

НУБІП України

НУБІП України
МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

НУБІП України
06.07 – КМР. 585 “С” 2020.10.29. 010 ПЗ

НУБІП України
ЩЕРБАКА ЮРІЯ ВАЛЕРІЙОВИЧА

НУБІП України
2022.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 606:631.528:635.63

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Декан факультету
захисту рослин, біотехнологій та екології

Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

НУБІП України

Коломієць Ю.В.

Кваско О.Ю.

(підпис)

(підпис)

« 14 » Листопада 2022 р.

« 14 » Листопада 2022 р.

НУБІП України

МАГІСТРСЬКА РОБОТА

на тему «КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ ОГІРКІВ НА СТІЙКІСТЬ ДО ЗАСОЛЕННЯ»

Спеціальність 162 біотехнології та біоінженерія

(код і назва)

Освітня програма Екологічна біотехнологія та біоенергетика

(назва)

НУБІП України

Гарант освітньої програми

Проф., д.с.-г. наук

(науковий ступінь та вчене звання)

Лісовий М.М.

(ПІБ)

Керівник магістерської роботи

д.с.-г. на, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

(підпис)

Коломієць Ю. В.

(ПІБ)

НУБІП України

Виконав

Щербак Ю. В.

(підпис)

(ПІБ студента)

НУБІП України

КИЇВ – 2022

НУБІП України

Національний університет біоресурсів
і природокористування України

Факультет захисту рослин, біотехнології та екології

Кафедра екобіотехнології та біорізноманіття

Освітній ступінь «Магістр»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

НУБІП України

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри

Кваско О.Ю.

“15” Листопада 2022р

НУБІП України

ЗАВДАННЯ НА ВИПУСКНУ МАГІСТЕРСЬКУ РОБОТУ СТУДЕНТУ

НУБІП України

Щербака Юрія Валерійовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Клітинна селекція огірків на стійкість до засолення»

керівник роботи

Коломієць Ю.В. Проф., д. с.-г. наук

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом НУБіП України від «13» жовтня 2021 р. № 1730 «С»

2. Строк подання студентом роботи 14 листопада 2022 р.

3. Вихідні дані до роботи Насіння огірка, стресовий чинник NaCl та Na₂SO₄, пробірки, ламінарний бокс, калюс.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) 1. Ведення культури в умови in vitro;

2. Отримання калюсу культури з експлантів;

3. Проведення клітинної селекції;

4. Отримання рослин регенерантів;

5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	Коломієць Ю.В. Проф., д. с.-г. наук		
2	Коломієць Ю.В. Проф., д. с.-г. наук		

3	Коломієць Ю.В. Проф., д. с.-г. наук	

6. Дата видачі завдання	01.08.2021
КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН	

№ з/п	Назва етапів випускної магістерської роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Написання огляду літератури	До 07.11.2021	
2.	Підбір методики виконання магістерської роботи	До 07.12.2021	
3.	Отримання стерильних проростків огірка	До 07.03.2022	
4.	Отримання калюсу	До 07.08.2022	
5.	Отримати рослин(регенерантів)	До 07.10.2022	

Студент Шербак Ю. В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи Коломієць Ю. В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

3

ЗМІСТ

НУБІП України

ЗМІСТ.....

СПИСОК СКОРОЧЕНИХ ТЕРМІНІВ..... 4

ВСТУП..... 5

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... 7

1.1 Культура Огірок..... 7

1.1.1 Обробка ґрунту на осінь..... 8

1.1.2 Обробка ґрунту на весну..... 9

1.1.3 Види та сорти огірка..... 9

1.1.4 Процес запилення огірка..... 10

1.2 Клітинна селекція..... 12

1.2.1. Типи морфогенезу..... 15

1.2.2. Причини виникнення соматичних клітин..... 16

1.2.3 Виникнення соматичних клітин та їх природа..... 16

1.2.4. Стійкість до лікарських препаратів..... 17

1.2.5. Стійкість до гербіцидів..... 18

НУБІП України

1.3. Ботанічні та біологічні особливості огірка

1.3. Ботанічні та біологічні особливості огірка..... 19

1.3.1. Коренева система..... 19

1.3.2. Стебло..... 19

1.3.3. Листки..... 20

1.3.4. Суцвіття..... 21

1.3.5. Плід..... 22

1.3.6. Насіння..... 23

НУБІП України

1.3.7. Вимоги до світла

1.3.7. Вимоги до світла..... 24

1.3.8. Вимоги до вологості	25
1.3.9. Вимоги до повітряно-газового середовища	26
1.3.10. Вимоги до елементів живлення	26

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ..... 29

2.1 Правила роботи в лабораторії.....	29
2.1.1. Кімнати та типи обладнання	29
2.1.2 Основні правила роботи в асептичних умовах	30

2.2 Стерилізація матеріалів для роботи

2.2.1. Стерилізація посуду	30
2.2.2. Стерилізація посуду та матеріалів	31
2.2.3. Стерилізація інструментів.....	32

2.2.4. Стерилізація операційної кімнати.....

2.2.5. Стерилізація рослинного матеріалу	32
2.3 Застосування розчинів.....	33
2.4 Приготування живильних середовищ.....	34

2.5 Вирощування стерильних протопластів сільськогосподарських культур

.....	40
2.5.1 Порядок роботи для отримання капусної культури	40

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 42

3.1. Проведення клітинної селекції

3.2 Матеріали для проведення дослідження.....	45
3.2.1 Сорти огірка для проведення досліду	46
3.2.2. Стерилізація та обробка насіння	46

3.3 Отримання калюсу

3.4 Клітинна селекція.....	52
Висновок.....	60

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

СПИСОК СКОРОЧЕНИХ ТЕРМІНІВ

НУБІП України

см.-сантиметри

мм.-міліметри

шт.-штуки

НУБІП України

кг-кілограм

ІОК – індопіктова кислота;

ІМК – індолімаєляна кислота,

НОК-нафтиктова кислота

НУБІП України

К-фулфуриламино-пурин

РР-розчин Рінгера

2-4 Д -2,4-дихлорфеноксицтова кислота;

6-БАП - 6-бензиламінпурин;

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

ВСТУП

НУБІП УКРАЇНИ

На скільки актуальна тема?

Через великий ріст населення у світі, а також кліматичні зміни які з кожним роком стають в рази помітніші, стає велика потреба забезпечити людину якісною і безпечною їжею.

НУБІП УКРАЇНИ

Так як у світі вже є проблема перенаселення людей, тому самі люди і шукають вихід з цієї ситуації. І як не дивно вихід вони знайшли в селекції рослин.

Селекція вирішує деякі питання людства, а також дає змогу далі відкривати нові дослідження в цій сфері. Я вибрав цю тему через те, що вона найбільш близька до мене, а також мені подобається селекція рослин та праця з рослинами.

НУБІП УКРАЇНИ

Тож, що таке селекція рослин.

Селекція - це створення великих різновидів сортів та гібридів рослин.

Звісно селекція займається не тільки створенням нових рослин, а й створенням нових порід тварин і штамів мікроорганізмів.

НУБІП УКРАЇНИ

З чого вже можна сказати що селекція грає велику роль в житті людини.

А що ж таке огірок?

Дивно але огірок не є овочем, як його всі звикли вважати. Огірок - це ягода сімейства гарбузових, хоча через те що огірок не схожий на ягоду його віднесли до класу овочей. Хоча наприклад в країнах Азії огірок вважають фруктом, особливо це можна побачити в Індії.

НУБІП УКРАЇНИ

Свою назву Огірок отримав від древніх греків, які назвали його "агурос", що перекладається, як незрілий. Переважно культура огірка є одною з небагатьох плід якої їдять в недозрілому вигляді. Огірок складається з 95% води, а також має низьку калорійність, що робить його одним із краєвих дієтичних продуктів. В ньому також знаходяться і корисні компоненти які позитивно впливають на організм людини, це пояснює те чому його так часто застосовують в медицині. [1]

НУБІП УКРАЇНИ

Мета і задачі дослідження.

НУБІП УКРАЇНИ

Створити культуру яка має стійкість до одних стресових факторів і додати до них свій фактор, щоб отримати універсальну рослину, яка буде стійка до всіх або майже всіх несприятливих чинників. Це дасть велике застосування культури (огірок) в більших варіаціях. Мається на увазі, що в несприятливому середовищі звичайний не селекційний огірок не вижив би, а ось селекційний, який ми намагаємося вивести в лабораторії за просто справився б з цією задачею.

В цій дипломній роботі показано вплив NaCl та Na_2SO_4 на культуру огірок та подальшим введенням культури, яка буде стійкою до NaCl та Na_2SO_4 .

Чи вважаю я, що клітинна селекція потрібна ?

Я вважаю, що велика кількість людей працює на благо людства, тому клітинна селекція доходить до цього списку.

Цікаво те, що клітинна селекція не закінчується тільки на рослинах, а продовжується в селекції мікроорганізмів та селекції тварин. Наприклад селекція в тварин використовують сучасні генетичні методи, за допомогою яких можна підвищити, наприклад, у корів білковість молока, збільшення м'яса, зменшити вміст жиру та навіть одержати вовну певної довжини та тонкості.

Мікроорганізми відіграють важливу роль в житті людини тому в селекції теж знаходять їм застосування. Наприклад застосування для отримання продуктивних форм мікроорганізмів. За допомогою різних методів добору вчені виготовляють різні штами мікроорганізмів, які є різними синтезаторами деяких продуктів, використовуваних людиною. Такими продуктами є вітамінні, антибіотики та інші речовини.

З наведеної інформації вище, ми можемо побачити, що застосування клітинної селекції дуже важливе і має великий вплив в науці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Культура Огірок

Огірок — це рослина яка може прожити лише рік, дуже чутлива до погоди, а також середовища (Рис 1.1). Огіркове насіння не росте при температурі 12-13 градусів при цьому, чим вища температура тим швидше сходить насіння, наприклад при температурі 21 градус огірки сходять 5 днів, а ось при 14 градусах вже через 15 днів, з цього можна зробити висновок, що огірок дуже любить теплу погоду, а ще його дуже часто сіють в теплиці саме через любов огірка до теплої температури. Оптимальна температура для росту 25 градусів, а температура при якій огірок помирає 0-2 градуси. Негативний ефект також дає і занадто висока температура, приблизно 40 градусів, за такої температури погіршується процеси росту рослини.

Щоб отримати правильний урожай треба вибрати ділянку, при чому також треба звернути увагу на рослини які росли тут раніше. До гарних попередників входять такі культури: помати, лук, перець, морква, трави, капуста та пшениця (озимова). Слід зазначити, що такі культури як гарбузові, кабачкові і огіркові не підходять для попередника.

Огіркова культура може повернутися на свою ділянку землі тільки через 4 роки, це робиться для уникнення захворювань рослини, а також перенесення хвороби на інші ділянки землі, до таких хвороб входять: антракноз, бактеріоз та фузаріозне в'янення. [27]

Грунт теж важливий в розвитку рослини. Найкращими такими ґрунтами є піщані ґрунти та суглинні ґрунти. Для забезпечення прекрасного росту в ґрунт додають органічні, а також мінеральні добрива.

Важливо зазначити, що огірки не ростуть при високому рН вищому ніж 7,6. Огірки любляють слабо кислий або нейтральний рН тобто (6,5-7,4)

Огірок вимогливий до елементів живлення якій знаходяться у ґрунті. Це все через те, що огірок має слабу ще не розвинену кореневу систему. В період вегетації, огірок починає споживати велику кількість калію, трохи менше азоту і

ще трохи менше фосфору. Коли починається вегетація, рослина починає інтенсивно поглинати азот, а коли утворюються батіги, інтенсивно поглинається калій.



Рис 1.1. Культура огірка звичайного [8]

Найбільший урожай ділянці землі можна отримати додаванням органічних добрив (45т/га)

Для отримання урожаю на 30 тон, використовують таку кількість елементів живлення (цифри можуть відрізнятись, все залежить від сорту огірка)

- ❖ 80 кг азоту
- ❖ 40 кг фосфору
- ❖ 135 кг калію

Так як огірок споживає велику кількість елементів живлення, засвоєння цих елементів на пряму залежить від концентрації солей які знаходяться в ґрунті.

Огірок є дуже вразливим до сильно лужного середовища (7,1-14) та надлишку хлору. Також не слід забувати, що достатня кількість вуглекислоти також відіграє важливу роль в розвитку рослини.

1.1.1 Обробка ґрунту на осінь

1. Крок проводиться дискування ділянки на глибині 9 см.
2. Крок проводиться пошарове лущення, обробляється воно на глибина 9-10см.

3. Крок внесення добрив (фосфор та калій) та фосфогілеу
4. Крок оранка на глибині 28см.
5. Крок планування нової ділянки

1.1.2 Обробка ґрунту на весну

1. Крок боронування 1-2 рази (залежить від глибини обробки)
2. Крок внесення добрив (фосфор та калій та фосфогілеу) якщо не були внесені восени.
3. Крок культивація приблизно 10см.
4. Крок передпосівна культивація 5см.

5. Крок посів культури
6. Крок Прикочування[2].

1.1.3 Види та сорти огірка

Огірки мають безліч сортів які в свою чергу мають різне призначення так, як універсальні, консервні та салатні. В свою чергу сорти поділяються за часом дозрівання.

- Ранні – дозрівають за 30-45 днів
- Середні- дозрівають за 40-45днів
- Пізні - дозрівають за 50 та більше днів

Огіркову культуру поділяють на сорти та гібриди. Гібриди не можуть зберігати батьківські властивості сорту, а ось сортові можуть зберігати властивості свого сорту. Однак гібридні огірки мають свою перевагу, а саме більш великий урожай, більш яскравий, а також гібриди довше тримають свою свіжість порівняно з сортовим. З цього можна зробити висновок, що на ринку гібридне насіння коштує дорожче ніж сортове.[28]

Популярні гібриди на ринку це: Буян, Маршда, Отелло, Паркер,

Регіна, Пасадена, Бізнес, Аякс, Бригантіна, Герман, Омельку, Катюша, Ластівка, Вірні друзі та інші. [3]

1.1.4 Процес запилення огірка

Процес запліднення огірка не чим не відрізняється від інших рослин. (Рис. 1.2 Запилення огірка) Пилок чоловічий має потрапити на жіночий в результаті чого утвориться зав'язь, якщо ж запилення не відбудеться то утвориться пустоцвіт (суцвіття яке засихає)

Існує три види огірків

- Самозапильні
- Бджолозапильні
- Огірки які не потребують запилення

Останні це селекціоновані гібридні огірки. Їх було створено для вирощування в теплиці. Вони мають тільки жіночі суцвіття і їх обмежена кількість.

Природне запилення культури відбувається декількома способами

- За допомогою вітру
- За допомогою комах
- За допомогою потоків води

Крім цих способів застосовують і штучне запилювання. Таким способом користуються коли огірок росте в теплицях. [29]

Для того щоб повністю розібратися в процесі запилення потрібно вміти розбиратися. Треба мати досвід роботи з культурою щоб вміти розрізнити жіноче суцвіття від чоловічого. Чоловічі квіти завжди розташовані групою на одному пазусі, натомість жіночі розташовані на декількох пазухах. У жіночих квіток є маточка але немає тичинки, у чоловічих навпаки. Щоб відбулося правильне запилювання пилок з тичинки повинен потрапити на жіночий пилок. З цією роботою прекрасно допомагають бджоли, але деколи і вони не можуть виконати свою роботу через деякі фактори.

❖ Закриті теплиці

- ❖ Вітряна погода
- ❖ Дощі

У таких випадках коли бджоли не справляються зі своєю роботою. В такому випадку росли на потребує допомоги людини, яка може штучно запилюти рослину.

Є два способи запилення:

1 Спосіб обережно зірвати чоловічий квітку і піднести до жіночої, провести тичинкою зверху вниз.

2 Спосіб в якому ми використаємо пензлик. Цей спосіб дуже схожий на попередній але в ньому все робиться за допомогою пензлика тобто. [4]



Рис. 1.2 Запилення огірка [9]

Історія огірка

Вважають, що Індія була першою країною де зустрічався огірок, в індії досі можна зустріти один із диких видів. Початок споживання огірка почався ще щонайменше 3000 років до нашої ери.

Огірок зустрічався також в Єгипті. Там їх було зображено на столах для жертвоприношення.[30] Зустрічались такі зображення на пам'ятках деревин

єгиптян, що доводить, що вони теж знали і використовували огірок. Зображення огірків були виявлені в храмі Дахіредь-Барс. Там їх пофарбували в зелений колір і зобразили разом з виноградом.

Греки в свою чергу, назвали місто в честь огірка, таке місто існувало за часів Гомера.

Стародавні римляни вже вирощували огірки в парниках потім засаджували у великих діжках. Там огірковий сік зарекомендував себе як один із не замінних косметичних засобів. Огірок використовувався, для захисту шкіри та її подальшого збереження, в якості пудри до якої додавали насіння, а також для розкладення зморшок. [5]

1.2 Клітинна селекція

Важливим напрямком для біотехнології є клітинна селекція, при якій клітинна лінія в рослинах зі спадковими ознаками культивується в умовах *in vitro*. Основним завданням клітинної селекції полягає в широкому застосуванні таких методів як клітинний та молекулярний для відображення найбільш цінних спектрів мутації і відбір найкращих з них і після їх вивчення, використання їх же для селекційних робіт щоб створити нові сорти рослин.

Перші селекційні рослини були отримані в 70 роках для їх отримання використовували найпростіші прийоми селекції. [12]

Трохи більше робіт було проведено в 80ті роки. Перелік мутантів з корисними характеристиками досить великий. До таких відносяться стійкі до стресових факторів гербіцидів, різні захворювання та продуцентами з не замінними амінокислотами.

Великим джерелом енергії в генетиці є самоклональна мінливість, що з'являється при проходженні стадії рослини неорганізованого росту яка в свою чергу дозволяє проводити селекцію *in vitro*.

Клітинна селекція вивчає теорію та практику виникнення генотипової та фенотипової мінливості з переважно новим, кращими цінними властивостями.

Якщо модифікувати поживне середовище то можна напряму впливати на репродукцію клітин які задають кількість хромосом у ядрі.[13]

Клітинна селекція має теоретичну базу яка має положення про тотипотентність будь-якої культивованої рослинної клітини. Рослинна клітина яка переводиться в культуру і зберігає всі свої властивості ,а також інформацію про весь свій організм. Генетичні зміни (мутації) які виникають під час регенерації рослини ,що в майбутньому може привести до появи нових ознак які дають змогу отримати нову перспективну форму культури.[15]

Дослідження мутагенного ефекту іонізуючого опромінювання з селекцією були початі Делоне в 1928 році, а також хімічний мутаген був досліджений Рапопорт в 1943 ці 2 вчених дали великий поштовх в напрямку експериментального мутагенезу. Успіхи також і досягли культивування in vitro що призвело до використанню культури в нових селекційних формах.

При розробці нових клітинних технологій стоять такі питання

✓ Збільшення виробництва клітинних шарів рослини для селекційних робіт

✓ Розробка більшого впливу на генетичну мінливість клітини

✓ Проведення розробки технології по регенерації з великою кількістю

життєдіяльних рослин

Основні переваги клітинної культури

- Можливість маніпулювати величезною кількістю клітин
- Проведення інтенсивної селекції в чашках Петрі

Як можна використати мутагенез

1. У вигляді калюсних тканин
2. Суспензій культури
3. Ізольованих протопластів
4. В пилку та насінні

Калюсна тканина просто доступний матеріал якій може використовуватись у селекції стійкості мутантів. Однак при роботі з калюсними тканинами є свої недоліки.

- Повільний ріст
- Непередбачуваний та токсичний для всіх клітин

Одночасно можуть вживатися стійкі та чутливі клітини, що призводить до виділення химерних клітинних ліній

Суспензійну культуру отримують із калюсної тканини ресуспендуючи калюси протягом декількох пасажів.[11]

Для одержання клітинних ліній, які будуть стійкими до антибіотиків використовують амінокислоти та їх аналоги та солі важких металів

Ізольовані протопласти мають великі можливості клітинної селекції та індукованих мутагенів.[31] Виділення великої кількості популяцій гаплоїдних та диплоїдних мезофільних протопластів, починають активно ділитися, що дозволяє проводити кількісні дослідження мутагенів соматичних клітин, а також змогу проаналізувати експресію індукованих фенотипних змін на клітинну та організм енному та їх трансмісію.

Коли настає час вивчення мутагенезу на культивованих рослинних клітинах, фенотип маркеру застосовують стійкість до токсичних амінокислот. Процедура виділення мутагенезу відбувається через культуру клітин які характеризуються певними фенотипами.

Для того щоб мати різних мутантів використовують такі прийоми

1. Пряма
2. Непряма
3. Тотальна
4. Візуальна (неселективна)

Пряма селекція найбільш популярна для виділення стійких гербіцидів.

Як відбувається пряма селекція

1. Обробка клітин мутагеном
2. Культивування клітин в неселективних умовах
3. Культивування клітин на селективному середовищі
4. Культивування колоній на регенераційних середовищах
5. Регенерація рослин
6. Висадка рослини в ґрунт

Непряма селекція має успіх у відборі летальних мутагенів

Тотальна селекція застосовується для виділення дефектних мутагенів

В неселективному відборі використовують нові варіанти біохімічних підходів таких, як рідинна, радіо імуний аналіз, тонкошарова хроматографія, мікроспектрофотометрія.

Завдяки тотипотентності клітини яка знаходиться у рослині можна прослідити за експресією індукування в умовах *in vitro* яка показує фенотипні зміни у рослин регенератів та довести генетичні зміни та вивчити їх завдяки гібридаційного аналізу.[32] Природа мутаційних фенотипів які змінюються підтверджується завдяки схрещенню регенератів з іншими вхідними рослинами, що пов'язана з цитоплазматичними, а також з ядерними детермінантами.

Культивування клітин і тканин на поживних середовищах має супроводжуватись різними аномаліями мітозу, що викликає значну генетичну різноманітність в популяційних калюсних клітинах.

1.2.1. Типи морфогенезу

- ❖ Соматичний
- ❖ Ембріогенез
- ❖ Органогенез

Всі вони можуть по-різному впливати на генетичні зміни і на фенотип рослини. Генетичні та фенотипові виявляються серед отриманих ізольованих протопластів. Варіабельність хромосом в рослинних числах, які проходять стадію неорганізованого росту в тій мірі відображаються культивування клітин *in vitro*. [39] Інші досягнення змогли підтвердити, що проходження клітин стадії

неорганізованого росту в *in vitro* можуть викликати нові форми рослини таких як сомоклональних варіантів, які не схожі на вихідні рослини за генотиповими та фенотиповими ознаками.

1.2.2. Причини виникнення соматичних клітин

- Генетична гетерогенність соматичних клітин

- Генетична та епігенетична мінливість

При цьому їх частота утворення характеризується різною залежністю вихідного експланту. Цитологічні дослідження показують, що кількість варіантів індукованих умов культивування в *in vitro*, які пов'язані з генетичними

змін

1.2.3 Виникнення соматичних клітин та їх природа

1. Природна різноманітність генетичних клітин рослин
2. Мінливість генному в *in vitro* (П. Ларікс та В. Скофкрофт розділили

їх на такі пункти)

- ❖ Грубі каріологічні зміни
- ❖ Криптичні невидимі при хромосомній перебудові та цитологічному

аналізі

- ❖ Пересування генетичних елементів

- ❖ Генна редукція та ампліфікація
- ❖ Соматичні кросенговери та їх обмін з сестринськими хроматидами
- ❖ Криптична елімінація вірусів

3. Мінливість цитоплазму

Окрім того соматична варіабельність пов'язана зі спатковою перебудовою генному, відмічені фенотипні зміни які позначаються як епігенетичні, які можуть без проблем передаватися дочірнім клітинам але не буде проявлятися в та в їх статевому потомстві.[16]

Здатність утворювати клонів, регенерації рослин та калюсоутворення

залежить від:

Стадії розвитку та його природи

НУБІП УКРАЇНИ

Довготривалість культивування та як реагують клітини з тканинами на гомеостаз

Перспективи досліджень соматональної мінливості:

1. Направлена селекція соматоклонів
2. Індукований мутагенез *in vitro*
3. Перенесення та трансформація окремих генів

НУБІП УКРАЇНИ

Завдяки клітинній селекції вчені змогли отримати рослини які стійкі до лікарських препаратів до амінокислот та їх аналогам, хвороб, гербіцидів, а також інші стресових факторів, такі як важкі метали, засолення, радіаційний стрес, екстремальна температура та посухи.

Одержання рослини стійких до абіотичних та біотичних факторів.

- **Посуха (99- 880мм. манітол, поліетеденгліколь**
- **Засолення (сульфат та хлорид)**
- **Важкі метали (ртуть, кадмій, цинк, алюміній, мідь)**
- **Екстремальні температури**
- **Хвороби (патогени, фільтрати, культуральні, патогенезини)**
- **Іонізуюче випромінення**

НУБІП УКРАЇНИ

1.2.4. Стійкість до лікарських препаратів

В основі лежить не звичайна дія антибіотиків, які специфічно діють на рослину клітину, яка фенотипово виражається в знебарвленні фотосинтезуючих тканин або пригніченні росту тканин які культивуються в *in vitro*.

Відбувається відбір стійких ліній на індивідуальних середовищах по їх здатності росту та синтезу в умовах надмірного селективного тиску антибіотиків.[33]

Здобуті: стрептоміцин, канаміцин, спектиноміцин стійкі лінії.

НУБІП УКРАЇНИ

Антибіотично стійкі мутанти мають важливу роль в дослідженні цитоплазматичних органел, а також їхніх генів. Вони обширно використовують у вигляді маркерів в дослідженнях по перенесенню пластид та їх отриманню, а також вивчення цитоплазматичних гібридів, в експериментах завдяки яким одержуються цибриди та гібриди.

Як проявляється стійкість до аміно кислот та їхніх аналогів.[40] Клітинне культивування проводять на середовищах, до складу яких входять амінокислоти, а також їхні аналоги.[17]

Механізми викликають стійкість амінокислот.

✓ Навмисне послаблення зворотнього контролю для біосинтезу амінокислот яке здебільшого призводить до надсинтезу. Надсинтез знешкоджує токсичний ефект антиметаболіту.

✓ Понижена проникність аналога в клітину

✓ Розпад в процесі метаболізму та в нетоксичних з'єднаннях

✓ Перешкодження включенню аналогу в білок

Отримання мутантів стійких до лізину, метеоніну, траптофану, валіну та інших аналогів. Такі мутанти дають відповідь на вирішення фундаментальних питань в сфері біологічних рослин. Селекція для стійких амінокислот використовується для відбору форм стійких рослин до певних стресових факторів та захворювань.[34] Прийняття таких мутантів сприяє більш поглибленому вивченню стійких механізмів рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища, а також виділенню більш нових вдосконалених сортів.

1.2.5. Стійкість до гербіцидів

Завдяки тому, що в поживне середовище вносяться гербіциди були отриманні нові мутанти які є стійкими до таких гербіцидів як, тразин, раундап, сульфонілсечовина, глікосат, фосфіотрицин, піклорам, амітроп.

В природному середовищі рослини, зазнають великих стресів. Стрес рослини може викликати будь який зовнішній чинник який починає по різному впливати на рослину як фізично так і хімічно. Ці зміни негативно впливають на ріст та розвиток рослини, що здебільшого призводить до якісних та кількісних характеристик культури.[41] Особливу увагу приділяють дослідженням які вивчають експресію генів при зовнішньому факторі та стрес індукуючому генів та білка, що їх кодують та дає можливість вченим конструювати рослини які є

стійкими до зовнішнього середовища. Для того щоб провести селекцію солюбільних рослин в умовах in vitro, застосовують пряму селекцію з використанням калусних та суспензійних культур. Таким чином відбираються і стійкі лінії до важких металів.

Стрес рослини, викликаний посухою, призводить до її пошкодження, що спричиняється інактивцією ферментів, токсичними речовинами, порушенням біо. пляхів та дефіцитом живлення. Для роботи над клітинною селекцією рослини на посухостійкість важливу роль грає наявність клітинних механізмів осморегуляції. З метою проведення імітації стресового ефекту (посухи) в in vitro, використовують поживні середовища, в склад яких входить осмотично активні речовини, які опускають рівень зовнішнього водного потенціалу. Ця речовина це полі етиленгліколь.

Причинами стресових факторів можуть бути, як високі температури, так і низькі. Низькі температури починають діяти на рослину при +10,-15градусів. До таких стресових зон відносяться субтропічні та тропічні рослини. [6]

1.3. Ботанічні та біологічні особливості огірка

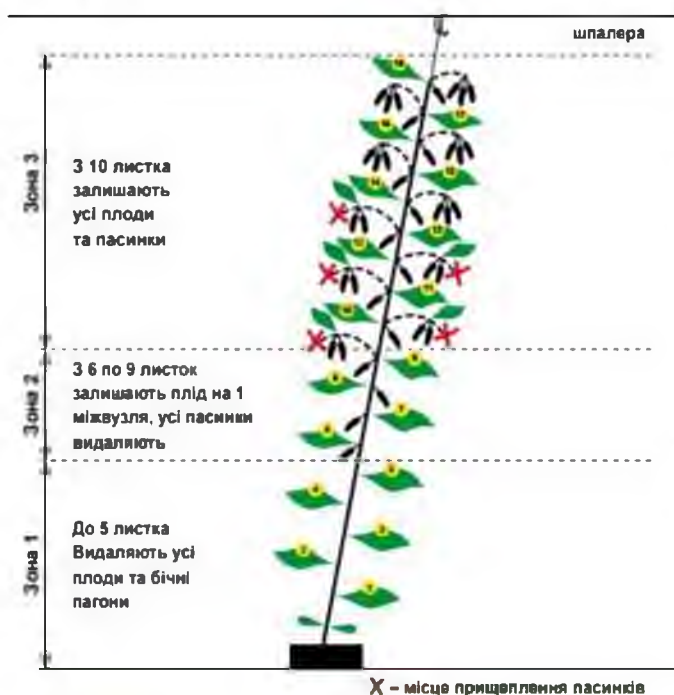
1.3.1.Коренева система

Коріння огірка проникає в ґрунт на глибину до 120см. Переважно вся маса коренів сильно розтягнута по орній площадці (до 40см.) яка гарно приймає тепло. Бокові корні ростуть в діаметрі до 20см. Хоча коренева система має великий об'єм в ґрунті вона досить слабка і поглинання речовини дається їй зі своїми обмеженнями, а саме коренева система поглинає лише легкодоступні форми поживних речовин при температурі не менше 20 градусів. Тому для нормального розвитку та росту рослини необхідно щоб її було чим житися у ґрунті. На поганому ґрунті і при низькій температурі коренева система буде розвиватися повільно. [18]

1.3.2. Стебло

Жорстке, п'ятигранне, повзуче з рівчаком на кожній грані, ось як можна описати стебло огірка. На стеблі знаходиться вусики(завдяки яким рослина

чіпляється за різні предмети, і може розміщуватись як в вертикальному так і горизонтальному стані), а також листки, всі вони розташовуються на 3-6 пазухах. Довжина огудини в гібридів і сортах які ростуть у відкритому ґрунті досягає 250см., а в закритому 500см. У процесі росту рослини утворюється 2 або більше пагонів (такі пагони називаються „пагони першого порядку“). На пагонах 1 порядку розвиваються побічні пагони (пагони 2 порядку) і так далі. Довжина стебла залежить від сорту та умов вирощування. У детермінантних та кушових форм головна огудина досягає 80см. Кожна з огудин має можливість укорінитися в землю при сприятливих умовах. Інколи для більш швидкого плодоношення застосовують прищипування в якому прищеплюються верхні бруньки над 3ми або 4ми листками. Ця процедура сприяє утворенню бокових пагонів (першого порядку) на яких утворюються жіночі квіти.



МАЛЮНОК 1. – Формування рослин огірка в одне стебло для високих теплиць

Рис. 1.3. Формування огірка на високій шпал [10]

1.3.3. Листки

Листки бувають: опушені, серцеподібні, овальні, черешкові, почергові, три або п'яти-лопастеві. Краї листків зубчасті. Розміри їх можуть змінюватись

залежності від типу та умов вирощування. Забарвлення різне: світло зелене, зелене, темно-зелене іноді світло жовте.

1.3.4. Суцвіття

На одній рослині можуть формуватися, як жіночі так і чоловічі суцвіття, інколи двостатеві. Цвітіння в ранніх сортів та в гібридів розпочинається через 30 днів після їх сходів, фактично жіночі і чоловічі квітки утворюються одночасно, а іноді жіночі навіть раніше на головній огудині. Цвітіння пізніх сортів починається через 40 днів після появи сходів. Всі чоловічі пустоцвіти збираються в щиток і формуються на довгих пагонах. Вони мають 5 тичинок і зацвітають на 1-3 доби раніше за жіночі. Жіночі квіти мають нижню видовжено-овальну або еліпсоподібну зав'язь. Приймочка розміщується у зав'язі яка має форму три пелюстки. Двостатеві квіти мають п'ять пиляків, нижню зав'язь і приймочку, деякі двостатеві квіти мають округлу зав'язь.

За формою чашечки та віночка квіти однакові. Чашечка опушена, п'яти роздільна. Чашолистки теж опушені але можуть бути як ланцетоподібні так і шилоподібні. Віничок жовтий, має 5 пелюсток (колоподібний), у нижній частині зрощується з чашечкою. Чоловічі мають п'ять тичинок з яких чотири зрощуються між собою. Жіноча квітка має трьох роздільну приймочку. Тому просторова ділянка на якій тримається відстань ізоляції між рослинами, на відкритій 1000, на тепличній 500.

У час цвітіння кількість жіночих квітів збільшується на бокових пагонах та на головній огудині. Жіночі квіти поодинокі. Великий вплив на співвідношення кількості чоловічих і жіночих квітів має сорт, гібрид, умови вирощування. Переважно на центральних пагонах квітуть чоловічі квіти. А ось на пагонах першого та другого порядку, жіночих квіток стає більше. Селекціонери змогли створити різні сорт та гібриди з жіночими квітами. Тому використовуючи сорти-запилувачі, їх положення розподіляють в шаховому порядку і висівають їх через 6-8 рядків. Збільшення чисельності жіночих квіток сприяє використанню сівби двох річного, трьох річного насіння. Цьому сприяє прогрівання яке відбувається

перед посівом і підживлення вуглекислотою. Для двох типів сортименту використовують гібриди та партенокарпічні сорти і бджолозапильні. У бджолозапильних зав'язь починає розвиватися тільки після запилення квітки або нанесення пилку на маточну приймочку. У сортів та гібридів плід прогресує без запилення. Такі плоди називають безплідними, їх можна збирати коли вони дозріють. Для того щоб мати змогу одержати насіння жіночого типу з цвітінням та партенокарпічним гібридизмом, їх спочатку запилюють. Апоміксис – це явище утворення насіння огірка без запилення.

1.3.5. Плід

Плід огірка – це так звана гарбузова ягода з насінними камерами (3-5). Коли приходить час збору урожаю, огірок починають збирати на продаж якщо він досяг технічної стиглості. Поверхня у плодів бувають двох типів гладенька та дрібно-горбувата. Плоди у яких велико-горбувата поверхня мають складне опушення. Дрібно-горбуваті мають змішане або просте опушення. З гладенькою можуть бути інші опушення. При чому забарвлення опушеної зав'язі (3-5 денної) безбарвне.

Плоди огірка поділяються на: видовжено овальні. Веретеноподібні, видовженні-яйцеподібні та яйцеподібні. Рис. 4 (Рис.4 1. Форма плодів огірка [4])



Рис.4 1. Форма плодів огірка [4]: 1 - яйцеподібна; 2 – видовжено яйцеподібна; 3 – видовжено овальна; 4 - циліндрична; 5 – веретеноподібна.

Забарвлення плодів темно зелені та світло жовті. Плоди насінники мають забарвлення темно-коричневого та білого в комплекті з сіткою, що зв'язане з їх опушенням та забарвленням.

Плоди бувають трьох розділів: пікуль (3-5см.), кориньон (5-9см.), зеленець (у відкритому ґрунті 9-12 см. у закритому 9-30см.). Бджо-лозапилні сорти, а також гібриди зеленця, досягають технічної зрілості в відкритому ґрунті через 9 днів, в закритому 7днів. Пікулі досягають через 2 дні (залежить від погодних умов та інтенсивності плодоношення).

За швидкістю дозрівання сорти та гібриди поділяються на:

- ❖ Ультраранні (40 днів)
- ❖ Ранні (41-45 днів)
- ❖ Середньоборанні (46-50 днів)
- ❖ Середньостиглі (51-55 днів)
- ❖ Середньопізні (56-60 днів)
- ❖ Пізньостиглі (60 днів)

Коли рослина вступає в період плодоношення вона продовжує квітувати та давати новий урожай для наступних зборів. Тому кожні 2-3 дні проводиться повторний збір урожаю, залежності від погодних умов. При повторному зборі плодів, збирають всі плоди, це зроблено для того, щоб кожний залишений плід не формував поживні речовини для насіння, що сповільнювало б формування зав'язі та інтенсивність росту листків, яке призвело б до втрати, як продуктивності рослини так і її врожайності.

1.3.6. Насіння

Насіння у плодів збирають в восени не допускаючи приморозків. (Рис.1.4 Сушіння насіння огірка) Після збору насіння їх розкладають на 20 днів для розмікшення і дозрівання. Після їх починають промивати, зброджувати та висушувати до стану сипучості. Насіння має бути середнього розміру видовжене – загострене, забарвлення бліднувате, насіння не опухле. Маса 1000 насінин повинна бути від 15до 25 г. Про доброму догляді насіння може зберігати свої посівні якості протягом 6 - 8 років за умови вологості 9%.



Рис.1.4 Сушіння насіння огірка [11]

Умови та середовище огірка тісно пов'язано з його батьківщиною, наприклад північно східна Азія є тропічним районом в якому високі температури, високі освітлювання та часті опади. Однак через те, що культивування огірка проводили в різних кліматичних зонах що в свою чергу спричинило зміну екологічної природи рослин. Це дало поштовх в створенні гібридів та сортів які пристосовані до помірному клімату. [19]

1.3.7. Вимоги до світла

Огірок відноситься до культури короткого дня тому і помірно вимогливий до світла. Найбільш сприятливим часом для росту огірка є 12 годин дня, а також з освітленням 15 тис. люкс. Найбільш тривожним для рослини моментом є нестача світла коли відбувається період сходів (квітіння та утворення листків). При нестачі світла зав'язь починає жовтіти та опадати, а сходів витягуються, це все можна спостерігати при зимовому вирощуванні огірка. Щоб запобігти недоліків, в теплицях використовують додаткове освітлення.

Але переборщувати світло погана ідея, тривале та інтенсивне світло призводить до передчасного старіння рослини, що в свою чергу призводить до

зниження продуктивності рослини. Для уникання таких проблем в теплицях змінюють вікна, а саме забілюють скло в них, а в відкритому ґрунті поряд з рослиною садять інші високорослі культури, що відкидають тінь та ховати огірок.

Як би це не було дивно але склад світла теж має свою роль на продуктивність огірка. Короткохвильові промені (синьо-фіолетові) прискорюють квітіння рослини, що призводить до квітіння жіночих квіток, а з ними і швидкий та вищий урожай. Так рослини які розташовані в східних частинах теплиці дають урожай, приблизно, $1,5 \text{ кг/м}^2$, що в порівнянні з рослинами розташованими на західній частині теплиці де переважають червоні промені, там урожайність менша.

1.3.8. Вимоги до вологості

Так як огірок складається з 96-98% води, йому потрібна волога, як в ґрунті так і в повітрі, до якої огірок досить прискіпливий. Коренева система огірка, переважно, розміщена в шарі ґрунту на глибині 40 см. що в літню посуху часто призводить до нестачі води. Найкраща продуктивність рослини проявляється при 80-90% в ґрунті, а в повітрі 90-95%.

Чим нижча вологість ґрунту тим повільніший розвиток рослини. Нижча вологість ґрунту сприяє зменшення розмірів плодів, прискорюється старіння, гіркуватими плодами, сповільнення росту та плодоношення. Найбільш велика потреба вони настає в період фази коли з'являються 2 або 4 листка та в період плодоношення. Як і зі світлом не варто переборщувати із вологою, так як це призводить до зменшення газообміну в ґрунті, зараження гнилісними хворобами, після чого коріння міняє колір на коричневий і відмирає.

Зниження вологості в повітрі на пряму впливає на час дозрівання плодів та запилення квіток рослини. [35] На смак плоди стають гіркими при збільшенні температури повітря. Регулювати вологу можна за допомогою зрошення огарків в кулісах. Забезпечення рослини вологою в потрібний момент, нагороджується більшим врожаєм як у відкритому ґрунті так і в теплицях.

1.3.9. Вимоги до повітряно- газового середовища

Повітряний режим теж має вплив на урожайність плодів. Надземна частина огірка добре реагує на вуглекислий газ, а коренева на його обмін та забезпечення киснем. Оптимальна насиченість повітря вуглекислим газом 0,3-0,6% .Коли процеси фотосинтезу стають більш інтенсивнішими, це підвищує їхню масу та врожайність [42]. В теплицях та спорудах такого ж типу для забезпечення рослини CO₂ використовують газові балони, зорощують курячий послід, використовують сухий лід. Щоб покращити розвиток кореневої системи потрібно завжди розпушувати ґрунт.

1.3.10. Вимоги до елементів живлення

Особливості вирощування в закритому ґрунті
Розсаду вирощують у горшечках виділеному для них відділені. Рослини вирощуються в горшечках які за розміром 10x10. Щоб вирощувати розсаду взимку потрібен досвід. Розсада росте 25-30 днів. Зимо розсаду починаю розсаджувати з 20 грудня, у плівкових 20 лютого, в парниках з 15 березня, а вже в на сонці з 20 ввітня.



Рис. 1.5. Вирощування огірків в теплицях [12]

Для того щоб догляд за рослиною був комфортний, її до шпалерного дроту (Рис. 1.3. **Формування огірка на високій шпалері**), що дає змогу підтримувати площу рослини у гарному стані від бур'янів, шкідників та хвороби і підтримувати оптимальну вологу та температуру повітря. У теплицях або біля них за декілька днів встановлюють вулики з розрахунком на те, що 1 бджола буде

покривати 1000 м^2 (Рис. 1.5 **Вирощування огірків в теплицях**). Перед плодоношенням з бджолозапильними гібридами проводять деякі підготовки: температуру повітря змінюють у ясні дні до 25 градусів, у похмурі 24 градусів, вночі до 18 градусів, а в ґрунтах 22 градусів, при чом змінюють і вологість в

ґрунті піднімаючи її до 80%, вологість повітря піднімають до 90%. У період плодоношення деякі показники змінюють, відносна вологість залишається без змін 90%, температура повітря в ясні дні піднімається до 28 градусів, в похмурі до 26 градусів, вночі до 26, в ґрунті температура не змінюється та залишається на відмітці 24 градуси. [20]

Для партенокарпічних гібридів свої умови: вологість повітря 80%, в ґрунті теж 80%, температура повітря встановлюється така, в ясні дні 24 градуса, в похмурі 22 градуса, вночі досягає 18 градусів, в ґрунті 24 градуси, в період збору уражаю показники змінюються, відносна вологість піднімається до позначки 85%, в ґрунті піднімається до 90%, що ж до температури вона теж змінюється: в ясні дні піднімається до температури 26 градусів, в похмурі до 24 градусів, вночі піднімається до 20 градусів, в ґрунті показник не змінюється і залишається на позначці 24 градусів. [37]

Важливо контролювати процес живлення рослини під час догляду за нею. Позитивно на ріст та плодоношення рослини впливає позакореневе підживлювання, як рекомендують проводити кожні 20 днів.

До догляду за рослиною входять також видалення відмираючі листки та пагони які вже не плодоносять. [43] Культуру поливають теплою водою (22 градуси) поливаючи періодами. Коли температура в теплицях підвищується

вмикають вентиляцію, а в деяких випадках забілюють скло. При оголенні кореню рослини на ґрунтовому субстраті, підсипають ґрунтосумінь на 2см.

Урожай починаю збирати через 3 дні. В зимових теплицях урожай може бути різний, все залежить від технологій, 35кг/м², а в плівкових 25кг/м² все залежить від догляду та строком вирощування. [7]

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Правила роботи в лабораторії

Біотехнічна лабораторія являє собою спеціальним блоком приміщення зі спеціальним обладнанням. (Табл. 2.1 *Будова та обладнання біотехнології [13]*)

2.1.1. Кімнати та типи обладнання

Табл. 2.1 *Будова та обладнання біотехнології [13]*

Приміщення	Обладнання
1	2
Кімната для миття посуду	мийниці з гарячою та холодною водою; дистиллятор; біодистиллятор; шафи для зберігання посуду; витяжна шафа для роботи з кислотами.
Приміщення для стерилізації (автоклавна)	автоклав; сушильна шафа; шафи для зберігання стерильних матеріалів.
Кімната для приготування живильних середовищ	лабораторні столи; шафи для зберігання реактивів і посуду; ваги; іонометр; магнітні мішалки; електроплитки; холодильник.
Операційна кімната (бокс)	ламнар-бокс; бактерицидні лампи; шафи для зберігання стерильних матеріалів.

Культуральна кімната	стелажі зі скляними полками і лампами;	кондиціонер; зволожувач повітря; качалки для вирощування суспензій; реле часу; термометр; гігрометр.
Кліматичні камери	стелажі з лампами;	система клімат-контролю.
Лабораторне приміщення	обладнання для біологічних досліджень.	

2.1.2 Основні правила роботи в асептичних умовах

Всі роботи в лабораторних кімнатах проводяться в спеціальному одязі. До таких входять: халати, пов'язки, костюми, бахіли. [44] Одяг завжди стерилізують в автоклаві (Рис. 2.1. Автоклав). Перед роботою в боксі руки вимивають милом, в боксі руки вже протирають спиртом (70%). Кімната де проводиться робота повинна бути повністю ізольована. Основною, якщо не найголовнішою умовою проведення біотехнологічних робіт є стерилізація. На всіх етапах роботи в лабораторії присутня стерилізація (обладнання, інструментів, рослинного матеріалу, середовища, ламінарного боксу і т.д.). [21]

2.2 Стерилізація матеріалів для роботи

2.2.1. Стерилізація посуду

Перед тим як стерилізувати посуд його вимивають, вимивають посуд декількома етапами.

- 1) Спочатку його замочують у воді та видаляють залишки агару.
- 2) Далі йде промивка в теплій воді.
- 3) Наступним етапом є обробка посуду хромовою сумішшю. Як

готується хромова суміш. Спочатку розтирають біхромат калію (9,2г) ($K_2Cr_2O_7$) [45] його поміщають до сірчаної кислоти (100мл) обережно

помішуючи паличкою. При приготування хромової суміші треба бути уважним та дотримуватись техніки безпеки з концентрованими кислотами. У процесі миття використовують металеві щипці які обережно ополіскують в хромовій суміші.

4) Промити посуд змінюючи водопровідну воду та дистиллюючи.

5) Висушити посуд.



Рис. 2.1. Автоклав

2.2.2. Стерилізація посуду та матеріалів

Такий посуд як: ланки, Петрі, пробірки, колби та інше, починають ретельно стерилізувати для подальшого використання в ньому живильного

середовища. Стерилізують посуд сухим жаром ставлячи посуд в сушильну шафу [38] Стерилізують посуд 2 години при температурі 160 градусів. Після сушіння сухим жаром, посуд стерилізують вологим жаром при тиску 2 атмосфери, протягом 30 хв. Закінчення стерилізації проходить в горизонтальному автоклаві (Рис. 2.1. **Автоклав**) які потрібен для стерилізації під тиском.

2.2.3. Стерилізація інструментів

Першу стерилізацію інструментів проводять за допомогою сухого жару.

Не допускається стерилізація металевих інструментів в автоклаві через їх подальше зношення. Перед роботою та при роботі інструменти постійно стерилізують, стерилізуються вони етиловим спиртом, в подальшому з опаленням. [22]

2.2.4. Стерилізація операційної кімнати

Операційна кімната завжди повинна підтримуватись в чистоті та перед проведенням робіт в ній, повинна бути проведено вологе прибирання. Перед тим як працювати в кімнаті з ламінарним боксом, кімнату стерилізують за допомогою ультрафіолету на протязі двох годин. Коли проводиться стерилізація ультрафіолетом в кімнаті не повинні знаходитись люди, а до роботи можна буде приступити тільки через 40 хвилин. Щоб уникнути пошкодження очей, надягають спеціальні окуляри або спеціальні костюми в яких вже вбудований захисні окуляри.

2.2.5. Стерилізація рослинного матеріалу

Проведення стерилізації рослинних матеріалів відбувається в тому випадку, якщо на рослині присутні епіфітні мікрофлори. Перед тим, як стерилізувати рослину її промивають в мильному розчині потім промивають в проточній воді очищаючи від різних тканин, наприклад з пагонів видаляють кору, з коренів видаляють шкіру.

Експланти у рослин стерилізуються за допомогою етиленового спирту, а також розчини які мають в своєму складі активний хлор, до таких належать:

гіпохлорид калію та натрію, та хлорамін.[48] Крім активного хлору до стерилізуючих розчинів належать: перекись водню, діамід, сулема, нітрат срібла, антибіотиками.

2.3 Застосування розчинів

Етиловий спирт часто його застосовують як перший засіб стерилізації. Його можна використовувати, як розчин для протирання матеріалу, а також можна занурювати матеріал в нього на декілька секунд. Здебільшого таку стерилізацію використовують, щоб стерилізувати плоди, насіння, зав'язі та пагони, іноді такої стерилізації достатньо.[23]

Гіпохлорит калію входить до складу хлорного вапна. Використовується для обробки бруньок, пагонів, квіток, насіння та зав'язей у вигляді 5-7% розчину, оброблюючи протягом 5-7 хвилин.

Гіпохлорит натрію використовується для обробки безлічі різних експлантів, на протязі 1-20 хвилин. Використовують його у вигляді 0.5-5% розчину. Цей розчин являє собою клітинну структуру тому тривалість стерилізація підбирається індивідуально. Наприклад ізольовані зародки стерилізуються 2-3% розчині на протязі 15 хвилин, сухого насіння 3-5% розчину при 2 годині обробки. Залишки гіпохлорита видаляють за допомогою 0,01 НСІ, після видалення гіпохлорита 8-9 разів промивають дистильованою водою.

Хлорамін застосовується 1-6% розчин яким обробляють пиляки, молоді зародки та сухе насіння. Час обробки 1-3 хвилини для пиляків та зародків, для насіння 30-60 хвилин, після чого промивають дистильованою водою 2-3 рази.

Сулема токсична речовина, яка вимагає дуже старанного догляду за нею (підбір концентрації, зберігання і та інше). Щоб стерилізувати зародки використовують 0,1% розчин протягом 1-3 хвилин, для бульбоплодів до 20 хвилин.

Спеціальні розчини які готуються перед застосуванням в якому міститься активний хлор який застосовується тільки раз.

Діацид використовується для ізольованих зародків, насіння, пиляків, коренеплодів та апікальних меристем, які стерилізуються в 0,2% розчині. Діацид готують з етанолмеркурхлориду (330 мг.), цитилпіридиній хлориду (660 мг.) разом зі гарячою водою (330 мл). Далі їх ретельно перемішують і доводять об'єм до 1 літру, додаючи 2-3 краплі детергенту твін-80, зберігають його в закритій колбі в темному місці.

Антибіотики застосовується, щоб стерилізувати рослинний матеріал від інфіковані бактеріями. Найбільш застосованим є стрептоцин і тетраміцин, їхня концентрація 10-80 мг/л, ампіцилін 200-400, левоміцитин та інші.

Так як речовина якою стерилізують, негативно впливає і на рослинні клітини і на мікроорганізми, концентрацію, вид речовини, все це підбирають індивідуально відносно рослини, стану, типу експланту та інших факторів впливу.

(Рис. 2.2 Стерилізація рослинного матеріалу [14])

Рис. 2.2 Стерилізація рослинного матеріалу [14]

Стерилізація вихідного рослинного матеріалу
(за Р.Г. Бутенко, 1999)

Тип експланта	Час стерилізації, хв		
	діацид	сулема 0,1 %	перекис водню 10-12 %
Насіння сухе	15-20	10-15	12-15
Насіння набубнявіле	6-10	6-8	6-8
Тканини стебла	20-40	20-25	-
Листки	1-3	0,5-3	3-5
Апекси	1-10	0,5-7	2-7

2.4 Приготування живильних середовищ

Живильне середовище, для культивування тканин визначається їх біохімічними та біологічними потребами. Всього 8 груп живильних середовищ

(Рис. 2.3. Компонентний склад живильних середовищ [15])

Рис. 2.3. Компонентний склад живильних середовищ [15]



Такі елементи як *Азот, Фосфор, Сірка* входять до складу білків, жиїв, нуклеїнових кислот.

Залізо, цинк, марганець, молібден, кобальт у сполученні з порфіринами починає утворюватись макромолекули пігментів фотосинтезу, окислювально-відновних ферментів.

Іони K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , H^+ всі вони необхідні для регулювання кислотності середовища, а також для підтримки фізіологічних градієнтів клітин. [46]

Вуглеводи одним із складових живильного середовища є джеолов вуглецю. Додають його для живлення біологічних макромолекул і для культивування гетерострофних тканин, таких як калус та суспензії. Як парвильно це дисахариди (сахароза), а ткож моносахариди такі, як гексоза (глюкоза, фруктоза), пентоза (кисилоза). Для живильного середовища майже нікли не використовують полісахариди. Тільки деякі пухлинні тканини можна

вирощувати із крохмалем, рафінозою, целобіозою, через те, що в них є гідролітичні ферменти.

Вітаміни застосовуються для стимулювання біохімічних реакцій в клітині.

Тіамін (В) являє собою одним із складових елементів піруватдекарбоксілази, та входить до учасників в перетворенні вуглеводів.

Тіамін це один із складових ферментів окисного декарбоксілювання кетокислот якій виступає коферментом транскетоксилази.

Пірамідин (В₆) входить до складу ферментів декарбоксилювання та переамінування амінокислот та переносить у вигляді фосфорнокислого ефіру.

Нікотинова кислота входить до складу дегідрогенезу у вигляді адміну, що дає змогу каталізувати донорно акцепторний ланцюг Н⁺.

Фітогормони використовуються для регулювання росту та розвитку рослини. Фітогормони діляться на стимуляційні та інгібіторні. В біотехнології,

зазвичай, використовують стимулятори так як: ауксини, цитокініни та гібериліни. [24]

Ауксин

- Індоліл-3-оцетова кислота
- Індоліл-3-масляна кислота
- А-нафтилоцетова кислота
- 2,4-дихлорфеноксоцетова кислота

Всі вони сприяють розвитку та розтягнення клітин, утворення коренів та калюсних тканин.

Цитокініни

- 6-фурфуриламінопурин
- Дифенілсечовина
- 6-бензиламінопурин

Вони реагують процес поділу клітини, які сприяють утворенню пагонів калюсної тканини.

Гібереліни: гіберелова кислота (так як ГК1, ГК2 ,ГК3) стимулюють ріст стебел культур. Мають ефекти: насіння виходить із стану спокою, зміна статі, партенокарпія.

Абсцизова кислота та етилен входять до групи інгібіторів росту . Дають ефекти: спокою бруньок , опадання квітів , плодів та їх дозріванню, та соматичних ембріодів

Використовуються вони як біологічні добавки до калюсу в деяких випадках використовуються рослинні експланти (10-15% об'єму середовища

), кокосове молоко (ендосперм кокосового горіха), незрілі зернові культури(в період молочної стиглості), та ті які містять цитокініни (кінетин), зеатин та NN-дефенілсечовину

В культурі *in vitro* використовують тверді агаризовані середовища. Рідкі середовища використовуються для культивування калюсів, тканин, рослин-регенератів та іншого.[47] Для того щоб втримати експлант у пробірку поміщають містки-підтримки які складаються з фільтрованого паперу або інших синтетичних матеріалів. На основі агар-агару готують середовища та з полісахаридів з морських водоростей, що дає водний гель (рН якого 5,6-6,0.

Деколи для ущільнення використовують поліакриламідний гель. Для того щоб культивувати різні тканини розроблені живильні середовища. Прописи найбільш використаних живильних середовищ (Таб.4.1 Живильні середовища [8]) [25]

Таб.4.1 Живильні середовища [8]

Компоненти	Концентрація в живильному середовищі, мг/л				
	Мурасиге і Скуга	Гамборга	Уайта	Шенка и Хільдебрандта	
Макросолі	NH ₄ NO ₃	1650	-	-	-
	KNO ₃	1900	2500	80	2500
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	150	-	200
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	370	250	-	400
	KH ₂ PO ₄	170	-	-	-
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	-	150	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
	NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	300
	MgSO ₄	-	-	360	-
	Ca(NO ₃) ₂	-	-	200	-
	Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
	KCl	-	-	65	-
	NaH ₂ PO ₄	-	-	16.5	-
Мікросолі	H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5	5,0
	MnSO ₄	-	-	4,5	-
	Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	2,5	-
	CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,02	0,2
	ZuSO ₄	-	-	1,5	-
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025	0,1
	KJ	0,83	0,75	0,75	1,0
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	-	-	-
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	0,025	-	0,1
	ZuSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	2,0	-	1,0
	MnSO ₄ x H ₂ O	-	10,0	-	-
	Fe ₂ SO ₄ x 7H ₂ O	27,8	28,0	-	15,0
	Na ₂ ЭДТА x 2H ₂ O	37,3	-	-	20,0
Вітаміни и БАВ	Тіамін-НCl	0,1	10,0	0,1	5,0
	Піридоксин-НCl	0,5	1,0	0,1	0,5
	Нікотинова кислота	0,5	1,0	0,5	5,0
	Мезоінозит	100	100	-	1000
	Гліцин	2,0	-	3,0	-
	ІОК	2,0	-	-	-
	Кінетин	0,2	-	-	0,1
	2,4Д	-	2,0	-	0,5
	ПХУ	-	-	-	20
	Сахароза	30000	20000	20000	30000
Агар-агар	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%	

Рис.2.5. Склад середовищ з макро-та мікросолями [17]

Склад маточних розчинів макро- та мікросолей для живильного середовища Мурасиге і Скуга

<i>Макросолі МС</i> – 1 л розчину солей; по 100 мл розчину солей у 1 л середовища		<i>Мікросолі МС</i> – 100 мл розчину солей; по 1 мл розчину солей у 1 л середовища	
Реактив	Вага, г	Реактив	Вага, мг
NH_4NO_3	16,5	H_3BO_3	620
KNO_3	19,0	$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,33
CaCl_2	3,3	$\text{ZnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	860
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	4,2	KI	83
KH_2PO_4	1,7	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	25
-	-	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
-	-	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,5

Приготування розчину Fe халат: беруть 100мл. розчину до цього беруть $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -557 мг та $\text{NaEDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -745 мг. Наважку злити окремо розчинити та довести до кипіння. [26]

Приготування розчин фітогормонів.

Готується він таким чином

➤ *Ауксини* 2,4-Д, ІОК, ІМК, ІНОК -100 мг. в 20х літрах 0-5-2л етанолу, підігривають доводячи водою до 100мг.

➤ *Цитокініни*: кінетин, зеатин, БАП- розчиняють в 100мл. речовина в 2мл. 0,5НСІ підіпріти та доводять до 100мл. води

➤ *Гібереліни* ГК₃ розчиняють у воді

➤ *Абсцисин* АБК розчиняють у 3мл. 70 % етанолу, водою доводять до потрібного об'єму

➤ Приготування розчинів вітамінів В₁ В₆ та РР в концентрації 1 мг/мл.

Розчини вітамінів: тіамін, проридоксин, нікотинова кислота, аскорбіннову кислоту, фолієва кислота, біотин, параамінбензойна кислота, пантегенат, ціанкобаламін, рибофлавін, все це розчиняється в бідисцильованій воді(1мг/мл)

Маточний розчин зберігають в посудинах в холодних камерах при температурах 0... +4 градуси, термін зберігання не більше 2 місяців. (Рис.2.5.

Склад середовищ з макро-та мікросолями [17]) Розчини, екстракти та ферменти зберігають при температурі -20 градусів.
Фітогормони готуються перед приготуванням живильного середовища.

2.5 Вирощування стерильних протопластів сільськогосподарських культур

➤ 1 Спочатку проводиться підготовка рослинного матеріалу. В цьому етапі відбираються 10 насінин. Насіння промивають спочатку в мильному розчині потім в водопровідною водою і після неї дистильованою.

➤ 2 Проводиться стерилізація рослини за такою схемою

1. 1-2 хвилини в 96% етанолі
2. Промивка дистильованою водою
3. 15 хвилин в 0,1% розчині сулеми
4. Промивають стерильною водою 5-6 разів

➤ 3 За допомогою простерилізованого пінцета розкласти стерилізоване насіння в чашки Петрі на дні яких простелена вата.

➤ 4 Насіння росте у термостаті при температурі +25 градусів.

➤ 5 Аналіз результатів: продивитися схожість між проростками

2.5.1 Порядок роботи для отримання калюсної культури

1 Експлант переносять у чашку Петрі.

2 Підтримуючи експлант пінцетом, зрізають з нього калюс.

3 Поділити калюсну тканину на невеликі фрагменти які в подальшому переносяться на нове живильне середовище.

4 Посуд герметично закривають та підписують.

5 Матеріал переносять в термостат (Рис. 2.6. Термостат) з контрольованими умовами вирощування

6 Щоб прискорити наростання калюсної маси, живильне середовище



Рис. 2.6. Термостат

оновлюють кожні 5 тижнів. Від нової калюсної тканини відділяють старе агаризоване середовище, калюс розділяють та переносять на головний оновлений субстрат.

Проводяться постійні визначення інтенсивності росту та приросту та час за яким подвоюється калюсна культура. [14]

Іноді в технічному процесі може траплятися ризогенез калюсної маси.

Такі варіанти досліду не використовуються, через те, що калюсна клітинна після ризогенезу втрачає свої морфологічні властивості. [8]

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Отримання калусної культури огірка зі застосуванням прямої селекції

3.1. Проведення клітинної селекції

Щоб отримати огірок які будуть рецисивними до засолення, ми використаємо пряму одноступеневу селекцію, для регуляції стресу був доданий NaCl та Na_2SO_4 . Проаналізувавши літературні джерела, в яких було написано про пряму селекцію ізольованих клітинних культур, а також органів рослин, які стійкі до осмотичного стресу, в свою чергу маючи перевагу перед багатоступінчастою схемою. Тому тільки дози які можуть бути летальними зможуть відселектувати стійкі генотипи, а наслідок чого перші пасажі культури в середовищі з низьким стресовим фактором вважатимуться не дієздатними. Однак щоб ефективно використовувати одноступеневий добір потрібно пройти попередній аналіз кривої росту для кожного генотипа культури, все залежить від концентрації стресового чинника, не дає змогу точно визначити максимальну концентрацію, та в який час зупиняється ріст рослини.

Експланти які виділили з насінневих проростків (Рис 3.1) були відправлені в селективне середовище.

Через 5-7 днів експлантат починає свій ріст. Кожні 7 днів проводять спостереження за калусною масою та за її життєдіяльністю. Коли пройде 28 днів проводять обліки ростових параметрів калусу, які утворюються в експлантаті. Існує певна залежність яка ініціює ріст калусних клітин, як в генотипі, так і в концентрації NaCl, Na_2SO_4 які входять в склад живильного середовища.

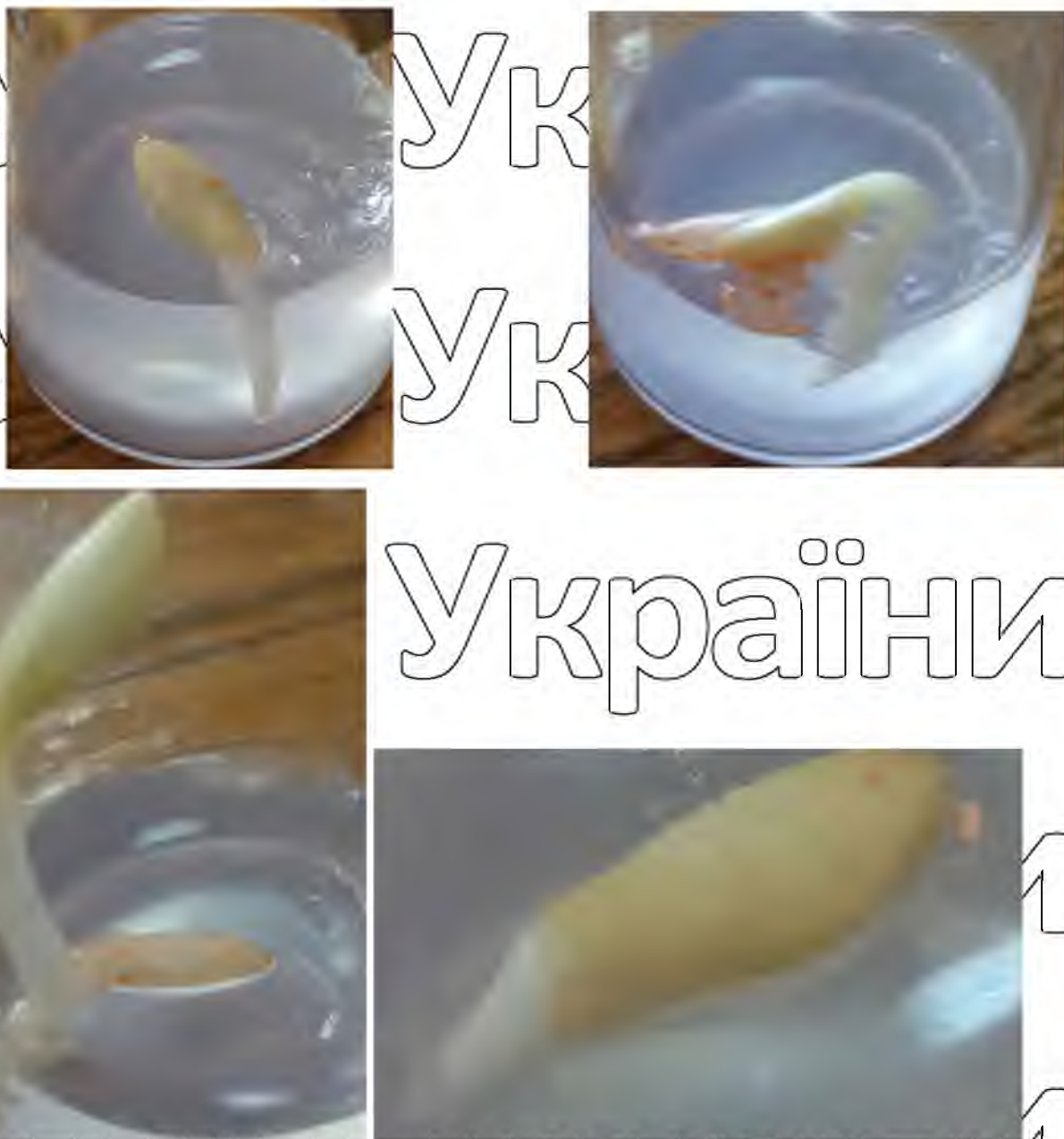


Рис. 3.1 Проростки огірка в середовищі

Установлено, що існує певна залежність росту калюсу та клітин, як від генотипу так і від різних концентрацій солі у живильному середовищі. На одному з контрольних варіантів з вмістом 2% NaCl, наростання калюсу відбувається рівномірно впродовж 30 днів. На контрольному варіанті з вмістом 2% Na₂SO₄ наростання калюсу відбулось більш стабільно чим з 2 % додаванням NaCl. На варіантах з 4% NaCl ріст починає гальмувати приблизно на 20 діб культивування так само, як і на варіанті з 4% Na₂SO₄.

Подальше збільшення концентрації солі сприяло більш високому інгибуванню росту калюсних тканин. На середовищі з 8% NaCl можна спостерігати зниження показників росту з 450,0 до 160,0 мм³ в залежності від генотипу. В середовищі з 8% Na₂SO₄ спостерігалось зниження росту з 455,0 до 220,0 мм³. На середовищах з 12% NaCl виявляється зниження росту показників з 245,0 до 900,0 мм³ даний вміст солі створює в середовищі високе селективне навантаження з отриманням життєздатного калюса, теж саме можна сказати про 12% Na₂SO₄. За індексом резистентності на середовищах з 6% NaCl мають тільки 4 зразки, які показали стійкість вище середньої, як і зі 6% Na₂SO₄.

Щоб визначити ефективність концентрації рослин регенерантів на солестійкість апікальних меристем які виділяються з 5-проростків, висаджують на середовищі з рівним вмістом NaCl та Na₂SO₄.

Реакції рослини на NaCl та Na₂SO₄ з концентрацією 6% різна, все залежить від генотипу. Негативний показник тільки у шести зразків. У деяких інших зразків вміст хлориду натрію стимулює ріст пагонів, а у деяких і коренів порівнюючи з контрольними варіантами. Майже схожі зі зразками хлориду натрію і сульфат натрію, в деяких зразках було виявлено стимуляцію росту коренів. Концентрація 4% у всіх зразків знижує показник росту, але селективне навантаження не створює достатніх умов для диференціації зразків за солестійкістю. Концентрація 8% створює важкі селективні умови для рослин регенерантів, пригнічуючи ріст кореня та погіршаючи найнижчі значення у пагонів було 4,5-0,8 мм. в кореня 0 мм. ,максимальні значення в пагонка 29,0-2,3 мм. в кореня 40,2-4,8 мм з чого маємо можливість диференціювати зразки за солестійкістю і продовжити в подальшому їх нормальний ріст. При концентрації 12% ростові показники кореня та пагонів знижуються. Токсичний ефект досить високий тому в метаболізмі рослини відбувся не зворотній зміни, що призвело до зупинки росту рослини в селекційний період з неможливістю продовжити її ріст. Найвищим індексом резистивному середовищі з 6% NaCl за ростовими показниками стеблами та листками, виявлено тільки в трьох зразків. Найвищим

індекс резистивному середовищі з 6% Na_2SO_4 за ростовими показниками кореню виявлено в 4 зразках.

Висновок: У результатах було виявлено деякі особливості які пов'язані з сольовим стресом на розвиток калюсу 12 генотипів огірка. Було проведено аналіз росту калюсу і рослин-регенерантів в кожному генотипі рослини, силаючись на

концентрацію стресового чинника, а також визначенню концентрації при якій зупиняється ріст огірка. Встановлюється, що диференціації калюсу за солестійкістю треба використати в селективному середовищі 6% NaCl та Na_2SO_4

для диференціації рослин – регенерантів-6% NaCl та Na_2SO_4 . Також виділено

стрес толерантні зразки, їх чотири, всі вони за індексом резистентності виявилися стійкішими вище середнього. [9]

Отже ми виявили, що в результаті досліджень є можливість до регенерації калюсних культур огірка стійкого до хлоридів, а саме до NaCl та Na_2SO_4 .

3.2 Матеріали для проведення дослідження

Матеріалом для досліджень слугують тканини і органи огірка 12 селекційних цінних ліній, а також гібридів, які придатні для вирощування в захищеному ґрунті. У якості об'єктів для добору досліджень використовували

калюси та рослини-регенеранти. Щоб отримати калюс, в якості експлантату використовують апікальні меристеми які мають розмір 2 мм. виділенні з 5-дневних проростків. Добір калюсів відбувається на живильному середовищі

Мурасіге і Скуга, з використанням модифікованого регулятора росту 0,1 мг/л

НОЦК і 2 мг/л БАП з подальшим додаванням у якості селективного чинника NaCl

та Na_2SO_4 з концентрацією 2, 4, 6, 8, 12%. Добір рослин-регенерантів

відбувається на живильному середовищі MS без фітогормонів з хлоридом натрію в так же концентраціях.

Тривалість культивування становить 28 днів. Кількість експлантів на один дослід становить 20 шт. Об'єкти проводять в кінці пасажу та згодом вимірюють

на калюсах – об'єм, а також довжину, ширину, добуток, та висоту. У рослин-регенератів вимірюють довжину пагонка та кореня.

Оцінку впливу селективного середовища на швидкість росту калюсу здійснюється за допомогою індексу резистентності RI який вираховали, як відношення об'єму калюсу до контрольного варіанту, виражаючи його у відсотках. Індекс резистентності в рослин-регенератів вираховали, як відношення довжини пагонка в селективному середовищі до довжини пагонка на контрольному варіанті, виражаючи все у відсотках.

3.2.1 Сорти огірка для проведення досліду

Для досліду взяли 3 різні сорти огірка:

1. Гектор;
2. Ізід;
3. Марта F1;

3.2.2. Стерилізація та обробка насіння

Стерилізацію та обробку насіння проводимо в ламінарному боксі. Щоб отримати калюс ми будемо використовувати листки, стебла, коріння, сім'ядольні листки та насіння.

Для того щоб почати роботу ми готуємо гормональне середовище та підготовлюємо матеріали для роботи. Проводимо стерилізацію ламінарного боксу. В ламінарному боксі проводиться стерилізація насіння спочатку в розчині білизни на протязі 10 хвилин. Після чого насіння огірка переміщують в стерильну дистильовану воду на 10 хвилин і далі, ще раз поміщаємо в стерильну дистильовану воду на 10 хв. Наступним кроком готується пеніцилінки з середовищем. Паралельно до роботи готуємо стерильну чашку Петрі. Насіння з дистильованої води переносимо в чашку, робимо це все максимально швидко. З чашок Петрі ми переносимо насіння огірка в пеніцилінки з середовищем, дотримуючись стерильності, цей крок теж робимо швидко. Після того як всі

пеніцилінки були заповненні, їх підписують та поміщають в термостат. В кінці роботи прибираємо ламінарний бокс (Рис. 3.2)



Рис 3.2. Ламінарний Бокс

Як показано в (Табл. 3.1) найкраще ефективність сорту Гектор 95% при концентрації 1:2 час стерилізації при такій концентрації 10 хвилин. Найнижчим показником ефективності є 60%, що є найнижчим показником з усіх трьох сортів, при концентрації 1:4 який стерилізується 20 хвилин [10]

Табл. 3.1 Стерилізація насіння сорту «Гектор»

Сорт «Гектор»					
Концентрація	Час стерилізації (хв)	Кількість насіння	Ефективність(%)		
1:2	10	100	88	95	91
1:3	15	100	81	75	77

1:4	20	100	69	60	64
-----	----	-----	----	----	----

Найкраща ефективність сорту «Ізід» показаний в таблиці (Табл. 3.2) була 97%, що є найвищим показником з усіх сортів при концентрації 1:2 та стерилізації 10 хвилин. Найнижчий показник ефективності 64%, концентрація якої є 1:4 при 20 хвилинах стерилізації

Табл. 3.2 Стерилізація насіння сорту «Ізід»

Сорт «Ізід»					
Концентрація	Час стерилізації (хв)	Кількість насінин	Ефективність (%)		
1:2	10	100	84	97	95
1:3	15	100	75	77	72
1:4	20	100	64	68	67

Останній сорт Марта F1 показав середню ефективність (Табл. 3.3). Найвищий показник ефективності 94% концентрація 1:2 при 10 хвилинах стерилізації. Найнижчий показник 63% при 20 хвилинах стерилізації

Табл. 3.3 Стерилізація насіння сорту «Марта F1»

Сорт «Марта F1»					
Концентрація	Час стерилізації (хв)	Кількість насінин	Ефективність (%)		
1:2	10	100	92	94	90
1:3	15	100	85	82	88
1:4	20	100	63	67	68

З усіх результатів які наведені вище ми можемо зробити висновок, що стерилізація при концентрації 1:2 є більш ефективною ніж 1:4.

В статті Навчально-науковий центр інституту біології та медицини сказано, що найкращий відсоток стерилізації за допомогою білизни був 33%, а

найгірший 17%. В статтях XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених в Київському національному університеті ім. Тараса Шевченка [49] опубліковано інші результати: 1 сорт мав найвищий показник - 78%, а найнижчий - 22%; 2 сорт мав найважчий показник - 63%, а найнижчий 20%; в 3 сорті показник варіюється в межах - 52%. Хоча наприклад такі стерилізуючі розчини, як діюрид та 3% розчин пероксиду водню, показали себе краще. Діюрид сумарно для всіх сортів має - 92%, 3% пероксид водню в середньому - 71%.

3.3 Отримання калюсу

Отримати калюс можна з декількох органів рослин, таких як: пагони, листки, корені або деяких типів клітин.

Для індукції калюсу ми будемо використовувати середовища МС. Середовище Уайта, Середовище В5.

Вирощування калюсів проводиться за температури 22-24 градусів без допомоги світла. Кожні 20 дні здійснюється пасерування. В кінці циклу ми визначили масу калюсу та індекс стабільності (резистентності), його ми можемо обрахувати кількістю останніх пасажів до перших.

Перше, що ми повинні дізнатися, як поведуть себе рослини в різних середовищах.

Табл. 3.4 Частота калюсоутворення в культурі на різних середовищах сорту «ГЕКТОР»

Експланти	Мс	Середовище		Концентрація
		Уайта 2,4-Д	В5 6-BAП К	
Корінець	+	+	+	10^7-10^6
Листок	+	+	-	10^7-10^4
Сім'ядольні листки	+	+	+	10^7-10^5

Стебло	-	+	-	+	10^7-10^7
Табл. 3.5 Характеристики утвореного калюсу зі сорту «ГЕКТОР»					
Експланти	Індукція калюсу	Маса	Колір	Консистенція	
Корінець	+	167г	Темно білий	Рихла	
Листок	++	184г	Світло зелений	Напів щільна	
Сім'ядольні листки	+++	159г	Світло зелений	Щільна	

Стебло	+++	193г	Світло зелене	Щільна
Табл. 3.6 Частота калюсоутворення в культурі на різних середовищах сорту «ІЗІД»				

СОРТ «ІЗІД»					
Експланти	Мс	Середовище	Середовище		Концентрація
		Уайга	B5		
	ЮК	24-д	6-ВАП	К	
Корінець	+	+	+	-	10^7-10^5
Листок	+	+	-	-	10^7-10^3
Сім'ядольні листки	+	+	+	+	10^7-10^4
Стебло	+	+	+	+	10^7-10^6

Табл. 3.7 Характеристики утвореного калюсу зі сорту «ІЗІД»

Експланти	Індукція калюсу	Маса	Колір	Консистенція
Корінець	++	177г	Білий	Напів щільна
Листок	+++	181г	Зелений	Щільна

Сім'ядольні листки	+	166г	Темно зелений	Рихла
Стебло	+++	194г	Світло зелене	Щільна

Табл. 3.8 Частота калюсоутворення в культурі на різних середовищах сорту «МАРТА F1»

Експланти	СОРТ «МАРТА F1»				Концентрація
	МС	Середовище Уайта	Середовище В5		
	ЮК	2,4-Д	6-ВАП	К	
Корінець	+	+		+	10^7-10^8
Листок	+	+	+	-	10^7-10^5
Сім'ядольні листки	+	+	+	+	10^7-10^7
Стебло	+	+		+	10^7-10^9

Табл. 3.9 Характеристики утвореного калюсу зі сорту «МАРТА F1»

Експланти	Індукція калюсу	Маса	Колір	Консистенція
Корінець	++	155г	Білий	Напів щільна
Листок	+++	179г	Зелений	Щільна
Сім'ядольні листки	++	164г	Зелені	Напів щільна
Стебло	++	188г	Зелене	Напів щільна

Посилаючись на (Табл. 3.5) найбільша індикація калюсу, в сорті «Гектор», було виявлено в стеблі та сім'ядольних листках. Маса калюсу стебла 193г. Маса сім'ядольних листків 159г. Щільність калюсу дуже висока в обох екземплярів.

Колір світло зелений. В (Табл. 3.4) показано частоту калюсоутворення експлантів на декількох середовищах з додаванням різних регуляторів росту.

В сорті «Ізіл», індукацію калюсу було виявлено в листках та стеблі (Табл. 3.7). Маса калюсу в калюсі листка 181г, в стеблі 194г. Щільність дуже висока. Колір листка зеленій, стебла світло зеленій. В (Табл. 3.6) показано частоту калюсоутворення експлантів на декількох середовищах з додаванням різних регуляторів росту.

Сорт «Марта F1» має лише 1 калюс листка (Табл. 3.9). Його маса 179г. Щільність висока. Колір зеленій. В (Табл. 3.8) показано частоту калюсоутворення експлантів на декількох середовищах з додаванням різних регуляторів росту.

3.4 Клітинна селекція

Концентрація NaCl та Na₂SO₄ (%)

2	4	6	8	12
---	---	---	---	----

Табл. 3.10. Концентрація NaCl та Na₂SO₄

Проводиться висадка калюсу в середовища в які було додано NaCl та Na₂SO₄ (Табл. 3.10) та обчислення сублетальної концентрації (20%).

Табл. 3.11 Висадка калюсу в середовище з NaCl/ Na₂SO₄

		СОРТ «ГЕКТОР»				
Концентрація		2%	4%	6%	8%	12%
Калюс стебла	Сублетальна концентрація	89%	54%	20%	10%	6%
		95%	75%	45%	21%	10%
		СОРТ «Ізіл»				
Концентрація		2%	4%	6%	8%	12%
Калюс листка	Сублетальна концентрація	93%	67%	22%	9%	5%
		98%	77%	49%	20%	11%

		СОРТ «МАРТА F1»				
Концентрація		2%	4%	6%	8%	12%
Калюс листка	Сублетальна	91%	58%	21%	7%	2%
	концентрація	92%	62%	40%	19%	9%

Калюс який ми змогли отримати (Рис 3.3) з різних експлантів огірка майже не мав морфологічних відмінностей. Можна сказати, що майже всі калюсні експланти які, змогли витримати сублетальну концентрацію NaCl та Na₂SO₄ майже нічим не відрізнялись (Табл. 3.11). Були виявлені дуже хороші калюси, які мали здоровий колір, гарну щільність. Хоч і вигляд у всіх калюсів був схожий, маса у кожного була різна. На такий результат може вплинути як, дуже гарна індукція живильного середовища або прекрасні експланти (Табл. 3.12).



Рис. 3.3 Калюсна культура

Табл. 3.12 Відбір калюсу для проведення клітинної селекції

Селекцію можна провести тільки на 5 калюсах (NaCl)

Калюс Сім'ядольного листка(ГЕКТОР)	18% Підходить до селекції
Калюс стебла(ГЕКТОР)	20% Підходить до селекції
Калюс листка(ІЗІД)	22% Підходить до селекції
Калюс стебла(ІЗІД)	23% Підходить до селекції
Калюс листка(МАРТА F1)	21% Підходить до селекції

Селекцію можна провести тільки на 5 калюсах (Na_2SO_4)

Калюс Сім'ядольного листка(ГЕКТОР)	20% Підходить до селекції
Калюс стебла(ГЕКТОР)	22% Підходить до селекції
Калюс листка(ІЗІД)	24% Підходить до селекції
Калюс стебла(ІЗІД)	21% Підходить до селекції
Калюс листка(МАРТА F1)	23% Підходить до селекції

Табл. 3.13 Вживання калюсу сорту «Гектор» на селективному середовищі

Сорт культури	Кількість живих калюсів NaCl			Кількість живих калюсів Na_2SO_4		
	Лінія	%	Шт.	Лінія	%	Шт.
Сорт «Гектор»	Г1	22	201	Г1	30	260
	Г2	17	134	Г2	26	225

Г3	29	238	Г3	35	310
Г4	25	205	Г4	29	247

Табл. 3.14 Вживання калюсу сорту «Ізід» на селективному середовищі

Сорт культури	Кількість живих калюсів NaCl			Кількість живих калюсів Na ₂ SO ₄		
	Лінія	%	Шт.	Лінія	%	Шт.
Сорт «Ізід»	І1	14	114	І1	26	231
	І2	27	195	І2	28	222
	І3	29	200	І3	31	255
	І4	20	157	І4	25	207

Табл. 3.15 Вживання калюсу сорту «Марта F1» на селективному середовищі

Сорт культури	Кількість живих калюсів NaCl			Кількість живих калюсів Na ₂ SO ₄		
	Лінія	%	Шт.	Лінія	%	Шт.
Сорт «Марта F1»	М1	39	267	М1	43	364
	М2	26	171	М2	28	234
	М3	24	155	М3	24	199
	М4	18	142	М4	22	198

Маємо такі результати (NaCl): в сорті «Гектор» найбільший відсоток живих калюсів 29, найбільша кількість 238шт. Найменший відсоток живих калюсів 17, найменша кількість 134шт. (Табл. 3.13)

В сорті «Ізід» найвищий відсоток живих калюсів 29, а максимально висока кількість 200 шт. Найменший показник серед цього сорту по відсотку живих калюсів 14, по кількості 114 шт. (Табл. 3.14)

Останній сорт «Марта F1» має найкращі показники з усіх сортів. Найвищий відсоток живих калюсів 39, кількісно 267 шт. Найнижчий показник 18%, та 142 шт. живих калюсів. (Табл. 3.15)

Результати (Na_2SO_4): в сорті «Гектор» найбільший відсоток живих калюсів 35, найбільша кількість 310шт. Найменший відсоток живих калюсів 26, найменша кількість 225шт. (Табл. 3.13)

В сорті «Ізід» найвищий відсоток живих калюсів 31, а максимально висока кількість 255 шт. Найменший показник серед цього сорту по відсотку живих калюсів 25, по кількості 207 шт. (Табл. 3.14)

Останній сорт «Марта F1» має найкращі показники з усіх сортів. Найвищий відсоток живих калюсів 43, кількісно 364 шт. Найнижчий показник 22%, та 198 шт. живих калюсів. (Табл. 3.15)

Висновок: Серед всіх трьох сортів (NaCl) найкраще себе показав сорт «Марта F1». Найкращий % живих калюсів 39 («Марта F1»), найнижчий 14 («Ізід»). Найбільше кількість живих клітин 267 шт. («Марта F1»), найменша

114 шт. («Ізід»). Сумарно найбільшу кількість калюсу має сорт «Гектор» - 778шт., найменшу Сорт «Ізід» -666 шт., сорт «Марта F1» має -735 шт.

Серед всіх трьох сортів (Na_2SO_4) найкраще себе показав сорт «Марта F1». Найкращий % живих калюсів 43 («Марта F1»), найнижчий 22 («Марта F1»).

Найбільше кількість живих клітин 364 шт. («Марта F1»), найменша 198 шт.

(«Марта F1»). Сумарно найбільшу кількість калюсу має сорт «Гектор» - 1042шт., найменшу Сорт «Ізід» -915 шт., сорт «Марта F1» має -995 шт.

Табл. 3.16 Регенерація калюсної лінії сорту «Гектор» з отриманням рослин регенерантів ($\text{NaCl}/\text{Na}_2\text{SO}_4$)

Генотип	Калюсна лінія	Частота регенерації(%)	Отримання рослин регенерантів
---------	---------------	------------------------	-------------------------------

Лінії Гектор	Г1	24/31	194/256
	Г2	15/19	122/166
	Г3	33/26	225/243
	Г4	28/29	198/276

Табл. 3.17 Регенерація калюсної лінії сорту «Ізід» з отриманням рослин регенерантів (NaCl/ Na₂SO₄)

Генотип	Калюсна лінія	Частота регенерації(%)	Отримання рослин регенерантів
Лінії Ізід	Г1	11/19	103/166
	Г2	25/31	183/260
	Г3	26/33	187/248
	Г4	18/24	146/220

Табл. 3.18 Регенерація калюсної лінії сорту «Марта F1» з отриманням рослин регенерантів (NaCl/ Na₂SO₄)

Генотип	Калюсна лінія	Частота регенерації(%)	Отримання рослин регенерантів(шт.)
Лінії Марта F1	М1	35/35	244/281
	М2	23/28	162/254
	М3	20/22	148/200
	М4	14/23	136/219

Найбільш велика частота(NaCl) регенерації в сорті «Гектор» є Г3-33%, що майже найвищий показник серед всіх інших частот регенерації. Найнижчий показник має Г2-15%. Рослин регенерантів найбільше в Г3 який має досить великий показник, а саме -225 шт. найменший показник в Г2-122 шт. (Табл.

3.16)

В сорті «Ізід» найвищий відсоток регенерації має Г3-26%, не далеко від нього знаходиться лінія Г2-25%. Найнижчим показником є Г1-11%. Що до рослин

регенерантів, найвищим показником є лінія І3-187 шт. найнижчим серед всіх показників сортів є І1-103 шт. (Табл. 3.17)

Останній сорт «Марта F1» виділився найвищим показником частоти регенерації серед всіх показників сортів-35% у лінії М1, найнижча частота у лінії М4-14%.

Рослин регенерантів найбільше в лінії М1-244 шт. найменше в лінії М4-136 шт. (Табл. 3.18)

Найбільш велика частота (Na_2SO_4) регенерації – в сорті «Гектор» є Г1-31%, що майже найвищий показник серед всіх інших частот регенерації . Найнижчий

показник має Г2-19%. Рослин регенерантів найбільше в Г4 який має досить великий показник, а саме -276 шт. найменший показник в Г2-166 шт. (Табл. 3.16)

В сорті «Ізід» найвищий відсоток регенерації має І3-33%, не далеко від нього знаходиться лінія І2-31%. Найнижчим показником є І1-19%. Що до рослин регенерантів, найвищим показником є лінія І2-260 шт. найнижчим серед всіх показників сортів є І1-166 шт. (Табл. 3.17)

Останній сорт «Марта F1» виділився найвищим показником частоти регенерації серед всіх показників сортів-35% у лінії М1, найнижча частота у лінії М3-22%.

Рослин регенерантів найбільше в лінії М1-281 шт. найменше в лінії М2-200 шт. (Табл. 3.18)

Робимо висновок:

(NaCl) сумарно найвищий показник отримання рослини регенерантів у сорту «Гектор»-739шт., найменшим є сорт «Ізід» -619 шт., найвищий відсоток регенерації у сорту «Марта F1» -35%, найнижчим є сорт «Ізід» -11%.

(Na_2SO_4) сумарно найвищий показник отримання рослини регенерантів у сорту «Марта F1» -954шт., найменшим є сорт «Ізід» -894 шт., найвищий відсоток

регенерації у сорту «Марта F1» -35%, найнижчим є сорт «Ізід» та сорт «Гектор» -19%.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Висновок

Висновок 1: Введення культури огірка в умови ін vitro відбулося успішно. Всі насіння огірка були посаджені в пеніцилінку з дотриманням усіх стерильних норм.

Висновок 2: Було проведено отримання калюсу з експлантів огірка, а саме з: пагона, сім'ядольного листка, кореня та листка. Це дає нам змогу визначити такі показники: маса, колір, консистенція та індукцію калюсу, на всіх трьох сортах огірка.

Висновок 3: Було відібрано найбільш кращий калюс, який ми висадили в середовищі з різною концентрацією NaCl та Na_2SO_4 з подальшим обчисленням сублетальної концентрації. З проведеної клітинної селекції ми визначили найбільш відповідну концентрацію, а саме 6% NaCl та 8% Na_2SO_4 .

Висновок 4: Результати калюсу на селективному середовищі.

(NaCl) Найкраще себе показав сорт «Гектор» у якого найвищий результат сумарної кількості калюсу (778шт.), найгірше продемонстрував себе сорт «Ізід» (666шт.), сорт «Марта F1» показав результати наближені до сорту «Гектор» (735шт). Найкращий показник сорт «Марта F1» лінія M1-39%, найгірший 14% в сорті «Ізід» лінія I1.

(Na₂SO₄) Найкращим виявився сорт «Гектор» він має найбільший результат сумарної кількості калюсу (1042шт), найгірший результат має сорт «Ізід» -915 шт. сорт «Марта F1» показав результати наближені до сорту «Гектор» (995 шт) Найкращий показник сорт «Марта F1» лінія M1-43%, найгірший 22% в сорті «Марта F1» лінія M4

Висновок 5: При регенерації калюсу в якому отримують рослини регенеранти. Ми отримали такі результати:

(NaCl) найкраща чистота регенерації в сорту «Марта F1» лінія M1 35%, найгірший «Ізід» лінії I111%. Найбільше число рослин регенерантів 244шт сорт «Марта F1», найменше сорт «Ізід» 103 шт.

(Na_2SO_4) найкраща чистота регенерації в сорту «Марта F1» лінія M1 35%, найгірший «Ізід» лінія I1 та «Гектор» лінія I2 19%. Найбільше число рослин регенерантів 281 шт сорт «Марта F1» / найменше «Ізід» та «Гектор» 16 шт.

Підводячи висновок: Сорт «Марта F1» показав себе найкраще, в нього найвищі показники живих калюсів та рослин регенерантів, трохи гірше показав себе сорт «Гектор» а найгірше «Ізід». Було отримано сорти які окрім своїх стандартних характеристик, отримали стійкість до NaCl та Na_2SO_4 .

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

Список літератури

Інтернет джерела

[1] <http://pplus.in.ua/news/og-roki-naspravd-ovoch-frukt-chi-mozливо-vagoda>

a

[2] <https://agrarii-razom.com.ua/culture/ogirki>

[3] <https://asterias.od.ua/665-ogirki-viroshchuvannya-i-doglyad-u-vidkritomu-gruntі-posadka-na-rozsadu.html>

[4] <https://almedia.com.ua/bdzholozapilni-sorti-ogirkiv/#:~:text=%D0%AF%D0%BA%20%D0%B2%D1%96%D0%B4%D0%B1%D1%83%D0%B2%D0%B0%D1%94%D1%82%D1%8C%D1%81%D1%8F%20%D0%B7%D0%B0%D0%BF%D0%B8%D0%BB%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F%20%D0%BE%D0%B3%D1%96%D1%80%D0%BA%D1%96%D0%B2,-%D0%94%D0%BB%D1%8F%20%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D1%89%D0%BE%D0%B1&text=%D0%9A%D1%80%D1%96%D0%BC%20%D1%86%D1%8C%D0%BE%D0%B3%D0%BE%2C%20%D1%83%20%D1%87%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%87%D0%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%BA%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%BA%D0%B8,%D1%86%D1%8E%20%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D1%82%D1%83%20%D1%96%20%D0%B2%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%83%D1%8E%D1%82%D1%8C%20%D0%B1%D0%B4%D0%B6%D0%BE%D0%BB%D0%B8.>

BA%D1%96%D0%B2,-

%D0%94%D0%BB%D1%8F%20%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BE%2

0%D1%89%D0%BE%D0%B1&text=%D0%9A%D1%80%D1%96%D0%BC

%20%D1%86%D1%8C%D0%BE%D0%B3%D0%BE%2C%20%D1%83%2

0%D1%87%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D1%96%D1%87%D0

%BE%D0%B3%D0%BE%20%D0%BA%D0%B2%D1%96%D1%82%D0%

BA%D0%B8,%D1%86%D1%8E%20%D1%80%D0%BE%D0%B1%D0%BE

%D1%82%D1%83%20%D1%96%20%D0%B2%D0%B8%D0%BA%D0%BE

E%D0%BD%D1%83%D1%8E%D1%82%D1%8C%20%D0%B1%D0%B4%

D0%B6%D0%BE%D0%BB%D0%B8.

[5] <https://dyvys.info/2020/02/29/istoriya-kozhnogo-ovocho-na-yashomu-stoli-vv-ne-poviryte-zvidky-pryshly-ogirky/>

[6] https://studopedia.com.ua/1_53968_klitinna-selektsiya-roslyn.html

[7] https://agromage.com/stat_id.php?id=22#:~:text=%D0%9E%D0%B3%D1%96%D1%80%D0%BE%D0%BA%20%E2%80%93%20%D1%86%D0%B5%20%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%B0%2C%20%D0%BE%D0%B4%D0%BB%D0%BE%D0%BA

96%D1%80%D0%BE%D0%BA%20%E2%80%93%20%D1%86%D0%B5%

20%D0%BE%D0%B4%D0%BD%D0%BE%D1%80%D1%96%D1%87%D0

%BD%D0%B0%2C%20%D0%BE%D0%B4%D0%BB%D0%BE%D0%BA

[%D0%BE%D0%BC%D0%BD%D0%B0%2C,%D0%BC%D1%96%D1%81%D1%86%D0%B5%20](https://agroprof.com.ua/ua/luchshie-sorta-ogurtsov-dlya-teplits/)

[8] <https://agroprof.com.ua/ua/luchshie-sorta-ogurtsov-dlya-teplits/>

[9] <https://valest.com.ua/shtuchne-zapilennja-jak-zaluchiti-komah-i/>

[10] <https://internetkaplya.com.ua/news/tehnologiyaviroshchuvannya-ogirka-v-umovakh-zakhishchenogo-gruntu/>

[11] <https://build-journal.ru/uk/loop/kak-pravilno-sobrat-semena-s-ogurcov-i-kogda-kak-vyrastit-ogurec-na/>

[12] <http://dachasadovnika.ru/%D0%BE%D0%B3%D1%83%D1%80%D1%86%D1%8B%D0%B7%D0%B8%D0%BC%D0%BE%D0%B9%D1%82%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D1%86%D0%B0%D0%B4%D0%BB%D1%8F%D0%B2%D1%8B%D1%80%D0%B0%D1%89%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F/>

[13] [http://dspace.mnau.edu.ua/ispui/bitstream/123456789/2081/1/Osnovy biotekhnologiyi roslin.pdf](http://dspace.mnau.edu.ua/ispui/bitstream/123456789/2081/1/Osnovy%20biotekhnologiyi%20roslyn.pdf)

[14] [http://dspace.mnau.edu.ua/ispui/bitstream/123456789/3259/1/Chornyi Ocinka jakosti gruntiv.pdf](http://dspace.mnau.edu.ua/ispui/bitstream/123456789/3259/1/Chornyi%20Ocinka%20jakosti%20gruntiv.pdf)

[15] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[16] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[17] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[18] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[19] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[20] <http://r.donnu.edu.ua/bitstream/123456789/36/1/%D0%90%D0%B4%D0%B0%D0%BF%D1%82%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%20%D0%B4%D0%BE%20%D0%B0%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BB%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2.pdf>

[16] <https://genetics.udau.edu.ua/assets/files/06.2020-naukovi-vidannya/selekcija-2017.pdf#page=133>

[17] <https://genetics.udau.edu.ua/assets/files/01.01.2021-2022-makarchuk-rob-sil-opis/41s-snpvaok-metodichka-dlya-laborat.pdf>

Статті

[18] Т. М. Мамушкіна, О. М. Дробітько, В. Т. Миколайчук // ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЙ РОСЛИН

[19] Т. І. Віценя // ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ СЕЛЕКТИВНОГО ФАКТОРА ДИФЕРЕНЦІАЦІЙНИХ ЗРАЗКІВ ОГУКУ НА РОЗЧИНІСТЬ У КУЛЬТУРІ В VITRO

[20] Л. М. БУЦЕНКО, Ю. В. КОЛОМІЄЦЬ // КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР TRITICUM AESTIVUM L. НА СТІЙКІСТЬ ДО ЗБУДНИКА БАЗАЛЬНОГО БАКТЕРІОЗУ

[21] С. В. ПИКАЛО, О. В. ДУБРОВНА // СЕЛЕКЦІЯ IN VITRO ТРИТИКАЛЕ СЗИМОГО НА СТІЙКІСТЬ ДО ЗАСОЛЕННЯ ТА АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ ФОРМ

[22] Т. В. ІВЧЕНКО, Т. І. ВІЦЕНЯ, О. В. СЕРГІЄНКО // ВИКОРИСТАННЯ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ IN VITRO ДЛЯ ДОБОРУ СТІЙКОГО ДО ФУЗАРІОЗНОГО В'ЯНЕННЯ (FUSARIUM OXYSPORUM) ВИКІДНОГО МАТЕРІАЛУ ОГІРКА

[23] С. В. Пикало, О. В. Дубровна // СТІЙКІСТЬ ДО АБІОТИЧНИХ СТРЕСОРІВ РОСЛИН R1 ТРИТИКАЛЕ, ОТРИМАНИХ ШЛЯХОМ КЛІТИННОЇ СЕЛЕКЦІЇ

[24] Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол // КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ТА КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

[25] Nalobova, V. L. (2005). Seleksiya ogurtsa na ustoychivost k bolezniam [Selection of cucumber on disease resistance]. Minsk: «Belprint», 198.

[26] Ignatova, S. A. (2004). Biotehnologicheskie osnovy polucheniya gaploidov, otdalennykh gibridov i somaticheskikh regenerantov zemovykh i bobovykh kultur v

razlichnykh sistemakh in vitro [Biotechnological bases of reception haploids and wide hybrids somatic regenerants cereals and legumes in different in vitro systems]. Yalta, 48.

[27] Shayakhmetov, I. F., Surina, O. V., Mulyukova, G. A. (1994). Kletchnaya selektsiya yarovoy pshenitsy na ustoychivost k kornevym gnilyam [Cellular selection of spring wheat for resistance to root rot]. *Genetika*, 30, 181.

[28] Lebeda, A., Syabova, L. (1997). Variation in response of several wild *Pisum* spp. to *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Cereal Res Commun*, 25, 845-846.

[29] Tkacheva, A. A., Polyakov, A. B., Biryukova, N. K. (2004). Usovershenstvovannyi metod otsenki selektsionnogo materila ogurtsa na ustoychivost k fuzarioznomu uvyadaniyu [An improved method for evaluation of cucumber breeding material for resistance to *Fusarium* wilt]. Problems of scientific support for vegetable growing south of Russia: Materials of the International scientific-practical conference KNIIOKH RAAS, Krasnodar, 70-75.

[30] EL-Kazzaz, A. A. EL-Mougy, Nehal, S. (2001). Inheritance of disease resistance in cucumber plants to root rot caused by *Fusarium solani* using tissue culture techniques. *Egypt. J. Phytopathol*, 29 (2), 57-68.

[31] Rubin, B. A., Artsikhovskaya, Ye. V., Aksenov, V. A. (1975). Biokhimiya i fiziologiya immuniteta rasteniy [Biochemistry and physiology of plant immunity]. Moscow: Vysshaya shkola, 320.

[32] Ivchenko, T. V., Kornilenko, S. I., Kondratenko, S. I. et al. (2013). Klitynni tekhnolohii stvorennia vykhidnoho selektsiinoho materialu osnovnykh ovochevykh roslyn v kulturi in vitro (metodychni rekomendatsii) [Cellular technology of initial breeding material basic vegetables in culture in vitro (guidelines)]. Kharkiv: Pleiada, 47.

[33] Murashige, T. F., Skoog, A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.

[34] Bilay, V. I. (1977). Fuzarii [Fusarium]. Kyiv: Naukova dumka, 443.

[35] Биотехнология растений: культура клеток. од ред. Бутенко Р. Г. Москва: Агропромиздат, 1989. 284 с.

[36] Бутенко Р. Культура клеток растений и биотехнология. Москва: Наука, 1986. 236 с.

[37] Бутенко Р. Г., Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений. Москва: Наука, 1983. 254 с.

[38] Глазко В. И. Генетически модифицированные организмы: от бактерии до человека. Київ: КВИЦ, 2002. 210 с.

[39] Глазко В. И. Агрехимический аспект биосферы: проблема генетического разнообразия. Київ: Норапринт, 1998. 209 с.

[40] Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. Київ: Наук. думка, 1984. 159 с.

[41] Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Київ: Наукова думка, 1980. 487 с.

[42] Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.

[43] Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений. Київ: Наук, думка, 1997. 152 с.

[44] Левенко Б. А. Трансгенные растения. Київ, 2000. 305 с.

[45] Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. Київ: ПошграфКонсалтинг, 2003. 520 с.

[46] Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. И., Прокофьева М. И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. Москва: Наука, 1990. 257 с.

[47] Пузік В. К. Культура ізольованих органів тканин і клітин у біотехнології рослин. харків, 1997. 100 с.

[48] Рудишин С. Д. Основы біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 224 с.

[49] «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances»: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.)