 1:4 1:2		Розчини органічних речовин готують кожен окремо при відповідних концентраціях та зручному для роботи об'ємі. Ауксини, як правило, титрують в розчині за допомогою NaOH . Цитокиніни розчиняють у розведеному NaOH або розведеному водою спирті.

з наступною стерилізацією через мембранний фільтр діаметром пор 0,45 мкм (наприклад, фірми Millipore Ltd).

- Після стерилізації бікси чи пакети з пробірками переносять з автоклавної в передбоксник і ставлять вертикально або під невеликим нахилом, якщо необхідно одержати "косий зріз" застиглому агар-агару.

Термін зберігання середовища після стерилізації не повинен перевищувати 20-30 діб.

З літературних джерел відомі різні середовища, розроблені багатьма вченими для різних культур та різних цілей. Це середовища: Мурасіге-Скуга - 1962; Шенка-Хільдебрандта - 1972; Уайта - 1943; Хеллера; Лісмайєра - Скуга; Гамберга (В₅)- 1968; Неша - 1968; Ніча – 1969 [19].

Нами наведені прописи середовищ, модифіковані для рослин картоплі. Середовище Мурасіге-Скуга (МС) є моделлю живильного середовища для культивування в системі *in vitro* (мг/л):

Макросолі: NH₄NO₃ - 1650; KNO₃ - 1900; CaCl₂ · 4H₂O - 440; KH₂PO₄ - 170; Na₂EDTA - 37,3; FeSO₄ · 7H₂O - 27,8; Mg SO₄ · 7H₂O - 370 .

Мікросолі: H₃BO₃ - 6,2; MnSO₄ · 4 H₂O - 22,3; ZnSO₄ · 4 H₂O - 8,6; KJ - 0,83; Na₂MoO₄ · 2 H₂O - 0,25; CuSO₄ · 5H₂O - 0,025; CoCl₂ · 6H₂O - 0,025.

Вітаміни: піридоксин (В₆) - 1,0; тіамін (В₁) - 1,6; аскорбінова кислота - 3,0.

Регулятори росту: кінетин - 0,5; аденін - 0,5; гіберелін - 1,0.

Інші речовини: агар-агар – 7000; сахароза – 10000 - 20000.

Вміст регуляторів росту є визначальним фактором для успішного диференційованого росту клітин. Для різних видів і навіть сортів він варіює, тому концентрації потрібно підбирати експериментально.

Для приготування агарових середовищ додають агар в концентрації 0,6-1,0% тобто 6-10 г/л.

Для прискореного культивування меристем і живців використовують середовище за прописом Інституту картоплярства НААН (в мг на 1 л):

Макросолі: NH₄NO₃ - 1250; KNO₃ - 1100; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O - 440; KH₂PO₄ - 970; MgSO₄ · 7H₂O - 770;

Мікросолі: залишені без змін за Мурасіге-Скуга;

Органічні добавки: піродоксин (B_6) – 1,0; тіамін (B_1) – 1,6; аскорбінова кислота – 3,0; кінетин – 0,25; аденін – 0,25; гіберелін – 1,0; ІОК – 0,5 ; або хлорогенова кислота – 0,05; агар-агар – 7000; сахароза – 20000 (меристеми), 10000 (живцювання).

Щоб запобігти накопиченню продуктів метаболізму у тканинах рослин і оптимізувати їх розвиток, необхідно після розмноження на середовищі Інституту картоплярства 1-2 рази в рік робити пасаж живців на модифіковане середовище Уайта за прописом Р.Г.Бутенко [6]: **макросолі** за Уайтом; **мікросолі** за Хеллером; хелат заліза за Мурасіге-Скуга; органічні компоненти за прописом Інституту картоплярства.

3. СТВОРЕННЯ УМОВ СТЕРИЛЬНОСТІ

Стерильність є основною і необхідною умовою успіху в роботі по культурі меристем.

Стерильні роботи проводять в спеціальній кімнаті, яка обладнана ламінар-боксами (Рис.1). В якості ламінар-боксів широко використовують пилезахисні камери різних моделей та виробників, в яких через стерилізуючі фільтри подається потік повітря, що в наслідок надлишкового тиску витісняє нестерильне повітря.



Рис.1. Ламінар-бокс марки HF-48

Стіни таких кімнат облицьовують матеріалами які легко миються дезінфікуючими розчинами.

Стерильність в боксі забезпечується включенням перед роботою бактерицидної лампи з різними інтервалами часу (2 – 3 години за декілька годин до роботи) та з одночасним підтриманням чистоти і обмеженим входом сторонніх. Стерилізацію поверхні робочого стола ламінар – боксу проводять перед початком роботи протираючи спиртом.

Живильні середовища стерилізують в автоклаві (Рис.2 а.) під різним тиском та з різними режимами залежно від наповнення автоклаву та виду робіт (0,7 – 1,2 атм – 15 хвилин паром під тиском, а потім 15 хвилин тільки під тиском).

Воду, ватно-марлеві пробки стерилізують в автоклавах при 2 атм (180°C) –1 годину.

Скло та інструменти стерилізують сухим паром 2-3 години при $140 - 180^{\circ}\text{C}$. (Рис.2 б,в.)

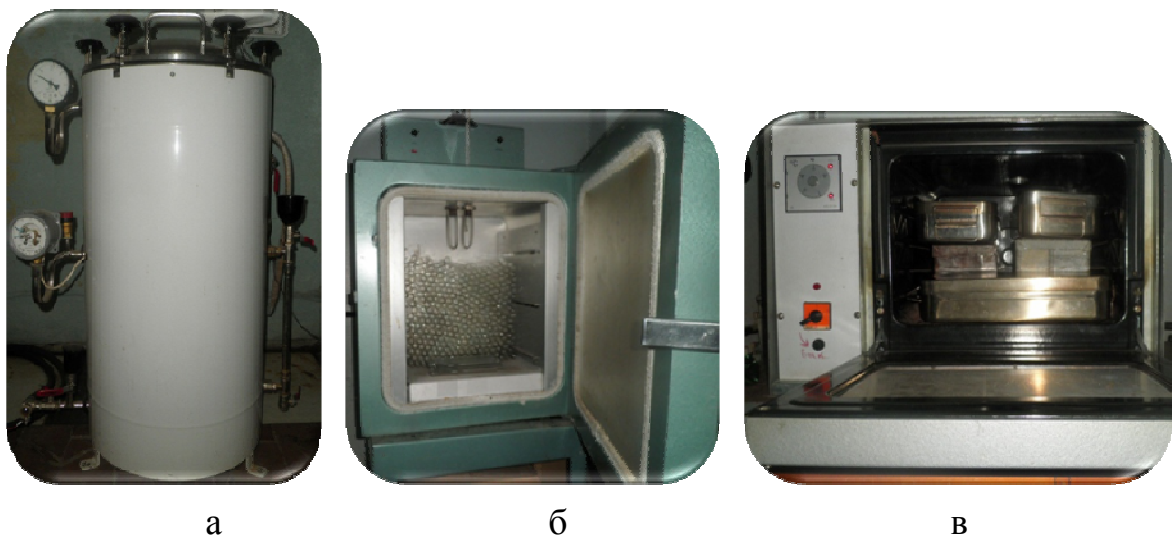


Рис.2. Стерилізація живильних середовищ, посуду, інструментів:

- а) автоклав типу ВК – 75-01;
- б) сушильно-стерилізаційна шафа ШСС-80;
- в) сушильна-стерилізаційна шафа As-21Cs

4. ВВЕДЕННЯ В АСЕПТИЧНУ КУЛЬТУРУ ТА ВИДІЛЕННЯ МЕРИСТЕМ

Для отримання стерильних меристем картоплі бульби пророщують у темряві 10-15 діб (Фото.1.). Сегменти етиольованих паростків з верхівковою брунькою розміром 2 – 3 см відламують від бульб і дезінфікують.



а

б

Фото 1. Пророщування бульб картоплі:

- а) бульби закладені у зволожений перліт;
- б) бульби пророщені у темряві

Перед стерилізацією паростки промивають теплою водою з рідким милом потім протягом 30 хв промивають проточною водою та сполоскують дистильованою водою.

Стерилізуючі засоби та експозицію стерилізації підбирають експериментально. Після певної експозиції сегмента в дезінфікуючому розчині (Табл.2) сегменти тричі промивають у стерильній дистильованій воді.

Дезінфіковані паростки переносять у стерильну чашку Петрі і додають декілька крапель простерилізованої води для попередження підсихання. Перед виділенням меристеми із верхівки паростка видаляють верхні покривні листочки, послідовно відкриваючи бічні та верхівкові меристеми з примордіальними листочками. Цю операцію проводять медичною голкою під бінокуляр з 30 кратним збільшенням з масштабною сіткою (Рис.3.).

Виділяють меристему розміром 100 мк. Кожну операцію проводять окремим простерилізованим інструментом. Після виділення меристеми на кінчику голки переносять на поверхню живильного середовища в пробірку.

Таблиця 2.

Стерилізуючи засоби

Тканина	Стерилізація	Примітка
Паростки	- препарати з активним хлором (гіпохлорид натрію чи кальцію, хлорамін, хлорне вапно) в концентрації 0,5-10 %; - ртутні препарати (сулема, діюцид) в концентрації 0,1-0,2 %; - перекис водню 10-30 %; - бромна вода 1 %; - азотнокисле срібло 0,3-1%	Концентрацію та час стерилізації підбирають експериментальним шляхом. Для різного вихідного матеріалу вони різні. Після стерилізації промивають тричі в стерильній дистильованій воді. Переносять у стерильну чашку Петрі.

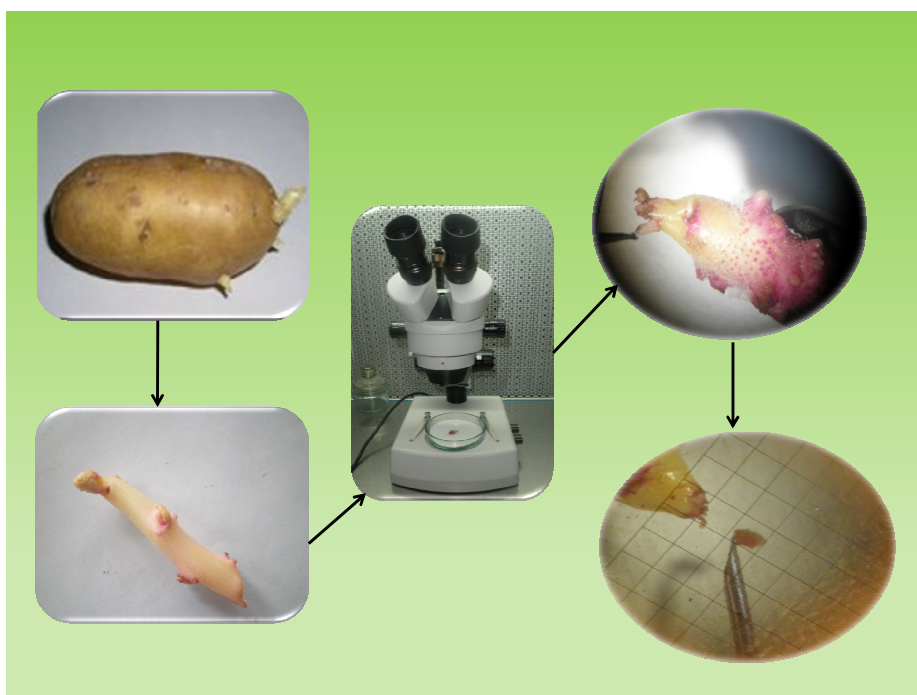


Рис.3. Схема виділення апікальної меристеми

Потім пробірку закривають пробкою над полум'ям спиртівки, маркують і ставлять у штатив.

Штативи із виділеними меристемами переносять у кліматичні кімнати із штучно регульованими режимом світла, температури і вологості (Фото.2.). Температура в кліматичних кімнатах підтримується на рівні 24-25⁰С, освітлення 6±2тис. лк., фотоперіод 16 годин, вологість 70%

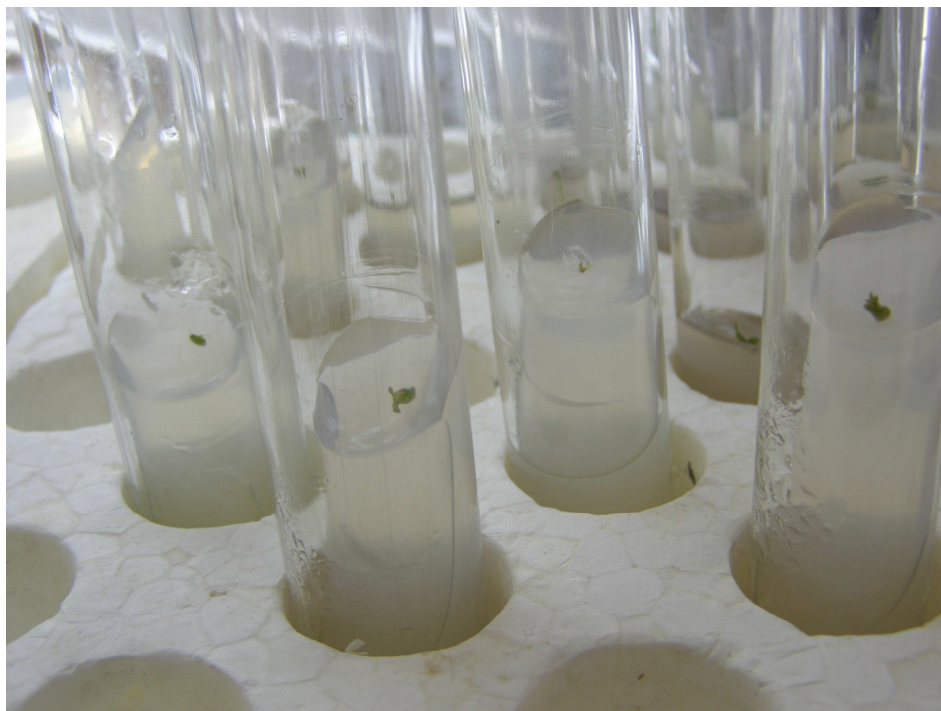


Фото. 2. Культивування меристем картоплі в культуральній кімнаті із кліматконтролем.

Час від посадки меристем до регенерації рослин складає 60 – 90 днів (Фото.3.).

Слід зазначити чим менша за розміром меристема, тим складніше вона приживається на живильному середовищі й повільніше проходить процес регенерації, тому деякі меристеми можуть залишатися живими і регенерувати через 4 – 8 місяців. При використанні методів культури апікальних меристе з хіміотерапією розмір меристем можна збільшувати до 200 мк.

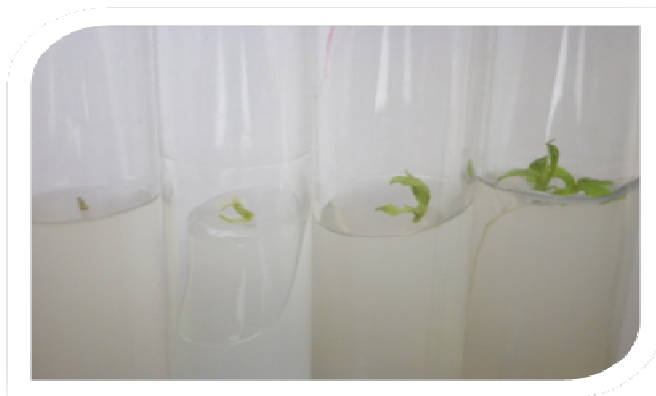


Фото.3. Регенерація меристем

5 ХІМІОТЕРАПІЯ ПРИ ОЗДОРОВЛЕННІ РОСЛИН КАРТОПЛІ

З метою підвищення ефективності оздоровлення насінневого матеріалу застосовують метод апікальної меристеми в поєднанні з методом хіміотерапії. Метод хіміотерапії базується на обробці рослин речовинами-інгібіторами вірусів або на їх додаванні до поживного середовища *in vitro*.

В цьому випадку для оздоровлення використовують різні антивірусні препарати [20] та фізіологічно активні речовини, які гальмують синтез вірусних часток. Це дає можливість отримати термінальну область апікальної меристеми більшого розміру [21,22].

В якості інгібіторів вірусів використовують ростові речовини, антибіотики, ферменти, продукти метаболізму дріжджів, грибів і бактерій, сік деяких рослин: женьшеня, алое, агави та ін., амінокислоти, нуклеїнові кислоти, барвники, аналоги пуринових піромідонових основ і т. д. Ними обробляють рослини, бульби, паростки, використовують для кореневого підживлення та додають у живильне середовище у культурі тканин (Рис. 4.) [23-28].

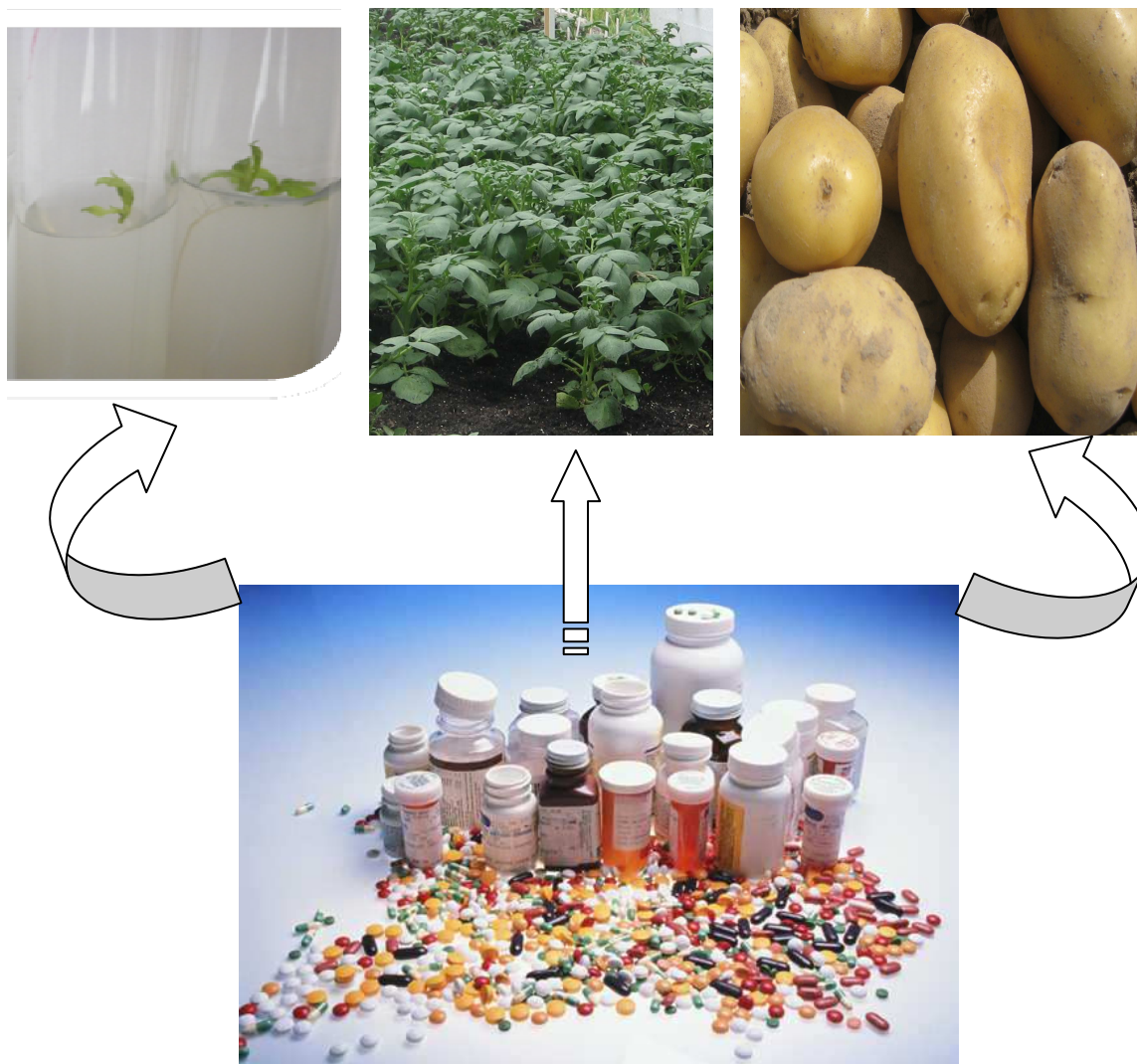


Рис. 4. Способи застосування хіміотерапії

Хіміотерапію проводять з використанням хімічних сполук, які інгібують білковий синтез в присутності двоспіральної РНК та АТФ. До таких сполук відносяться 2'-5'-олігоаденілати (2-5А), які активують латентну ендорибонуклеазу, РНК-азу, внаслідок чого проводиться розщеплення вірусної РНК [29,30]. На сьогодні встановлено, що 2-5А мають інгібуючу активність по відношенню до різних вірусів, а також впливають на процеси росту, диференціації і проліферації клітин [31]. В якості 2-5А використовують тримери 1(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4,-тріазоліл(2'-5')аденіліл(2'-5')аденозин та аденілін(2'-5')-1-(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4-тріазоліл(2'-5') аденозин, що були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії НАН [29,32]. Їх застосування для оздоровлення картоплі від комплексу вірусів (Х, S, М, Y, L) дозволяє у 3-5 разів збільшити безвірусну зону, скоротити

строки регенерації рослин в культурі *in vitro* у 2-3 рази, збільшити вихід здорових від вірусів рослин [29,33].

Дослідженнями Рейфмана В.Г. та ін. [34] встановлено здатність панкреатичної рибонуклеази інактивувати вірусну інфекцію у рослин. Про високу вірусінгібуючу дію панкреатичної рибонуклеази (при концентрації 0,001 – 0,1 %) в культурі меристем картоплі повідомляється в дослідженнях [35,36]. в результаті спільних досліджень показано, що бактеріальна ендонуклеаза може бути використана для оздоровлення рослин шляхом обробки культури апікальних меристем.

Згідно думки Р Мэтьюза [27] найбільш специфічною і інгібуючою дією на віруси рослин повинні володіти аналоги пуринових і піромідинових основ, що зустрічаються в РНК, так як РНК складає генетичний матеріал більшості вірусів рослин. В більшості випадків дослідження багатьох препаратів неорганічної і органічної природи, які володіють інгібуючою активністю по відношенню до вірусів *in vitro*, показали, що антивірусний ефект після обробки рослин, як правило, зникає, а концентрація вірусів зростає до початкового рівня [37-39]. Тому актуальним є питання визначення довгостроковості збереження оздоровчого ефекту антивірусних препаратів при репродукуванні насіннєвого матеріалу в польових умовах [39].

З літературних джерел відомо, що інактивація вірусів відбувається за рахунок прояву нуклеазами специфічної ферментативної дії – деполімеризації нуклеїнових кислот в момент їх звільнення із білкової оболонки. Але цілком можливо, що інгібуючий ефект може бути обумовлений утворенням комплексу вірус-РНК-аза [40-42].

Високу вірусінгібуючу дію має препарат синтетичного походження ДГТ (діоксігексагідро-1,3,5-тріазін). Встановлено, що обробка паростків бульб і обприскування рослин препаратом ДГТ знижувала кількість заражених вірусами рослин в залежності від сорту від 10 до 30 % [43]. Результати досліджень Борисенко С.И., Шмиглі В.А., Шустер Г. [44,45] доводять, що інгібуюча антивірусна дія препарату ДГТ в різній степені специфічна по

відношенню до окремих вірусів. Використання ДГТ шляхом додавання його в живильне середовище дозволяє збільшити розміри експлантів до 1 мм і більше при збереженні достатньо великого відсотку здорових рослин-регенерантів [46,47].

Враховуючи складність розв'язання вірусологічної проблеми в картоплярстві більшість дослідників вказують, що для оздоровлення сортів картоплі слід використовувати переважно активні методи, а саме термо- та хіміотерапію в поєднанні з культурою верхівкових меристем [29,48-50]. Лише ці методи при сильному, інколи 100%-му ураженні сортів картоплі вірусами є єдино ефективними і радикальними способами оздоровлення картоплі [51].

Отже, сучасне уявлення про інактивацію фітопатогенних вірусів, хіміотерапії та профілактику вірусних захворювань, загальні принципи та теоретичні твердження дозволяють говорити про можливість та перспективу пошуку таких антивірусних речовин, які при практичному використанні сприяють зниженню патологічної дії вірусної інфекції та економічного збитку, який вони викликають у сільськогосподарському виробництві.

Але як і всі методи оздоровлення, хіміотерапія також має свої недоліки. В основному це пов'язано з природою та концентрацією хімічної сполуки, яка додається до поживного середовища в якості антивірусного препарату. Таке поєднання стресових факторів, як культура *in vitro*, антивірусний препарат може призвести до мутації в організмі рослин, і як наслідок, отримання зміненого генотипу, що не є бажаним ефектом при оздоровленні. Адже при оздоровленні не менш важливим завданням є отримання сортотипових рослин. Тому при використанні активних методів оздоровлення необхідно приділяти велику увагу при підборі антивірусних препаратів, їх концентрацій та обов'язковою умовою є як вірусологічний, так і генетичний контроль регенерантів.

5.1 Ефективність регенерації та оздоровлення при використанні антивірусних сполук.

Дослідження по оздоровленню проводили на ранніх сортах Бородянська рожева, Дніпрянка, Повінь, Тирас, Глазурна середньоранніх Левада, Світанок Київський середньостиглих Луговська, Лілея, Явір, Билина, Калинівська та середньопізньому Червона рута. Для оздоровлення відбирали зразки на полі селекційних розсадників або у розсаднику клонів. Результати діагностики (2006-2012) показали, що від 85,7 до 100% відібраних зразків були уражені MBK, 30 – 57,1% SBK, 26,5% UVK+MBK, 16,3% УМК+ SBK, 14,2% UVK+MBK+ SBK в залежності від року досліджень, що зумовило застосувати для оздоровлення метод культури меристем у поєднанні з хіміотерапією.

За літературними даними найбільш складно оздоровити сорти від М-вірусу картоплі. Дослідники припускають, що зона меристеми вільна від MBK менша 100мкм [52,53]. Отримати достатню кількість рослин із меристем такого розміру важко технічно. Проведення оздоровлення за допомогою хіміотерапії дає можливість використовувати меристемні експланти більшого розміру (200мкм) [54].

Виділення меристем проводять за загальноприйнятою методикою асептично із апекса конуса наростання етиольованих пагонів.

Слід зазначити, що вивчення питань хіміотерапії вірусних захворювань рослин знаходиться весь час у стані активного пошуку.

В наших дослідженнях в якості антивірусних сполук вивчали ефективність дії РНК-ази, ацикловіру, аміксину ізатізону та гідрохлориду. Меристему виділяли в кількості 50 експлантів по кожному сорту. Хіміотерапію застосовували з 2-го пасажу культивування меристем до повної регенерації рослин.

РНК-азу, ацикловір та аміксин розчиняють в стерильній дистильованій воді та через фільтр Зейтца нашаровують на основне живильне середовище в Ламінар-боксі до 0,5см з метою економії препаратів (Фото 4).



а

б

Фото 4 Фільтри для стерилізації вірусінгібуючих препаратів:

а) мембранный фільтр фірми Millipore Ltd

б) фільтр Зейтца

В процесі культивування спостерігають за приживанням меристем та регенерацією рослин картоплі.

Встановлено, що використання РКН-ази, ацикловіру та аміксіну підвищує ефективність регенерації та оздоровлення рослин порівняно з контролем (культура апікальних меристем) (Табл. 3).

Слід зазначити що регенерація залежать в першу чергу від біологічних особливостей сорту, а оздоровлення від вихідної інфікованості рослин, методу оздоровлення та діагностики. У наших дослідженнях при діагностиці рослин з використанням методу ЗТ-ПЛР порівняно з ІФА вихід оздоровлених рослин зменшувався на 50-80%. В таблиці 3 наведено дані щодо діагностики ренерантів методом ІФА. Сорт Левада і Билина діагностовано методом ЗТ-ПЛР.

Таблиця 3

Ефективність регенерації та оздоровлення рослин картоплі в залежності від методу оздоровлення, %.

Сорт	Меристема		Хіміотерапія									
			РНК-аза,		Ацикловір,		Аміксин					
			0,01%		0,01%		0,05%		0,1%		0,15%	
	Р	О	Р	О	Р	О	Р	О	Р	О	Р	О
Бородянська рожева	43,7	20	60	50	-	-	-	-	-	-	-	-
Луговська	2,5	-	3,7	-	26	57	-	-	-	-	-	-
Серпанок	12	33,3	42	76,2	48	83,3	-	-	36	55,5	-	-
Слов'янка	24	91,7	48	83,3	56	78,6	-	-	40	65	-	-
Фантазія	20	90	46	78,3	50	80	-	-	38	63,1	-	-
Повінь	20	20	60	13	40	10	-	-	40	15	-	-
Левада*	58	3	40	-	60	10	-	-	94	8	-	-
Билина*	30	6	20	-	20	-	-	-	50	8	-	-
Тирас	30	16	75	20	60	33	50	40	80	13	30	16
Червона рута	20	25	80	25	55	27	65	38	65	31	10	-
Глазурна	46	17	62	29	62	35	-	-	62	26	-	-
Світанок київський	50	16	92	24	88	20,4	-	-	64	41	-	-

Р - регенерація

О – оздоровлення

- результат не отримано

*- рослини діагностовано методом ЗТ-ПЛР

Ізатізон додавали методом – нашаровування у трьох концентраціях 0,0033%, 0,005% , 0,01% для меристем і 0,085%, 0,01%, 0,02% для пагонів,

Гідрохлорид відповідно в концентраціях 1,6µM, 3,2µM, 4,8µM для меристем і 3,2 µM, 6,4 µM, 9,6 µM для пагонів. В процесі досліджень виділено 211 меристем та 175 паростків сорту Базис, 202 меристеми та 166 паростків сорту Билина, 170 меристем та 161 паросток сорту Щедрик (Табл. 4). Наявність вірусної інфекції перевіряли методом ЗТ-ПЛР.

Таблиця 4

Ефективність оздоровлення,%

Сорт	Хіміотерапія											
	Ізатизон						Гідрохлорид					
	Меристема			Паросток			Меристема			Паросток		
	Вилілено, шт	Регеновано,шт	Оздоровлено,%	Вилілено, шт	Регеновано,шт	Оздоровлено,%	Вилілено, шт	Регеновано,шт	Оздоровлено,%	Вилілено, шт	Регенерантів,шт	Оздоровлено,%
Базис	106	65	2	88	43	1	105	71	5	87	72	0
Билина	101	47	4	83	65	0	101	55	2	83	60	0
Щедрик	85	25	0	81	37	0	85	28	0	80	33	0

У результаті спостережень відмічено регенерацію меристем по сортах Базис та Билина на 4-ому пасажі, по сорту Щедрик на 5-6 пасажі. Пагони регенерували на 1-му пасажі. Ефективність оздоровлення з використанням даних речовин дуже низька, по сорту Базис становила 8%, Билина – 6,9%. По сорту Щедрик оздоровчого ефекту не досягнуто.

Отже, пошук нових антивірусних препаратів для хіміотерапії є важливим завданням, оскільки існуючий їх спектр, який виявляє антивірусну дію щодо фітовірусів, є занадто вузьким а для використання у практиці майже не доступним. Важливою умовою перед початком використання нових речовин у дослідях з оздоровленням є проведення біологічного тесту на вірусні частинки в соку інфікованих рослин.

6 ДІАГНОСТИКА X,- Y,- S,- L,- M-ВІРУСІВ ТА ВІРОЇДУ ВЕРЕТЕНОПОДІБНОСТІ БУЛЬБ КАРТОПЛІ НА ОСНОВІ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ЗІ ЗВОРОТНЬОЮ ТРАНСКРИПЦІЄЮ

Однією з передумов високої продуктивності сортів картоплі є використання якісного, вільного від фітопатогенів різної природи оздоровленого насіннєвого матеріалу. Останнім часом особливу увагу привертає віроїд веретеноподібності бульб картоплі (ВВБК) та патогени вірусного походження, які найважче виявити через складнощі, що пов'язані із внутрішньоклітинним паразитизмом та латентною формою ураження [55].

На сьогодні виникла необхідність впровадження в лабораторну практику комплексу біологічних, біохімічних та молекулярних методів вірусологічного контролю оздоровлених ліній картоплі. В зв'язку з цим отриманий оздоровлений матеріал картоплі повинен тестуватися на присутність збудників вірусних та віроїдних хвороб з використанням комплексу найбільш сучасних і високочутливих методів лабораторної діагностики: імунофлуоресцентної мікроскопії (ІФМ), полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР), молекулярно-гібридизаційного аналізу (МГА), тощо [56].

У даному випадку основним найбільш чутливим та доступним діагностичним інструментом досліджень є полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). За допомогою методів в основі яких лежить ПЛР можна ампліфікувати (розмножити) послідовність ДНК в мільйони раз до кількості яка легко виявляється електрофорезом (Фото 5,6.). А у випадку об'єктів РНК-вої природи, до яких відносяться віруси картоплі та віроїд веретеноподібності бульб, попередньо до ПЛР проводять реакцію зворотної транскрипції, що дозволяє на РНК як на матриці синтезувати комплементарну їй молекулу ДНК (кДНК).



Фото 5 Ампліфікатор фірми Eppendorf

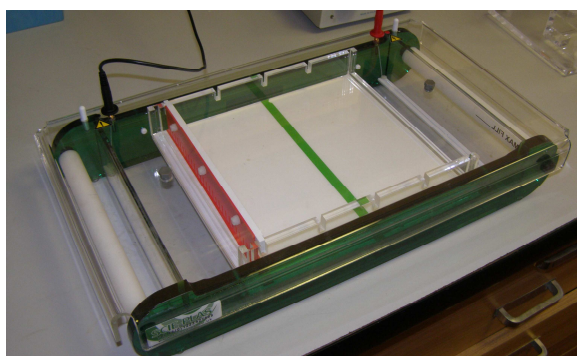


Фото 6 Горизонтальний електрофорез фірми Sigma

Виділення РНК із рослинного матеріалу та реакцію ПЛР зі зворотною транскрипцією проводять комерційними наборами (наприклад «Macherey-Nagel» (Германія), «Applied Biosystems» (США), «Fermentas» (Литва), «Изоген», «Амплисенс» (Росія)) згідно інструкцій виробника. Обов'язковим є включення позитивного (Х,- Y,- S-, L,- М-вірусів картоплі, віроїду веретеноподібності бульб) та негативного (вода) контролів.

Рибонуклеїнова кислота легко деградує під дією екзогенних та ендогенних РНКаз, тому процес її виділення потребує максимальної чистоти та попередньої підготовки до роботи. Усі розчини для виділення РНК, слід готувати на стерильній *Milliq*-воді, обробленій 0,05-0,1 % ДЕПК, який інактивує РНК-ази, бактерій та грибів що можуть поширюватися із пилом.

Посуд багаторазового використання доцільно обробляти 0,1 М NaOH. Для того, щоб уникнути забруднення, потрібно дотримуватися стандартної мікробіологічної технології роботи – працювати в стерильних умовах у рукавичках, відкриваючи реактиви на короткий час.

З отриманої сумарної РНК необхідно отримати (+)РНК комплементарну ланцюгу ДНК (кДНК). Для цього проводять реакцію зворотної транскрипції. Синтез першого ланцюга комплементарної кДНК ініціюють за допомогою спеціалізованих наборів, що вказані вище. Для підвищення чутливості потрібно щоб реакція проходила не менше 1 год. незалежно від використовуваних наборів. Отриману кДНК використовують для постановки реакції ампліфікації.

До ПЛР суміші додають по 10 пкМ кожного з праймерів: ХВК F (5'-tagcacaacacaggccacag -3', ХВК R 5'- ggcagcattcatttcagcttc -3') 562 п.н.; YBK F (5'-cacgattgctcaagcaagaa -3'), YBK R (5'- ggcggagtatgcaccaagta -3') 412 п.н.; SBK F (5'- tggcgaacaccgagcaaatg -3'), SBK R (5'- atgatcgagtccaagggcactg -3') 213 п.н.; LBK F (5'- cgcgctaacagagttcagcc -3'), PLRB R (5'- gcaatgggggtccaactcat -3') 336 п.н.; PSTV F (5'- ggatccccggggaaacctggagcg -3'), PSTV R (5'- ggatccctgaagcgctcctccgagc -3') 360 п.н. [57] та MBK (M1 5'- ctgaaaatatgcgccttg -3'; M2 5'- cggcatctgcagttatag -3') 288 п.н., які розроблено на базі кафедри вірусології Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка.

Ампліфікацію проводять в наступному температурному режимі: температура плавлення кДНК – 94°C, відпалу – 55 °C, синтезу – 72 °C, кількість циклів ампліфікації 35.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 1,5%-му агарозному гелі, що містить бромистий етидій (0,5 мкг/мл) протягом 30-60 хв. за напруги 5 В/см² довжини камери. Гель досліджують в умовах ультрафіолетового випромінювання за довжини хвилі 312 нм. Для фотографування можна використовувати цифрову фотосистему зі спеціальним фільтром (Фото 7) .

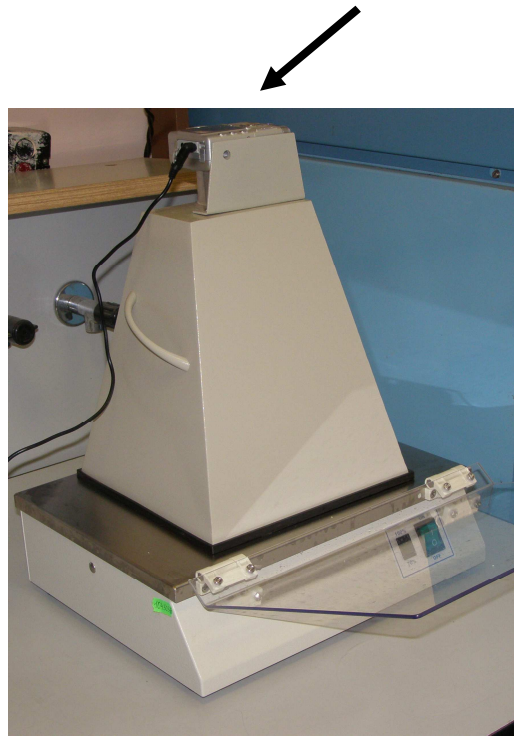


Фото 7 Трансільюмінатор ECX-20.M із цифровою фотосистемою.

Розміри продуктів ампліфікації визначають за допомогою маркера довжин фрагментів та комп'ютерної програми, наприклад BioTest Color (Росія).

Критерієм наявності X,- Y,- S-, L,- M-вірусів картоплі та віроїду веретеноподібності бульб у зразках є їх флуоресценція в ультрафіолетовому світлі відповідно до очікуваних розмірів (PVX – 562 п.н., PVY – 412 п.н., PVS – 213 п.н., PLRV – 336 п.н., PSTV – 360 п.н., PVM – 288 п.н.), що встановлюється при порівнянні з маркером молекулярної маси. (Рис. 5).



Рис. 5. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з наборами фірм «Fermentas» та «Амплісенс» рослини картоплі ураженої комплексом вірусних хвороб (позитивний контроль):

- 1 – позитивний контроль (набір «Fermentas»);
- 2 – позитивний контроль (набір «Амплісенс»);
- 3 – негативний контроль («Fermentas»);
- 4 - позитивний контроль в мультиплексній реакції (набір «Fermentas»);
- 5 - негативний контроль в мультиплексній реакції («Fermentas»);
- М – маркер довжин фрагментів.

Таким чином, використання сучасних високочутливих лабораторних методів діагностики хвороб є обов'язковим етапом технології виробництва оздоровленого матеріалу.

7 ОЦІНКА МІНЛИВОСТІ ОЗДОРОВЛЕНИХ ЛІНІЙ МЕТОДАМИ RAPD- ТА ISSR-ПЛР

Виділення меристем і вирощування їх на штучному живильному середовищі, яке містить макро- і мікроелементи, стимулятори росту, а також хіміотерапія призводять до утворення метаморфізмів, можливих модифікацій і фізіологічних аномалій [58-62].

Згідно дослідних даних ряду дослідників умови *in vitro* можуть призвести до появи рослин, неоднорідних не лише за господарсько-цінними показниками, але і рослини можуть мати фенотипові відмінності та різні строки проходження фенофаз [58,59].

При оздоровленні рослин досить важливою умовою є збереження господарсько-цінних ознак сорту. На сьогодні в літературі зустрічається багато тверджень, які є діаметрально протилежними [63]. Так деякі автори [58,59,64] вважають, що в ряді випадків у меристем картоплі спостерігається мінливість, яку Ю.Т. Трінклер називав “розщепленням”, вбачаючи її причину в химерності тканин.

Тому в насінництві картоплі необхідною умовою є контроль оздоровлених ліній за господарсько-цінними показниками, фенотипом та генотипом протягом декількох років [62].

Сьогодні найбільш ефективною технологією для виявлення поліморфізму на рівні ДНК є використання "мікрочіпа" на основі поліморфізму по одиничному нуклеотиду – SNP (Single Nucleotide Polymorphism) [65]. Даний метод робить генетичний аналіз максимально спеціалізованим і дозволяє вивчати відмінності на рівні тканин одного організму, однак в зв'язку з високою вартістю його застосування досить обмежене. Серед найбільш поширених методів виявлення поліморфізму в послідовностях ДНК виділяють наступні: аналіз поліморфізму з допомогою ПЛР (RAPD, ISSR, AFLP та SSR) [65].

Для молекулярно-генетичного аналізу беруть оздоровлені рослини *in vitro* одного сорту та контроль, яким слугує ДНК із сортотипої польової рослини. ДНК із листків виділяють водно-фенольним методом [66] або з використанням комерційних наборів, що забезпечують чистоту отриманих препаратів не менше 1,8 за співвідношенням A_{260}/A_{280} (поглинання світла при довжинах хвиль 260 та 280 нм). Якість виділеної ДНК контролюють за допомогою електрофорезу (1,5% агарозний гель в 1X TBE буфері з 0,5 мкг/мл бромистого етидію, при напрузі 5 В/см² довжини камери, 30-60 хв.), де вона повинна мати вигляд дискретної смуги, без значних слідів розпаду (шимерів) (Рис. 6).

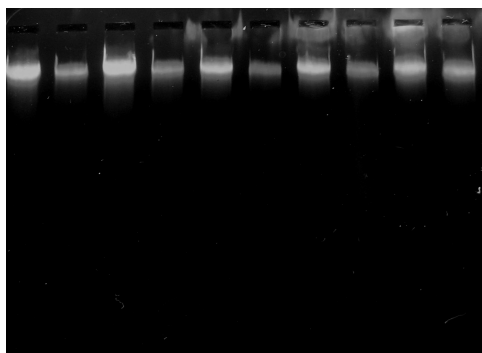


Рис. 6. Електрофорез ДНК листків рослин картоплі в 1,5% агарозному гелі.

Молекулярно-генетичний аналіз геномної ДНК оздоровлених ліній картоплі рекомендується проводити двома методами: RAPD, ISSR-ПЛР. Для дослідження потрібно використовувати один декамерний RAPD праймер BL-26 (5' gtagctgacg 3') [67] та два тринуклеотидних ISSR праймери gag(caa)₅,

ctg(ag)₈ [68], які за нашими попередніми результатами є найбільш ефективними [69,70].

Для проведення RAPD-ПЛР готують суміш, в яку по чергові вносять наступні компоненти: 1x ПЛР-буфер, 0,25 мМ дНТФ, 1,25 од. Taq-полімерази, 100 нг. геномної ДНК, 3,5 мМ MgCl₂ та 10 пкМ праймера. Ампліфікацію реакційної суміші об'ємом 15 мкл проводять в наступному температурному режимі: початкова денатурація – 1 хв. за температури 95°C; 35 циклів: 10 с. за 94 °C, 30 с. за 43 °C, 30 с. за 72 °C; термінальна елонгація – 7 хв. за 72 °C.

Для проведення ISSR-ПЛР готують суміш, з наступною черговою компонентів: 1x ПЛР-буфер з 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ дНТФ, 10 пкМ праймеру, 1,25 од. Taq-полімерази та 1 мкл виділеної ДНК, у концентрації 40-50 нг. Ампліфікацію реакційної суміші об'ємом 25 мкл проводять в температурному режимі: початкова денатурація – 1 хв. за температури 95°C; 30 циклів: 1 хв. за 94 °C, 1 хв. за 58 °C, 4 хв. за 72 °C; термінальна елонгація – 7 хв. за 72 °C.

Електрофоретичний розподіл продуктів реакції здійснюють в 1,5% агарозному гелі з 0,5 мкг/мл бромистого етидію, в 1X TBE буфері [71] при постійній напрузі 5 В/см² довжини камери, 60-90 хв.

Гель поміщають на транслюмінатор та фотографують за допомогою цифрової фотосистеми. Далі проводять визначення довжин продуктів реакції відносно маркеру довжин фрагментів за допомогою комп'ютерної обробки отриманої фотографії (програмою GelPro Analyser 6.0, чи аналогічною).

Зразок вважається сортотиповим і допускається для продукції мінібульб, якщо кількість та довжина смуг його електрофоретичного профілю ідентична контрольній доріжці гелю (Рис. 7,8).

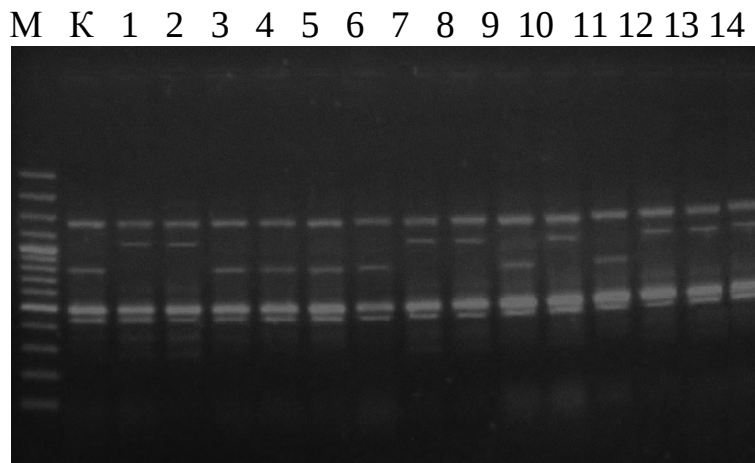


Рис. 7. Результати RAPD-ПЛР оздоровлених ліній картоплі з праймером BL-26:

1, 2, 7, 8, 10, 12-14 – несортотипові лінії;

3-6, 9, 11 – сортотипові лінії;

К-контрольна рослина;

М-маркер довжин фрагментів.

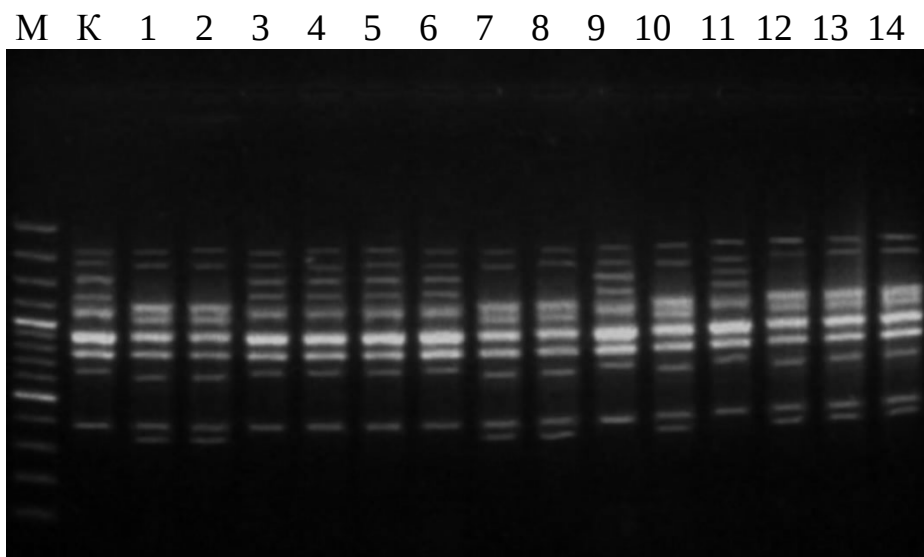


Рис. 8. Результати ISSR-ПЛР оздоровлених ліній картоплі з праймером ctg(ag)₈:

1, 2, 7, 8, 10, 12-14 – несортотипові лінії;

3-6, 9, 11 – сортотипові лінії;

К-контрольна рослина;

М-маркер довжин фрагментів.

8 РОЗМНОЖЕННЯ ОЗДОРОВЛЕНИХ ЛІНІЙ КАРТОПЛІ

Стерильні рослини картоплі розмножують живцюванням. Процес живцювання здійснюється наступним чином. В ламінар-боксі верх пробірки протирають спиртом, відкривають пробірку, рослину стерильним пінцетом виймають із пробірки та кладуть на стерильну чашку Петрі. В чашці Петрі розрізають її скальпелем на живці з одним листком та зовнішньою брунькою. Частина стебла над листочком в 2-3 рази менша ніж під листочком. Пінцетом живці переносять у пробірки з середовищем для живцювання (Рис.9.).

Частина стебла повинна бути заглиблена в агар таким чином, щоб зовнішня брунька знаходилась на його поверхні. Кількість живців із однієї рослини 5-8 штук. Живцювання кожної рослини здійснюється в окремій чашці Петрі. Інструменти замінюють, або ж стерилізують над полум'ям спиртівки.

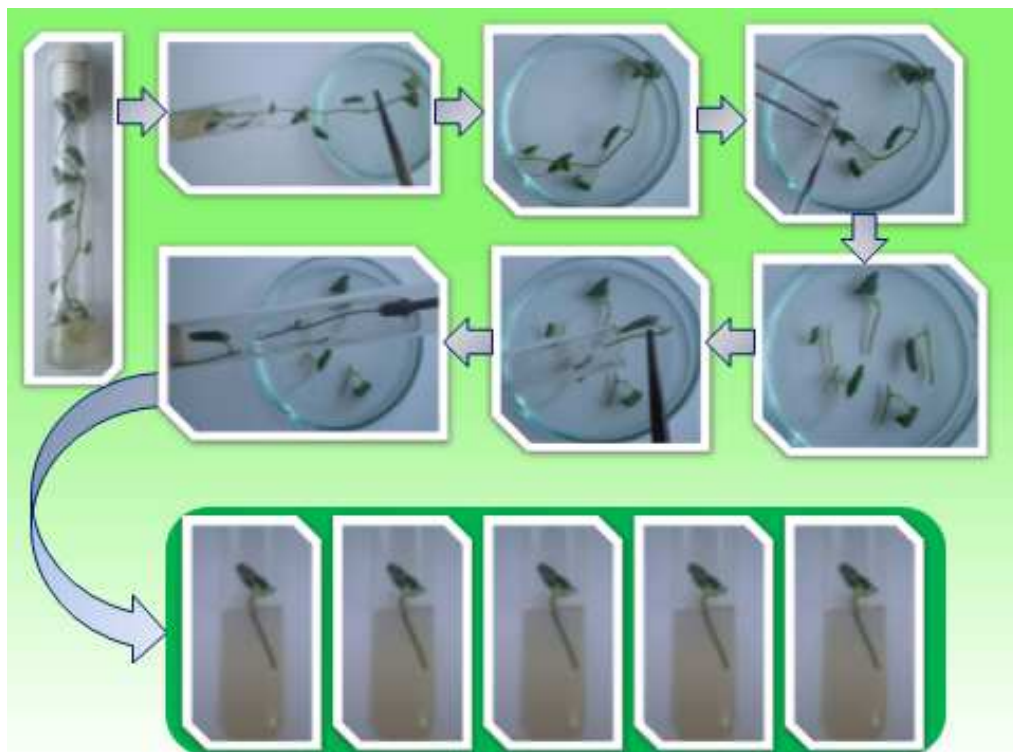


Рис.9. Схема живцювання регенованих рослин в асептичних умовах

По закінченню живцювання чашки Петрі протирають спиртом, інструменти прокалюють над спиртівкою, складають у бокси і стерилізують в

сушильний шафі. Кожне наступне живцювання регенерованих із живців рослин проводять через 20 – 25 днів.

Рослини вирощують в кліматичній кімнаті при температурі 18 – 25 °С, освітленості 3500 – 5000 лк, відносній вологості повітря 70 %, фотоперіоді 16 годин.

Культура апікальних меристем набула масового впровадження в насінництві не тільки завдяки оздоровчому ефекту, але й завдяки масовому та прискореному розмноженні рослин в лабораторних умовах круглий рік [72-76]. Це дозволяє отримати в культурі *in vitro* десятки тисяч рослин (Рис. 10.) придатних до висадки у весняний період в умови *in vivo* [77-79].

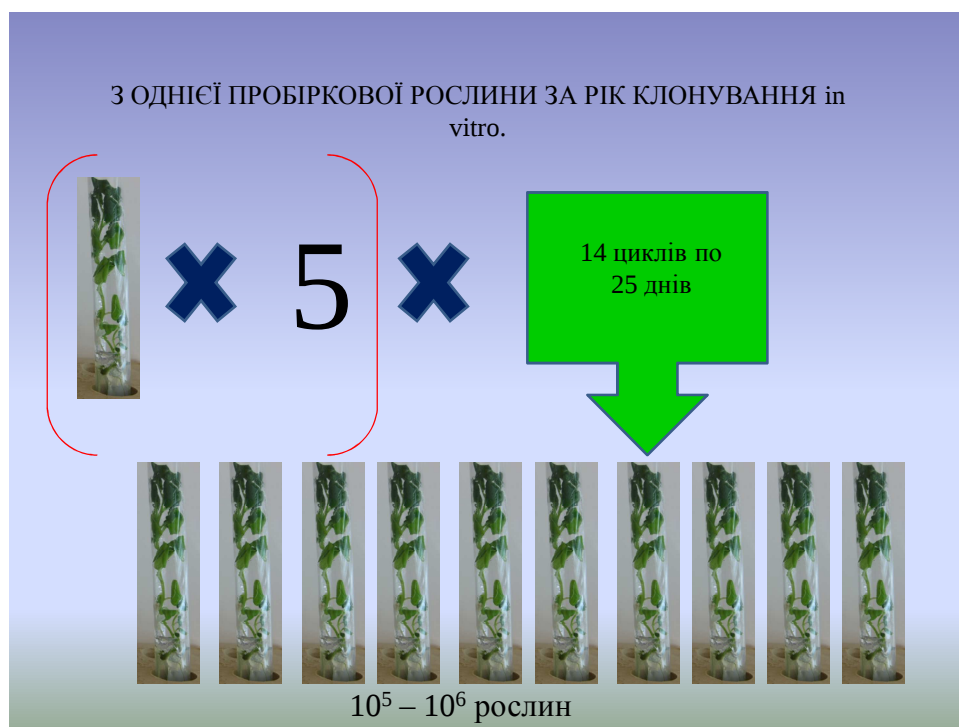


Рис. 10. Прискорене розмноження рослин *in vitro* в лабораторних умовах

9 ПІДТРИМКА КОЛЕКЦІЇ У БАНКУ ОЗДОРОВЛЕНИХ *in vitro* СОРТІВ КАРТОПЛІ.

В зв'язку з необхідністю щорічного отримання великих об'ємів рослин *in vitro* того чи іншого сорту для цілей насінництва існує потреба у підтримці колекції оздоровлених сортів картоплі. Таку колекцію підтримують шляхом

постійного культивування в культурі *in vitro* при періодичному живцюванні на свіжі живильні середовища (Табл.5.,Фото7).

Таблиця 5.

Середовище для розмноження рослин *in vitro*, мг/л

Компоненти	Кількість
Макроелементи	по М-С (100мл)
Мікроелементи	по М-С (5мл)
Fe - хелат	по М-С (5мл)
B ₁	2,0
B ₆	0,8
ІОК	0,1
Сахароза	10000
Агар	0,7%

pH 5,6 – 5,8



Фото 7 Колекція Банку *in vitro* оздоровлених сортів картоплі

Для більш довготривалого зберігання зразків із рослин *in vitro* отримують мікробульби, які потім відділяють від рослин і висаджують в пробірки з агаром (Фото 8).



Фото 8 Мікробульби культури *in vitro*

Щорічно рослини колекції діагностують на вірусоносійство методом ПЛР.

На сьогодні в Інституті картоплярства НААН підтримується Банк *in vitro* оздоровлених сортів, в який налічує 210 зразків.

Враховуючи результати багаторічних досліджень можна зробити висновок що Модель оздоровлення сорту (Рис. 11) повинна складатися із наступних складових:

- добір вихідного матеріалу в розсаднику клонового добору;
- тестування рослин *in vivo* на наявність вірусної інфекції в період вегетації з використанням ЗТ - ПЛР аналізу;
- вибраковування зразків із вірусною інфекцією;
- ідентифікація сортотиповості відібраних для оздоровлення зразків методом ПЛР;
- підготовка бульбового матеріалу до виділення меристем;
- діагностика вірусоносійства, ЗТ-ПЛР аналіз;
- використання методу культури меристем *in vitro*, або в поєднанні з методами термо- та хіміотерапії;
- регенерація та розмноження рослин;
- тестування рослин-регенерантів на наявність вірусів методом ЗТ-ПЛР;
- вивчення мінливості ліній після оздоровлення;

- морфологічна тест-оцінка на касетній розсаді;
- тестування рослин в касетах на наявність вірусів методом ЗТ-ПЛР;
- вивчення в польових умовах за господарськи цінними показниками;
- контроль вірусної інфекції;
- занесення до Банку *in vitro* оздоровлених сортів.

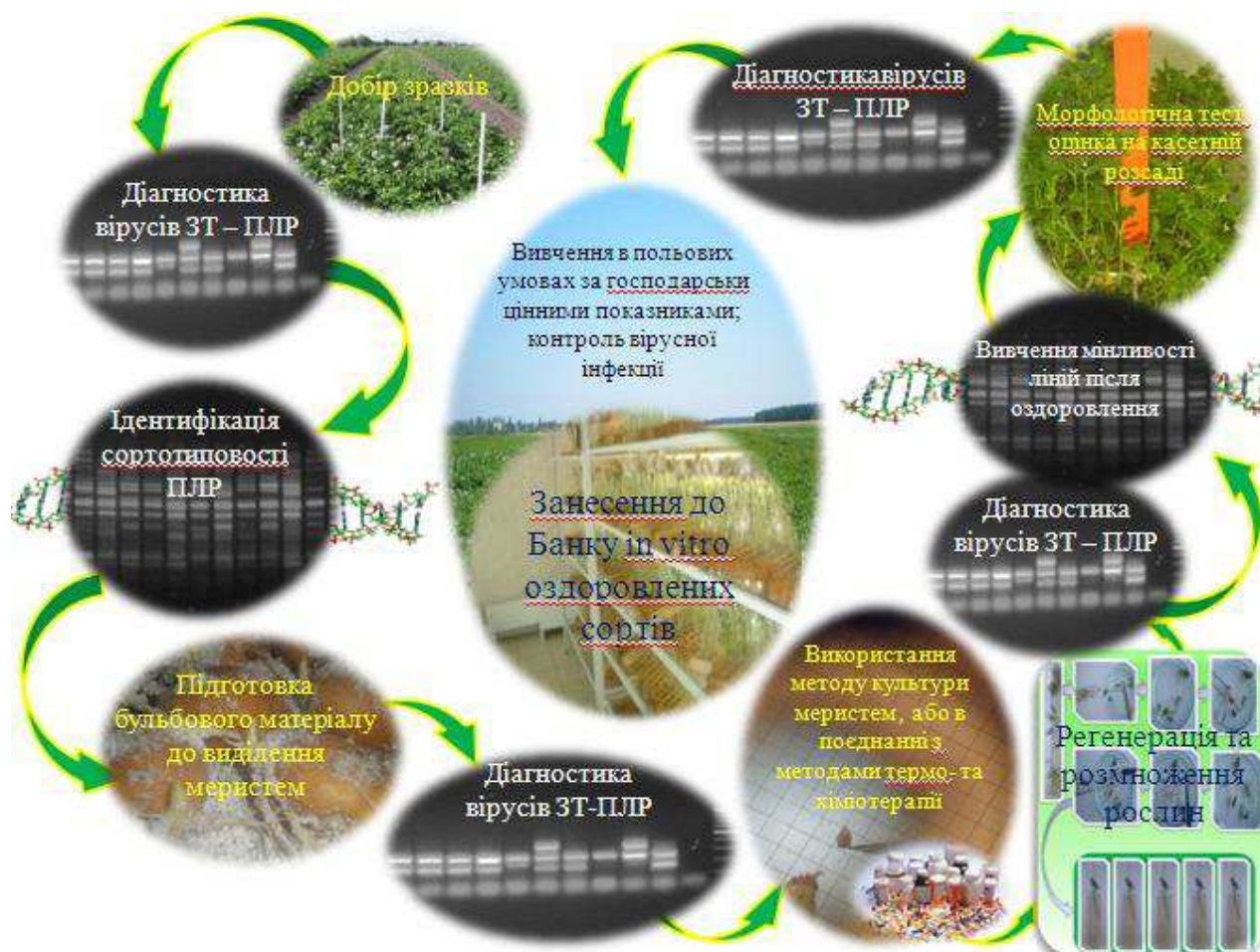


Рис. 11 Модель оздоровлення сорту.

10 ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ МЕТОДУ КУЛЬТУРИ АПКАЛЬНОЇ МЕРИСТЕМИ В ПОЄДНАННІ З ХІМІОТЕРАПІЄЮ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ СУЧАСНИХ МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Основні критерії економічної ефективності картоплярства обумовлюються необхідністю зростання продуктивності праці, зниженням

собівартості одиниці продукції, підвищенням рентабельності та прибутковості. Рівень економічної ефективності вирощування картоплі прямо залежить від досягнутої врожайності. Відомо, що при відмінній організації насінництва можна підвищити урожайність принаймні на 20-30%. Крім того, своєчасні сортопоновлення чи сортозаміни оздоровленим насіннєвим матеріалом кращих районованих сортів картоплі сприяє підвищенню якості продукції

Перехід системи насінництва картоплі в Україні на ринкові засади відбувається складно і супроводжується зменшенням об'ємів, зниженням якості садивного матеріалу та конкурентоздатності сортів. У вирішенні даної проблеми велике значення має освоєння на регіональному рівні науково-обґрунтованих схем насінництва і технологічних регламентів виробництва якісної насіннєвої картоплі.

На базі Інституту розроблено схему отримання оздоровленого насіннєвого матеріалу, що включає процес оздоровлення в культурі *in vitro*, ЗТ-ПЛР тест-систему контролю вірусоносійства та ПЛР метод підтвердження сортотиповості.

Економічне обґрунтування оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальної меристеми в поєднанні з хіміотерапією базується на розрахунках витратного механізму технологічної карти (Табл. 6.). Включення в технологічний процес оздоровлення вірусінгібуючих препаратів, сучасних молекулярно-біологічних методів діагностики вірусів та ідентифікації сортотиповості в культурі *in vitro*, дасть можливість провести якісну оцінку отриманих ліній картоплі. Своєчасне бракування несортотипових та ліній, які є носіями вірусної інфекції зменшить затратний механізм при випробуванні великого об'єму ліній в польових умовах на продуктивність та сортотиповість.

Таблиця 6

Технологічна карта оздоровлення сорту картоплі методом апікальної меристеми в поєднанні з хіміотерапією
(100 шт пробіркових рослин, одного сорту).

Ціни станом на 01.01.2015.

Найменування робіт	Одиниця виміру	Обсяг робіт	Норма виробітку	Кількість нормозмін	Оплата праці, грн	Електроенергія		Вода		Матеріальні витрати, грн.
						кВт	вартість, грн.	витрата, куб	вартість, грн.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Відбір зразків in vivo	шт	20	40	0,5	47,72					47,72
ПЛР-аналіз вірусної інфекції (5 вірусів), віроїд веретено-подібності бульб	шт	100								8290,66
Перевірка сортотиповості	шт	100								12056,91
Миття пробірок:	шт	400	800	0,5	47,72					49,26
- нагрів води	л	24	96	0,25		2	2,14			
- миючі засоби	г	100								2
- витрата води	л	44						0,44	5,69	5,69
- стерилізація	год	8	8	1		3,04	3,25			3,25
Всього:										60,2
Виготовлення пробок:	шт	400	200	2	190,86					190,86
- вата	кг	1,6								30,4
- марля	м	20								66,8
- нитки	кот	4								58
Всього										346,06
Приготування бідистилату	л	5	32	0,156	14,89	6,5	6,96	1,2	15,52	37,37
Приготування середовища:	л	4	12	0,33	31,49					31,49

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
- мінеральна основа	л	0,4								1,37
- органічна основа	л	4								3,60
вітаміни, регулятори росту	л	4								30,91
Всього										67,37
Автоклавування	год	1	8	0,125	28,41	5	5,35			33,76
Стерилізація інструментів	год	8				3,04	3,25			3,25
Виділення меристеми:	шт	100	133	0,75	71,57					71,57
стерилізація ламінара	год	2				0,2	0,21			0,21
робота ламінар-боксу	год	6				4,44	4,75			4,75
- робота мікроскопа	год	6				0,06	0,06			0,06
- спирт	мл	20								1,40
- білізна	мл	30								0,21
Хіміотерапія										1600
Всього										1678,2
Культивування в кліматичних кімнатах: електроенергія	зр	100				264	281,41			282,48
Живцювання рослин:	шт	100	50	2	190,86					190,86
робота ламінар-бокса	год	16	8	2		11,84	12,67			12,67
Всього										203,53
ПЛР-аналіз вірусної інфекції (5 вірусів), віроїд веретеноподібності бульб	шт	100								8290,66
Перевірка сортотиповості	шт	100								12056,91
Витрати за технологічною картою										43418,07

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
В т.ч. на: <u>оплату праці</u> <u>реактиви</u> матеріали										623,52
										42295,14
										499,41
Знос основних засобів										145
Комунальні послуги										182,9
Накладні										4171,3
ВСЬОГО										47917,27
Собівартість одного зразка										479,17

ЗАКЛЮЧЕННЯ

В сучасних умовах сільськогосподарського виробництва насінництво картоплі вимагає прискореного розмноження нових сортів на основі насіння високих категорій. Значним резервом для формування високопродуктивного насіння є використання оздоровленого *in vitro* вихідного матеріалу та використання різних методів прискореного розмноження.

В Інституті картоплярства НААН розроблено ефективні методи оздоровлення картоплі за допомогою культури апікальних меристем в поєднанні з термо- та хіміотерапією.

Використання методу культури апікальних меристем, саме по собі не дозволяє досягнути повного елімінування вірусів, що обумовлене біологічними особливостями останніх. Кожен збудник знаходиться в тканинах на певній відстані від термінальних клітин. Максимальна зона апікальної меристеми, вільна від фітовірусів надзвичайно мала (0,1-0,2 мм), що ускладнює її виділення і введення в культуру. Тому з метою підвищення ефективності оздоровлення доцільно поєднувати метод культури апікальних меристем в поєднанні з хіміотерапією.

Проведення оздоровлення за допомогою хіміотерапії дає можливість використати меристему більшого розміру, а застосування вірусінгібуючих препаратів підвищити ефективність оздоровлення.

Слід пам'ятати, що таке поєднання методів оздоровлення підвищує мутагенний потенціал умов культивування, в зв'язку з чим окрім контролю ефективності оздоровлення на ключових етапах процесу, доцільно здійснювати оцінку сортотиповості регенерантів методами молекулярної біології.

Отже технологія оздоровлення картоплі *in vitro* повинна включати групу методів, що застосовуються для одержання оздоровлених рослин і їх розмноження та діагностичні методи, що забезпечують бракування вражених рослин на всіх стадіях процесу оздоровлення. Очевидно, що тільки висока ефективність обох груп методів може гарантувати високу якість оздоровлення.

В даних методичних рекомендаціях, на основі власного багаторічного досвіду розкрита схема оздоровлення картоплі методом культури апікальної меристеми в поєднанні з хіміотерапією та представлена модель оздоровлення сорту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Адамова А. И. Эффективность оценки и отбора исходных оздоровленных линий для использования в оригинальном семеноводстве // Вопросы картофелеводства: материалы науч.-практ. конф. «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы» (к 70-летию ВНИИКХ). – М., 2001. – С. 189–195.
2. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук – К.: Наукова думка, 1980. – С. 246–248.
3. Morel G. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus / G. Morel, C. Martin // C. R. Acad. Agric. France. – 1955. – Vol.41, №10. – P. 472–475.
4. Morel G. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus / G. Morel, C. Martin // Compt. Rend. – 1952. – V.38. – P. 1324–1325.
5. Limasset P. Recherche de virus de la mosaïque du tabac (Marmor Tabaci, Holms) dans les meristemes des plantes infectées / P. Limasset, P. Cornuet // C. R. Académie scientifique D. – 1949. – V 23. – P. 1971–1972.
6. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. / Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 270 с.
7. Meristem culture. – In: Plant tissue culture methods / [K. K. Kartha, Ed. O. L. Gamborg, L. R. Wetter Saskatoon; Saskatchewan]. – Nat. Res. Council. Canada, 1975 – 320p.

8. Quak F. Meristem culture and virus-free plants. In: Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture // F. Quak, Ed. J. Reinert, Y. P. S. Bajaj. – Berlin ets.: Springer – Ver l., 1977. – P. 598–616.
9. Нурмистре Б. Х. Метод меристемнотканевой культуры в семеноводстве картофеля с точки зрения наследственной вирусной инфекции // Б. Х. Нурмистре // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. – 168 с.
10. Трофимец Л. Н. Современённые методы получения безвирусного картофеля // Л. Н. Трофимец // Вестн. с.-х. науки. – 1976. – №3. – С. 150–153.
11. Герасимов С. Б. К вопросу о безвирусном семеноводстве картофеля / С. Б. Герасимов, Ю. А. Леонтьева // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе. – Владивосток, 1985. – С. 68–72.
12. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / [відповідальний ред. В. В. Кононученко]. – Немішаєве: Інститут картоплярства НААН, 2002. – 182 с.
13. Слободян К. А. Оздоровлення картоплі від вірусних хвороб з використанням методу хіміотерапії / К. А. Слободян, Т. М. Олійник, С. О. Слободян // Генوم рослин – Одеса, 2008. – С.216–219.
14. Бондарчук А. А. Біотехнологічні аспекти оздоровлення картоплі / А. А. Бондарчук, Т. Н. Олейник // Бюлетень Нікітського ботанічного саду. – 2009. – Вип.99. – С.100–103.
15. Олійник Т. М. RAPD-аналіз геномної ДНК оздоровлених ліній сорту Левада / Т. М. Олійник, С. О. Слободян, Р. В. Грицай // Картоплярство. – 2010. – Т.39. – С. 30–38.
16. Трускинов Э. В. Меристемный картофель: особенности и проблемы получения и использования. // Материалы Междунар. юбил. науч.-практ. конф., посвят. 75-летию Ин-та картофелеводства НАН Беларуси. – Минск, 2003. – Ч. 1. – С. 322–329.
17. Мельничук М. Д. Основи біотехнології рослин / М. Д. Мельничук , Т. В. Новак, Б. О. Левенко – К.: Поліграфконсалтинг, 2000. – 515 с.

18. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. plant.* – 1962. – 15. – № 13. – P. 473–497.
19. Биотехнология растений: культура клеток / перевод с англ. В. И. Негрука / под ред. Р. Г. Бутенко. – Москва: Агропромиздат, 1989. – 280 с.
20. Вирусные болезни картофеля и меры борьбы с ними. // [Козар Ф. Е., Зарицкий Н. М., Дмитрук Ю. А., Патыка В. Ф.] – *Вісник аграрної науки.* №12: вид. Аграрна наука, 1999. – С. 30–35.
21. Капица О. С. Оздоровление вегетативно размножаемых растений от вирусных болезней.// О. С. Капица, Е. Н. Андреева – *Тр. Ин-та генетики АН СССР*, 1965. – Т. 35. – С. 18–35.
22. Применение ингибиторов вирусов при оздоровлении картофеля методом меристемы. // [Бойко В. В., Морозова З. Р., Зейрук Т. В., Андреева В. С.] // *Биотехнология в картофелеводстве. Науч. труды.* – Москва, 1991. – С. 13–21.
23. Бондарчук А. А. Виродження картоплі та прийоми боротьби з ним. / А. А. Бондарчук – Біла Церква, 2007. – 103С.
24. Трофимец Л. Н. Оздоровление и ускоренное размножение семенного картофеля : Метод. реком./ Л. Н. Трофимец, Д. П. Остапенко, В. В. Бойко – М. – 1985. – 26 с.
25. Гайдук П. П. Изучение антивирусного действия некоторых соединений на картофеле // П. П. Гайдук – *Науч. тр. НИИКХ*, 1980. – Вып. 33. – С. 97–101.
26. Горбатенко Н. И. Оздоровление картофеля, пораженного мозаичными вирусами, методом культуры меристем / Н. И. Горбатенко, И. П. Жук – *Сельхоз. биология*, 1971. – Т. 6. – С. 269–275.
27. Мэтьюз Р. Вирусы растений / Р. Мэтьюз // М.: Мир, 1973. – 600 с.
28. Фахли Г. М. Оздоровление картофеля от вирусов мозаичной группы методом апикальной меристемы // Г. М. Фахли, Э. И. Ларина. – *Бюлл. ВИЗР.* – Л., 1982. – № 53. – С. 44–48.

29. Коновалова Г. И. Производство исходного семенного картофеля / Г. И. Коновалова, А. О. Бобрик, З. А. Семенова // Картофелеводство. Науч. тр. БНИИК. – 2000. – Вып. 10. – С. 215–221.
30. Мацука Г. Х. Возможности использования 2'-5'-олигоаденилатов, как потенциальных фармакологических препаратов / Г. Х. Мацука, З. Ю. Ткачук, А. В. Козлов // Тез. докл. науч. конф., «Новые направления биотехнологии», – М., 1998. – С. 84.
31. Zeanderson T. Biochem and Biophys Res Commun // T. Zeanderson, R. Nordfeldth, E. Zungren – 1982. – Vol. 107. – № 2. – P. 511–517.
32. Квасюк Е. И. Синтез аналогов (2-5) олигоаденилатов, содержащих виразол / Е. И. Квасюк, Т. И. Кулак, О. В. Ткаченко // Весці Акад. навук Беларусі. Біяарганічная хімія. – 1996. – № 3. – С. 73–79.
33. Коновалова Г. И. Сравнительное изучение методов оздоровления картофеля *in vitro* от вирусной инфекции / Г. И. Коновалова // Тез. докл. науч. конф. «Актуальные проблемы современного картофелеводства», – М., 1997. – С. 100.
34. Рейфман В. Г. Роль рибонуклеазы (РНК-азы) в инфекционном процессе. / В. Г. Рейфман, Р. В. Мартынова, В. А. Пантюхина – В кн.: Тезисы докл., представленных XII международному ботаническому конгрессу. – Л., 1975. – Ч. 2. – 501 с.
35. Трофимец Л. Н. Некоторые особенности инфекционного процесса при заражении картофеля вирусами М, Y, S: Науч. Ер. / НИИКХ // Л. Н. Трофимец. – Вып. 8. – М. – 1971. – С. 244–258.
36. Салганик Р. И. Методические указания по применению бактериальной эндонуклеазы и новоиманина для получения безвирусного картофеля из культуры апикальной меристемы // Р. И. Салганик, Ю. И. Власов, Э. И. Ларина – Л–П, 1985. – С. 4.
37. Шенк Г. Исследования эффективного использования посадочного материала в семеноводстве картофеля / Г. Шенк, Д. Кляйнхемпель //

Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе: Сб. науч. тр. – Владивосток, 1985. – С. 91–95.

38. Mori Kanichi. Production of virus-free plants by means of meristem culture / Mori Kanichi // Jarg. (Japan agricultural research quarterly), 1971. – V. 6. – № 1. – P. 1–7.

39. Банадысев С. А. Эффективность методов оздоровления семенного картофеля / С. А. Банадысев, Н. П. Ященко, Г. А. Лось // Картофелеводство. Науч. труд. – Вып. 10. – Минск: Мерлит, 2000. – С. 192–200.

40. Brachet G. Cell divisions and nucleic acid synthesis // G. Brachet – Sympos. Soc. Cellul. Chem., 1958. – 7. – P. 181–187.

41. Kloet S. R. Studies on protein Synthesis by protoplasts of Saceharomyces. Carlsbergensis // S. R. Kloet, R. K. Wormeskerken, V. V. Koningabergen. – Biochem. Biophys. Acta, 1961. – 47 (I). – P. 136–143.

42. Применение ингибиторов вирусов при оздоровлении картофеля методом меристемы. // В. В. Бойко, З. Р. Морозова, Т. В. Зейрук, В. С. Андреева // Биотехнология в картофелеводстве. – Науч. труды. – Москва, 1991. – С. 13–21.

43. Schuster G. Further progress in the development of antiviral Substance Proc., of the 9-th Conference. Czechoslovak. Plant. Virologists // G. Schuster – Brnc, 1981. – P. 161–164.

44. Борисенко С. И. Применение природных и синтетических ингибиторов вирусов в оздоровлении картофеля методом культуры апексов / С. И. Борисенко – М., 1985. – 17 с.

45. Борисенко С. И. Эффективность оздоровления картофеля методом культуры апексов с помощью ингибиторов вирусов // С. И. Борисенко, В. А. Шмыгля, Г. Шустер – Докл. ВАСХНИЛ, 1985, – № 10. – С. 10–12.

46. Кинякин Н. Ф. Усовершенствование технологии получения здорового исходного материала для первичного семеноводства картофеля / Н. Ф. Кинякин. – 1989. – 22 с.

47. Писарев Б. А. Выращивание элиты картофеля на безвирусной основе / Б. А. Писарев, Л. Н Трофимец // Семеноводство картофеля. – М., 1976. – С. 72–77.
48. Cassels A. C. In vitro induction of virus – free potatoes by chemotherapy / A. C. Cassels // Biotechnology in Agriculture and Forestry (3). – Potato. – Berlin, 1987. – P. 40–50.
49. Melor F. C. Virus-free potatoes through meristem culture / F. C. Melor, R. Stace-Smith // Biotechnology in Agriculture and Forestry (3). – Potato. – Berlin, 1987. – P. 30–39.
50. Бабоша А. В. Олигоденилаты и олигоденилатсинтетаза растений картофеля в защитных реакциях против вирусного патогена / А. В. Бабоша, Л. Н. Трофимец, М. Е. Ладыгина // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 313. – № 1. – С. 252–255.
51. Подгаєцький А. А. Стійкість гібридного матеріалу та від самозапилення проти вірусних хвороб картоплі. // А. А. Подгаєцький, М. М. Фурдига Картоплярство. – 2008. – Вип. 37. – С. 36–42.
52. Шпаар Б., Шуманн П. Выращивание картофеля / Б. Шпаар, П. Шуманн. – М.: ИК Родник, 1997. – 246 с.
53. Блоцкая Ж. В. Вирусные болезни картофеля / Ж. В. Блоцкая. – Минск: Наука и техника. – 1993. – 222 с.
54. Мельничук М. Д. Діагностика латентного вірусу хмелю на сортах української селекції. // М. Д. Мельничук, В. В. Оверченко, О. В. Дубін // Мікробіологічний журнал. – 2003. – Т. 65, №4. – С. 43–50.
55. Усков А. И. Совершенствование методических подходов и регламента использования лабораторного контроля при выращивании оздоровленного исходного материала и супер-суперэлитного картофеля // А. И. Усков, Б. В. Анисимов, Ю. А. Варицев, Г. П. Варицева // Вопросы картофелеводства. Актуальные проблемы науки и практики. Научные труды. – Москва, 2006. – С. 71–76.

56. Nie. X. A novel usage of random for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers / X. Nie, R. P. Singh // Journal of Virological Methods, 2001. – V.91 – P 37–49.

57. Майщук З. Н. Влияние культуры меристемы и термотерапии на изменчивость признаков семенного качества клубней / З. Н. Майщук // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе: Сб. науч. тр. – Владивосток, 1985. – С. 10–18.

58. Тринклер Ю. Г. Изменчивость регенерантов культуры клеток картофеля / Ю. Г. Тринклер // Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе: Сб. науч. тр. – Владивосток, 1985. – С. 8–9.

59. Применение метода верхушечной меристемы в сочетании с термообработкой клубней и ускоренное размножение безвирусных растений в пробирочной культуре / [Трофимец Л. Н., Князев В. А., Хромова Л. М., Егорова Л. И.] // Науч. тр. НИИКХ. – М., 1977. – Вып. 30. – С. 11–18.

60. Шкаликов В. А. Некоторые проблемы получения и ускоренного размножения безвирусного семенного картофеля / В. А. Шкаликов // Изыскание прогрессивных средств защиты растений от вредителей, болезней и сорняков. – М., 1975. – С. 63–75.

61. Адамова А. И. Эффективность оценки и отбора оздоровленных линий для семеноводства новых и перспективных сортов картофеля / А. И. Адамова, О. И. Родькин // Картофелеводство. Научные труды. – Минск “Мерлит”, 2000. – Вып. 10. – С. 208–214.

62. Грищенко С. Є. Збереження сортотиповості та варіабельності меристемних ліній у процесі оздоровлення картоплі методами культури меристеми і термотерапії / С. Є. Грищенко // Картоплярство: міжвід. темат. наук. зб. – К., 2006. – Вип. 34. – С. 64–73.

63. Syvanen A. C. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E / A. C. Syvanen, K. Aalto-Setälä, L. Harju // Gwnomics. – 1990. – 8. – N 4. – P. 684–692.

64. Календарь Р. Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р. Н. Календарь, В. И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – Киев, 2002. – Т. 34. – № 4. (198). – С. 279–296.
65. Кочиева Е. З. RAPD-маркеры генома картофеля: клонирование и использование для определения межвидовых и межсортовых различий / Е. З. Кочиева, А. С. Оганисян, А. В. Рысков // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33. – № 5. – С. 893–897.
66. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs) / [B. Bornet, F. Goraguer, G. Joly, M. Branchard] // Genome. – 2002. – V. 45. – P. 481–484.
67. Вплив хіміотерапії на стабільність геному при оздоровленні картоплі за результатами RAPD-аналізу: матеріали VI Міжнар. конф. ["Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека. Геном рослин VI."], (Одеса, 7-10 вересня, 2010 р.) / Нац. наук. центр Інститут виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова. – О.: Інститут виноградарства та виноробства ім. В. Є. Таїрова, 2010. – 112 с.
68. Маниатис Т., Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
69. Оздоровление картофеля от вирусных болезней методом верхушечной меристемы / [Л. Н. Трофимец, В. А. Князев, Л. М. Хромова, Л. И. Егорова] // С.-х. біологія. – 1975. – №5. – С. 760–765.
70. Удовицький А. С. Безвирусное картофелеводство и иммунитет. Интенсификация производства картофеля на Дальнем Востоке / А. С. Удовицький. – Новосибирск, 1987. – 125 с.
71. Трускинов Э. В. О путях борьбы с вирусными болезнями. Современные проблемы семеноводства картофеля на безвирусной основе. / Э. В. Трускинов – Владивосток, 1985. – 151 с.

совещания и научно-практической конференции, посвященной 120-летию со дня рождения А. Г. Лорха / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. НИИ картоф.хоз-ва; под ред. Е. А. Симакова. – М., 2009. – С. 207–208.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	4
ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ.....	5
1. Основні вимоги до лабораторії.....	5
2. Живильні середовища.....	6
3. Створення умов стерильності.....	11
4. Введення в асептичну культуру та виділення меристем.....	13
5. Хіміотерапія при оздоровленні рослин картоплі.....	16
5.1 Ефективність регенерації та оздоровлення при використанні антивірусних сполук.....	20
6. Діагностика X, Y, M,S.L вірусів та віроїду веретеноподібності бульб картоплі на основі мультиплексної полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.....	24
7. Оцінка мінливості оздоровлених ліній методом RAPD- та ISSR-ПЛР.....	28
8. Розмноження оздоровлених ліній картоплі.....	32
9. Підтримка колекції у банку in vitro оздоровлених сортів картоплі.....	33
10. Економічне обґрунтування методу хіміотерапії з використанням сучасних молекулярно-біологічних тест-систем.....	36.

ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	41
ЛІТЕРАТУРА.....	42

Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем в поєднанні з хіміотерапією
/Методичні рекомендації/

Оформлення та тиражування здійснено у відділі наукових досліджень з питань інтелектуальної власності та маркетингу інновацій

Підписано до друку .Формат 60x84 . Тираж 500

ІК НААН України, вул. Чкалова ,22, смт.Немішаєве, Бородянського р-н,
 Київської обл., 07853.