

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет агротехнологій та природокористування

Кафедра біотехнології та хімії

Допущено до захисту

Завідувач кафедри Коваленко В.М.

«»2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
ЗА ПЕРШИМ (БАКАЛАВРСЬКИМ) РІВНЕМ ВИЩОЇ ОСВІТИ**

**Дослідження реакції сортів картоплі на
оздоровлення культурі *in vitro***

за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Виконала

.....
Підпис

Масік К.А.

Прізвище, ініціали

Група

БІО2001

Назва групи

Науковий керівник

.....
Підпис

Коваленко В.М.

Прізвище, ініціали

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет агротехнологій та природокористування

Кафедра біотехнології та хімії

Освітній ступінь - "Бакалавр"

Спеціальність – 162 "Біотехнології та біоінженерія"

“ЗАТВЕРДЖУЮ”:

Завідувач кафедри

В.М. Коваленко

" ____ " _____ 2024 р.

ЗАВДАННЯ

на кваліфікаційну роботу

Масік Крістіни Андріївни

ІІБ студента

1. Тема роботи " Дослідження реакції сортів картоплі на оздоровлення культури in vitro "

Затверджено наказом по університету від “ ____ ” _____ 202__ р. №

2. Термін здачі студентом закінченої роботи на кафедру _____.

3. Вихідні дані до роботи:

- місце проведення досліджень: ІНВК СНАУ

- методичне забезпечення: _____

- схема досліджу: _____

4. Перелік завдань, які будуть виконуватися в роботі: _____

Керівник кваліфікаційної роботи к.с.-г.н., доцент Коваленко В.М.

Завдання прийняв до виконання _____

Дата отримання завдання « ____ » _____ 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Масік К.А., " Дослідження реакції сортів картоплі на оздоровлення культури in vitro "

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня бакалавр за спеціальністю (162 – Біотехнології та біоінженерія). – Сумський національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України, Суми, 2024.

Участь у наших дослідженнях реакції сортів картоплі при оздоровленні в умовах in vitro виявила різні особливості, господарсько-цінні характеристики та відрізняються за біохімічним складом бульб. Біологічні особливості цих сортів включають різні параметри бульбоутворення, розміри та тривалість активності асиміляційної поверхні листя, продуктивність фотосинтезу, швидкість зростання та розвитку вегетативної маси рослин. Проте наразі і в найближчій перспективі нашою головною метою є підвищення потенціалу продуктивності та оптимальне використання генетичних ресурсів сортів картоплі з високим або середнім рівнем виявлення комплексу агрономічних характеристик.

За даними у дослідженнях можна зробити висновок, що реакція сортів на використання методу оздоровлення in vitro була різною за показником продуктивності.

Дослідження проводились впродовж 2024 року. Методика досліджень загальноприйнята в картоплярстві.

Ключові слова: оздоровлений посадковий матеріал; мікроклональне розмноження; картопля; живильне(поживне) середовище; адаптація до умов in vitro.

ABSTRACT

Masik K.A., "Study of the reaction of potato varieties to in vitro culture recovery"

Qualification work for obtaining a bachelor's degree in the specialty (162 - Biotechnology and Bioengineering). - Sumy National Agrarian University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2024.

Participation in our studies of the reaction of potato varieties to in vitro conditions revealed different features, economically valuable characteristics and differ in the biochemical composition of tubers. Biological features of these varieties include different parameters of tuber formation, size and duration of activity of the assimilation surface of leaves, photosynthesis productivity, growth rate and development of vegetative mass of plants. However, currently and in the near future, our main goal is to increase the productivity potential and optimally use the genetic resources of potato varieties with a high or medium level of detection of a complex of agronomic characteristics. However, currently and in the near future, our main goal is to increase the productivity potential and optimally use the genetic resources of potato varieties with a high or medium level of detection of a complex of agronomic characteristics.

According to the research data, it can be concluded that the response of varieties to the use of the in vitro recovery method was different in terms of productivity.

The research was conducted during 2024. The research methodology is generally accepted in potato growing.

Keywords: healthy planting material; microclonal propagation; potatoes; nutrient medium; adaptation to in vitro conditions.

План

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	9
ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ З КУЛЬТУРОЮ IN VITRO	9
1.1 Оснащення та організація простору	9
1.2 склад живильних середовищ	11
1.3 Створення умов стерильності	15
1.4 Введення в аспетичну культуру та виділення меристем	16
РОЗДІЛ 2	19
МЕТОД ХІМІОТЕРАПІЇ НА ОЗДОРОВЛЕННЯ КАРТОПЛІ	19
2.1 Хіміотерапія при оздоровленні рослин картоплі	19
2.2 Ефективність регенерації та оздоровлення при використанні антивірусних сполук	24
РОЗДІЛ 3	28
Отримання мікробульб та мінібульб	28
3.1 Метод отримання мікробульб в пробірці	28
3.2 Потенціал отриманих мінібульб з пробіркових рослин картоплі та мікробульб в первинному насінництві картоплі	30
Список літературних джерел	35

ВСТУП

Сучасні підходи до оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі включають не лише традиційні методи індивідуального добору рослин, що розмножуються соматично, але й інноваційні біотехнологічні методи, зокрема культуру меристем.

Метод культури апікальних меристем став домінуючою терапевтичною стратегією для елімінації вірусних інфекцій у рослин. Цей метод ґрунтується на вирощуванні рослин з апікальних меристем, тобто верхівок точок росту, які зазвичай вільні від вірусів.

Метод має багато переваг, такі як:

- висока ефективність дозволяє отримати значно більший відсоток оздоровлених рослин порівняно з клонним добром.
- він може бути проведений протягом коротшого проміжку часу, що дозволяє швидше отримати оздоровлений матеріал.
- отримані рослини є більш стійкими до вірусних інфекцій, що робить їх більш продуктивними та витривалими.

Однак, метод культури апікальних меристем має і недоліки, які зазвичай усуваються ретельним тестуванням оздоровленого матеріалу, наявністю спеціального обладнання і залученням кваліфікованою підготовкою персоналу.

Незважаючи на ці обмеження, культура апікальних меристем залишається одним з найефективніших методів оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі та інших сільськогосподарських культур.

Завдяки цьому методу успішно оздоровлено широкий спектр сільськогосподарських культур, включаючи картоплю, суницю, гвоздику, яблуню, шовковицю, черешню, смородину та інші.

Найбільш детально розроблені умови культивування меристем саме для картоплі, що робить цю культуру одним з лідерів у застосуванні методу культури апікальних меристем.

Під дією зовнішніх чинників віруси, і будь який організм, здатні до отримання нових ознак, відмінних від батьківських. Вони можуть змінювати свій фізіологічний стан, ставати шкодочинними.

В умовах *in vitro* мутації вірусу спричиняються дією зміни температури, хімічних речовин та умов культивування. Тому зі змінною ознак вірусів у гіршу сторону та появою нових, неідентичних за стійкістю сортів виникає попит на більш ефективні заходи оздоровлення.

В боротьбі з фітопатогенними вірусами хімічна терапія стає необхідною мірою, коли інші методи вже не дієві. Особливо актуально її застосування, коли сорт вже інфікований.

У випадках сильного, а іноді й повного ураження, метод хіміотерапії в поєднанні з культурою апікальних меристем стає єдиним радикальним способом отримати безвірусні рослини. Цей комплексний підхід впливає на зовнішній стан рослин (в бік покращення) та на врожайність , яка суттєво зростає. Рівень приросту врожаю залежить від сорту картоплі та може варіюватися від 30 до 50%.

При застосуванні методу хіміотерапії для оздоровлення рослин від вірусів, надзвичайно важливо зберегти всі характеристики та параметри вихідного сорту. Тому, окрім контролю вірусологічного стану за допомогою імуноферментного аналізу та полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотньою транскрипцією (ЗТ-ПЛР), необхідно проводити ідентифікацію оздоровлених ліній та сортів на рівні ДНК за допомогою ПЛР-аналізу. Це дозволяє гарантувати, що в процесі оздоровлення не відбулося ніяких змін в генетичному коді рослини, і вона зберегла всі свої оригінальні властивості.

Метою дослідження є реакції сортів картоплі на оздоровлення методом культури *in vitro*.

Об'єктом дослідження дипломної роботи є різні сорти картоплі, які використовуються в Україні та мають різну стійкість до вірусних інфекцій.

Предметом дослідження є картопля, що підлягає позбавленню від вірусних та грибкових інфекцій та розмноження її, шляхом культивування *in vitro*.

Практичним значенням роботи можуть бути описані розробки ефективних методів оздоровлення та вирощування картоплі в умовах *in vitro*, що сприятиме поліпшенню якості та врожайності культур. Визначення оптимальних умов для оздоровлення різних сортів картоплі дозволить аграріям та науковцям створювати стійкі до хвороб і шкідників рослини, знижуючи втрати врожаю і підвищуючи продуктивність агропромислового комплексу. Це дослідження також може стати основою для подальших робіт у сфері біотехнології, спрямованих на поліпшення генетичних характеристик картоплі та інших сільськогосподарських культур.

Структура та обсяг роботи. Загальна кількість сторінок комп'ютерного набору становить 35 сторінок: таблиць – 1. Кількість використаних джерел –18.

РОЗДІЛ 1

ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ З КУЛЬТУРОЮ IN VITRO

1.1 Оснащення та організація простору

Для ефективної роботи з культурою *in vitro* необхідно створити спеціально обладнані кімнати, кожна з яких виконує свою функцію:

1. Кімната для миття посуду:

Призначення: забезпечення чистоти та стерильності посуду, який використовується в роботі з культурами.

Оснащення:

- Глибокі раковини або ванна для миття великої кількості посуду.
- Холодна та гаряча вода.
- Примусова вентиляція.
- Стелажі для сушіння лабораторного посуду.
- Сушильні шафи для стерилізації посуду (160-180 °C).
- Дистилятор для отримання чистої води.

2. Кімната для приготування середовищ:

Призначення: приготування живильних середовищ, необхідних для вирощування культур *in vitro*.

Оснащення:

- Технічні, аналітичні та торсійні ваги для точного вимірювання компонентів середовища.
- рН-метр для контролю кислотності середовища.
- Магнітні мішалки для рівномірного розчинення компонентів.
- Водяні бані для підтримки певної температури середовища.
- Електроплитки для нагрівання води.
- Дистилятор та бідистилятор для отримання чистої води.
- Витяжна шафа для видалення шкідливих випарів.
- Холодильник для зберігання реактивів.
- Лабораторні меблі, посуд та інструменти.

3. Автоклавна:

Призначення: стерилізація живильних середовищ, інструментів та посуду для запобігання забрудненню культур.

Оснащення:

- Горизонтальні (ГК-100) або вертикальні автоклави класу "В" (АВ - 75, ВК - 60, ВК - 75).
- Примусова вентиляційна система.

4. Стерильна кімната (бокс):

Призначення: забезпечення стерильних умов для пересаджування культур *in vitro*.

Оснащення:

- Ламінар-бокси (УОБВ, УОБГ, КПГ-1, БП-4-00-4, СМ-5, КП-5).
- Бактерицидні лампи (БУФ-15, ОБП-300, БУФ-30) для стерилізації повітря.

5. Культуральна кімната:

Призначення: вирощування культур *in vitro* в оптимальних умовах для їх розвитку.

Оснащення:

- Термостат для підтримки постійної температури (20-24 °С).
- Система зволоження для підтримки оптимальної вологості (70%).
- Світлові лампи для забезпечення 16-годинного світлового дня.
- Система кондиціонування повітря для підтримки чистоти та свіжості.

Для обладнання кімнат можна використовувати як вітчизняне, так і зарубіжне обладнання. Для підвищення ефективності роботи з культурами *in vitro* можна використовувати автоматизовані системи та обладнання.

Необхідно суворо дотримуватися правил асептики та стерильності на всіх етапах роботи з культурами *in vitro*.

Регулярно проводити дезінфекцію та стерилізацію кімнат та обладнання, занотовуючи всі дані відповідно до журналів ведення асептики.

Залучати до роботи кваліфікований персонал з досвідом роботи в цій галузі. Постійно вдосконалювати методи роботи та впроваджувати новітні розробки в цій сфері. Дотримуючись цих принципів, можна створити оптимальні умови для роботи з культурами *in vitro* та отримати якісні результати.

1.2 склад живильних середовищ

Вирощування рослин *in vitro* стає все більш популярним методом у біотехнології та селекції. Для успішного культивування важливо підібрати оптимальне живильне середовище, яке відповідатиме фізіологічним потребам конкретної рослини.

Основою живильного середовища служать мінеральні солі, що забезпечують рослину необхідними макро- та мікроелементами. Мурасіге-Скуга (MS) є найпоширенішим середовищем, склад мінеральної основи котрого наведений в таблиці 1.

Таблиця 1

Заготівля поживних розчинів для культури рослин на основі середовища MS (Murashige, Skoog, 1962)

Компоненти	Кількість речовини	Об'єм на 1л середовища, мл	Примітка
Макроелементи, г/л: NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ · 7H ₂ O KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ · 2H ₂ O	16,5 19,0 3,7 1,7 4,4	100	Кожен компонент розчиняють по черзі в бідистильованій воді, використовуючи концентрацію, що вдесятеро вища за необхідну. Солі кальцію готують окремо, щоб уникнути випадання осаду.
Мікроелементи, мг/л: KI* H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4H ₂ O ZnSO ₄ · 7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O* CuSO ₄ · 5H ₂ O CoCl ₂ · 6 H ₂ O	83 620 2230 860 25 2,5 2,5	5	Розчинення проводять з 100-кратною концентрацією. * - розчиняють індивідуально та додають у формі розчинів.
Джерело заліза, мг/100		5	Розчинення солей

мл FeSO ₄ •7H ₂ O Na ₂ ЄДТА • 2H ₂ O (трилон - Б)	557 745		проводять окремо з нагріванням. Компоненти змішують у чітко визначеній послідовності 1+2.
Органічні речовини, мг/мл Мезоінозит, мг Гідролізат казеїна, мг Тіамін HCl (B1) Піридоксин - HCl (B6) Нікотинова кислота Фолієва кислота Аденін сульфат Гліцин Біотин 6 – Бензиламінопурин (БАП) 6 – Фурфуроламіно- пурин (Кінетин) Індоліл - 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		Органічні речовини готують у формі окремих розчинів з відповідними концентраціями та об'ємами, зручними для роботи. Титрування ауксинів проводять у розчині за допомогою NaOH. Розчинення цитокинінів проводять у розведеному NaOH або розведеному спиртовому розчині.
Сахароза		10	
Агар		6	

Цей склад забезпечує збалансоване та достатнє живлення меристем, з яких вирощують рослини *in vitro*.

Окрім мінеральних солей, до складу живильного середовища додають вітаміни, які відіграють важливу роль у різних метаболічних процесах рослини. Найбільш важливими вітамінами для культури *in vitro* є B1, B6 та аскорбінова кислота.

Для стимуляції росту та розвитку меристем до живильного середовища додають органічні речовини, такі як мезоінозит(інозитол), біотин, нікотинамід, гідролізат казеїну та регулятори росту- фітогормони- група гормонів, які впливають на різні процеси розвитку рослини, такі як ризогенез (утворення коренів), каулогенез (утворення стебел) та органогенез (утворення бруньок).

Ауксини стимулюють ризогенез. Найчастіше використовують ІОК (β-індоліл-3-оцтова кислота) в концентрації 1-2 мг/л. Як стимулятор рісту стебел,

використовують гібереліни в концентрації 0,2 мг/л. Кінетин (цитокинін) стимулює клітинний поділ та диференціацію бруньок в концентрації 0,02 – 0,1 мг/л. Для отримання джерела енергії та спроможності регенерувати нові клітини під час культивування використовується сахароза.

Для отримання регенератів з меристем прискорено використовують різні середовища та пересадки з одного середовища в інше.

При першій пересадці для забезпечення регуляції морфогенезу використовують регулятори росту кінетин та аденін в концентрації 0,25 мг/л, гіберелін – 1,0 мг/л, ІОК – 0,5 мг/л, аскорбінова кислота в концентрації 3 мг/л та сахароза 20 г/л. Під час другої – індукують коренеутворення, ріст стебла та листків. Для цього дають індоліл-3-оцтову кислоту в концентрації 1,0 мг/л.

Важливо контролювати оптимальність рН під час росту меристем, підтримувати кислотність на рівні значення рН 5,7. Під час відхилень від стандартного значення, потрібно додавати 0,1 N КОН або 0,1 N HCl. Середовище матиме достатню буферну ємність, щоб нейтралізувати продукти метаболізму меристем, які підкислюють середовище.

Для приготування живильних середовищ для культивування меристем використовуються хімічно чисті реагенти високого ступеня чистоти. У них вміст домішок не має перевищувати 0,01%, вони не мають містити важких металів, токсичних речовин та мають відповідати державним та міжнародним стандартам якості. Важливо використовувати реагенти з перевіреною терміном придатності, адже прострочені реагенти можуть втратити свою активність або містити домішки, які негативно впливатимуть на меристему, збільшуючи ризик контамінації.

Розподіл компонентів живильного середовища на групи відображає не лише порядок їх приготування та зберігання, але й чітко окреслює їхні функції в забезпеченні меристемних клітин необхідними поживними речовинами та регуляторами росту.

1. макроелементи (основні неорганічні поживні речовини) - кальцій (Ca), калій (K), фосфор (P), азот (N), магній (Mg), хлор (Cl), сірка (S), натрій (Na);
2. мікроелементи - марганець (Mn), цинк (Zn), молібден (Mo), бор (B), кобальт (Co), мідь (Cu);
3. джерело заліза - залізо-ЕДТА;
4. органічні добавки:
 - вітаміни групи В - тіамін (B1), , нікотинова кислота (B3), піридоксин (B6), рибофлавін (B2), біотин (B7), фолієва кислота (B9) та аскорбінова кислота (C) ;
 - амінокислоти: глютамін, аспарагін, аргінін, пролін, гліцин та інші;
5. джерело вуглецю (сахароза, глюкоза, маніт);
6. регулятори росту (ауксини (ІОК), цитокиніни (кінетин), гібереліни (гіберелін)).

Для кращої зручності в роботі застосовують концентровані розчини основи макроелементів (у 10 разів вище за робочу концентрацію) та мікроелементів (у 100 разів вище за робочу концентрацію).

Розчини гормонів та вітамінів для запасів готують з урахуванням їх властивостей розчинності та в зручних для роботи концентраціях. Зберігання запасів здійснюється в холодильнику при температурі $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 60 днів.

Вводити компоненти до поживного середовища слід у чітко визначеній послідовності. Введення гормонів та вітамінів здійснюється після додавання всіх інших компонентів.

Поживне середовище для культивування є досить простим завданням, яке виконується за такою методикою:

1. Зазделегідь готують розчини компонентів макро- та мікроелементів, органічних речовин, вітамінів, сахарозу та інші складові середовища.
2. Щоб приготувати 1 літр середовища, у однілітрову колбу за допомогою піпеток дозують необхідну кількість кожного з компонентів.

3. Агар, необхідний для приготування середовища, переносять у термостійку склянку, заливають половиною об'єму (від об'єму середовища) бідистильованої або дистильованої води. Залишають на 20-25 хвилин до набухання агару, а потім нагрівають на електроплитці до 80-100°C.

4. У однолітрову колбу, де раніше було додано поживні елементи, додають теплий розчин агару та розбавляють до помітки в 1 літр бідистилятом(дистилятом).

5. Рівень кислотності (рН) середовища коригують до необхідного значення за допомогою 1N розчину гідроксиду калію (KOH).

6. Приготовлений розчин розливають у пробірки, закриваючи їх ватними пробками.

7. Пробірки ставлять у металеві бікси (ємкості) та переносять в автоклав.

8. У автоклаві пробірки стерилізують – 20хв-1 атм -120⁰ С.

9. Після закінчення, повільно стабілізують атмосферний тиск автоклава до кімнатного, щоб уникнути небезпечних ситуацій.

10. Після завершення стерилізації бікси або пакети з пробірками переносять з автоклава в передбоксник. Пробірки ставлять вертикально або під невеликим нахилом (для "косого зрізу" агар-агару).

Термін зберігання стерилізованого середовища не повинен перевищувати 20-30 діб.

1.3 Створення умов стерильності

Для отримання якісних меристемних культур необхідно дотримуватися суворих правил стерильності.

Роботу проводять в спеціальній кімнаті, обладнаній ламінарними боксами. Ці бокси, представлені широким вибором моделей від різних виробників, являють собою пилезахисні камери, в які подається потік повітря, що проходить через стерилізуючі фільтри. Завдяки надлишковому тиску всередині боксу нестерильне повітря витісняється. В більшості ламінарних боксів встановлені УФ-лампи, які можна залишати ввімкненими на ніч (або

впродовж дня на 2-3 години перед початком роботи) для стерилізації внутрішньої частини. Перед початком роботи в боксі його робочу поверхню обробляють 96% етиловим спиртом.

Стерилізація в автоклаві проводиться за різними режимами залежно від об'єкта стерилізації:

- живильні середовища 0,7 – 1,2 атм – 15 хвилин паром, потім 15 хвилин тільки тиском.
- вода та ватно-марлеві пробки 2 атм (180°C) – 1 година.
- скло та інструменти сухим паром 2-3 години при 140-180°C.

1.4 Введення в аспетичну культуру та виділення меристем

Щоб отримати стерильні меристеми картоплі, бульби спочатку пророщують у темряві протягом 10-15 днів. Цей процес сприяє етиоляції паростків, роблячи їх більш придатними для подальших маніпуляцій.

Важливо зазначити, що бульби картоплі перед пророщуванням ретельно промивають і дезінфікують відповідно до прийнятих протоколів. Пророщування проводять у стерильних умовах, використовуючи стерильний ґрунт або інші стерильні субстрати, такі як перліт, вермикуліт, пластагар або гідрогелі..

З етиольованих паростків відбирають сегменти розміром 2-3 см, які містять верхівкову бруньку. Ці сегменти стануть основою для вирощування нових рослин.

Перед стерилізацією етиольовані паростки піддають ретельному очищенню. Спочатку їх промивають теплою водою з миючим засобом, потім протягом 30 хвилин обмивають проточною водою, а на завершення ополіскують дистильованою водою. Вибір дезінфікуючого розчину та тривалість його впливу на сегменти паростків визначаються експериментально. Пройшовши обробку в дезінфікуючому розчині, сегменти тричі промивають стерильною дистильованою водою.

Дезінфіковані паростки переносять у стерильну чашку Петрі, додаючи декілька крапель простерилізованої води для запобігання їх висиханню. Перед

виділенням меристеми з верхівки паростка ретельно видаляють верхні покривні листочки, оголюючи бічні та верхівкові меристеми з примордіальними листочками. Цю операцію проводять за допомогою медичної голки під 30-кратним збільшенням бінокюляра з масштабною сіткою.

Виділяють меристему розміром 100 мкм, використовуючи стерильні інструменти для кожної операції. Після виділення меристему переносять на поверхню живильного середовища в пробірку, використовуючи кінчик голки.

Над полум'ям спиртівки, щільно закривають пробірку пробкою, проводять маркування (вказують дату внесення, назву сорту) та виставляють у штатив.

Після виділення меристеми їх переносять до кліматичної кімнати з контрольованими параметрами світла, температури та вологості.

- Контрольовані умови в кліматичних камерах створюють оптимальне середовище для регенерації меристем:

- Температура: 24-25°C
- Освітлення: 6000-8000 люкс
- Фотоперіод: 16 годин
- Вологість: 70%

Тривалість культивування меристем до регенерації рослин становить 60-90 днів. Слід зазначити, що швидкість регенерації залежить від розміру меристеми: чим менша меристема, тим складніше їй прижитися на поживному середовищі та довше триває процес регенерації. Деякі меристеми можуть залишатися живими та регенерувати протягом 4-8 місяців. За цей час з меристем формуються пагони та корені, що свідчить про успішну регенерацію рослин.

Мікробна контамінація, що зазвичай викликається дріжджовими та іншими грибами, а також бактеріями, може з'явитися на поверхні живильного середовища протягом кількох днів - до тижня. Вона проявляється у вигляді білого, сірого або кольорового міцелію.

У разі виявлення мікробного забруднення при візуальному огляді, необхідно знищити всі посудини, що містять забруднені культури. Для цього їх прожарюють в автоклаві.

Використання методів культури апікальних меристем з хіміотерапією дозволяє збільшити розмір меристем до 200 мкм, що може пришвидшити процес регенерації.

РОЗДІЛ 2

МЕТОД ХІМІОТЕРАПІЇ НА ОЗДОРОВЛЕННЯ КАРТОПЛІ

2.1 Хіміотерапія при оздоровленні рослин картоплі

Для підвищення ефективності оздоровлення посадкового матеріалу використовується комбінований метод, який поєднує культуру апікальних меристем з хіміотерапією. Хіміотерапія ґрунтується на впливі на рослини інгібіторів вірусів. Ці речовини можна вносити безпосередньо на рослини або додавати до поживного середовища при культурі тканин (*in vitro*).

Для оздоровлення застосовуються різноманітні антивірусні препарати, а також фізіологічно активні речовини, що пригнічують синтез вірусних частинок. Завдяки цьому стає можливим отримати більший за розміром фрагмент апікальної меристеми, що збільшує шанси на виділення матеріалу, вільного від вірусів.

Окрім традиційних методів, таких як антибіотики та регулятори росту, поширено застосовують альтернативні інгібітори з широким спектром дії.

До їх числа належать:

- Продукти метаболізму дріжджів, грибів та бактерій - природні антибіотики, що пригнічують ріст вірусів.
- Ферменти - біологічні каталізатори, що прискорюють розщеплення вірусних частинок.
- Сік деяких рослин (алое, женьшеня, та ін.) - джерело біологічно активних речовин, що стимулюють імунну систему рослин.
- Нуклеїнові кислоти - інформаційні молекули, що блокують розмноження вірусів.
- Амінокислоти - будівельні блоки білків, що беруть участь у формуванні антитіл проти вірусів.
- Барвники - хімічні сполуки, що зв'язуються з вірусними частинками та роблять їх неактивними.

- Аналоги пуринових піромідонових основ - хімічні речовини, що вбудовуються в вірусну РНК та порушують її структуру.

Ці речовини використовуються для обробки рослин, бульб, паростків, живлення коренів і додаються до живильного середовища при культурі тканин.

Ці сполуки діють в присутності двоспіральної РНК вірусу та АТФ, що є джерелом енергії для білкового синтезу. Інгібітори білкового синтезу блокують роботу вірусних рибосом, що призводить до припинення синтезу вірусних білків, в наслідок цього, це веде до загибелі вірусу або пригнічення його реплікації. Інгібітори білкового синтезу можуть бути токсичними не лише для вірусів, але й для клітин рослини.

Ерадикація вірусів є важливим етапом отримання здорового та продуктивного картопляного матеріалу. Одним із цікавих підходів до ерадикації вірусів є додавання до поживного середовища противірусних речовин (хіміотерапія).

Позитивні результати були отримані при використанні таких речовин:

- Малахітовий зелений (Norris, 1954).
- Віразол (Klein та Livingstone, 1982).
- Жасмонова кислота (JA) (Ravnikar та Gogala, 1989).

Віруси можна знищити фізично (тепло) або хімічно (противірусними сполуками). У дослідженні, проведеному Nascimento et al. (2003), мікрочастинки картоплі з позитивною реакцією на Potato virus Y (PVY) піддавали термотерапії (37°C) і хіміотерапії: рибавірин (RBV), 5-азацитидин (AZA) і 3-дезауридин (DZD). Термотерапія протягом 30 - 40 днів усунула 37,5% PVY відповідно. Серед хіміотерапевтичних засобів RBV показав найкращі показники ерадикації, отримавши 55,5% здорових рослин. Ці автори також підтвердили, що одночасне лікування термотерапією та хіміотерапією показало більш високу ефективність у ліквідації вірусу, досягаючи відсотка 83,3, 70,0 та 50,0 здорових рослин, з RBV, AZA та DZD відповідно [1].

Дослідження Faccioli та Colalongo (2002) показали, що хіміотерапія самостійно може бути ефективною для знищення вірусів картоплі Y

(PVY)(смугаста мозаїка) та картопляної листової закрутки (PLRV) у багатьох сортах картоплі.

Вірусцидні сполуки, що додаються до середовища Murashige-Skoog (MS), включають: 100 мг/л DHT (2,4-діокси-гексагідро-1,3,5-триазин), 50 мг/л рибавірин.

Наявність вірусів тестується методом ELISA через 4 тижні з наступним перещепленням інфікованих експлантів для повторної 4-тижневої противірусної обробки. Відсоток безвірусних рослин після 8-тижневої обробки становив від 13,8% для PVY у сорту 'Liseta' до 50% для PVY у сорту 'Monnalisa'.

Ті ж автори раніше продемонстрували використання хіміотерапії для ерадикації вірусів картоплі X (PVX) та S (PVS) [2].

Варто також звернути увагу на підхід, описаний Wang та Huang (1975). Вони отримали калюсну тканину з верхівкових бруньок пагонів, а потім регенерували пагони та цілі рослини з каллусу. Дослідження показало, що 17 із 37 регенератів були вільні від PVX, який інфікував материнську рослину.

Хіміотерапія насінневого матеріалу картоплі ґрунтується на застосуванні інгібіторів білкового синтезу, що діють в присутності двоспіральної РНК та АТФ. Одним з таких інгібіторів є 2-5А (2'-5'-олігоаденілати), які ініціюють латентну РНК-азу (ендорибонуклеазу), що призводить до розщеплення вірусної РНК. Дослідження показали, що 2-5А мають широкий спектр противірусної дії та впливають на процеси росту, диференціації та проліферації клітин.

В якості 2-5А використовуються тримери синтезовані в Інституті біоорганічної хімії НАН: 1(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4,-триазоліл(2'-5')аденіліл(2'-5')аденозин та аденілін(2'-5')-1-(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4-триазоліл(2'-5') аденозин, що були.

Застосування цих сполук для оздоровлення картоплі від накопичення вірусів (S, Y, M, X, L) дозволяє:

- Збільшити неуражену зону в 3-5 разів
- Зменшити дію регенерації рослин в культурі *in vitro* у 2-3 рази
- Збільшити появу позбавлених від вірусів рослин

Це свідчить про високу ефективність хіміотерапії насінневого матеріалу картоплі з використанням 2'-5'-олігоаденілатів, що дає можливість отримати якісний посадковий матеріал, вільний від вірусів.

Дослідження Рейфмана В.Г. та інших вчених довели здатність панкреатичної рибонуклеази пригнічувати дію вірусів в рослинах. В культурах меристем картоплі спостерігалась висока вірусоінгібуюча дія цієї речовини при концентраціях до 0,1 % . Спільні дослідження показали, що бактеріальна ендонуклеаза може бути застосована для оздоровлення рослин шляхом обробки культури апікальних меристем.

Р.Мэтьюз вважає, що найбільш ефективними в боротьбі з вірусами рослин повинні бути аналоги пуринових і піромідинових основ, що зустрічаються в РНК, адже саме РНК є генетичним матеріалом більшості вірусів.

Хоча багато препаратів демонструють інгібуючу активність щодо вірусів *in vitro*, їх ефективність часто втрачається після обробки рослин. Концентрація вірусів знову зростає до початкового рівня, ставивши під сумнів тривалість оздоровчого ефекту. Це питання набуває все більшої актуальності в контексті розробки методів боротьби з вірусними інфекціями рослин. Збереження оздоровчого ефекту антивірусних препаратів в умовах *in vitro* є ключовим фактором для успішного оздоровлення рослин та захисту врожаїв від вірусних інфекцій.

Згідно з науковою літературою, інактивація вірусів нуклеазами відбувається завдяки деполімеризації їх нуклеїнових кислот (НК) в момент звільнення з білкової оболонки. Цей процес забезпечується специфічними ферментативними діями нуклеаз. Однак, можлива альтернативна теорія: інгібуючий ефект нуклеаз може обумовлюватися утворенням комплексу вірус-РНК-аза. Цей комплекс заважає вірусній РНК використовуватися для реплікації та призводить до інактивації вірусу.

Одним з перспективних препаратів синтетичного походження, що володіє високою дією пригнічення на вірус є ДГТ (діоксігексагідро-1,3,5-тріазін).

Дослідження показали, що обробка паростків бульб і зрошування рослин препаратом ДГТ рослин в залежності від сорту понижує кількість заражених вірусами від 10 до 30 %. Результати вчених, які проводили вивчення дії препарату описуються як те, що ДГТ має специфічний характер і різниться залежно від штаму вірусу. Використання цього засобу шляхом додавання його в живильне середовище дозволяє значно збільшити розміри експлантів (до 1 мм і більше) та зберегти високий відсоток здорових рослин-регенерантів.

Складність вірусологічних проблем у картоплярстві змушує більшість дослідників рекомендувати для оздоровлення сортів активні методи, такі як термо- та хіміотерапія в поєднанні з культурою верхівкових меристем. Саме ці методи при сильному, а іноді й 100%-му ураженні сортів картоплі вірусами виявляються єдиними ефективними та радикальними способами оздоровлення.

Сучасні уявлення про інактивацію фітопатогенних вірусів, принципи хіміотерапії та профілактики вірусних захворювань дають підстави вірити в можливість та перспективу пошуку нових антивірусних речовин. Ці речовини, при практичному використанні, можуть суттєво зменшити патологічну дію вірусної інфекції та знизити економічний збиток, який вона завдає сільськогосподарському виробництву.

Важливо зазначити, що пошук нових антивірусних препаратів є складним та тривалим процесом. Для досягнення успіху необхідні спільні зусилля науковців, виробників та аграріїв. Очікується, що розробка нових ефективних антивірусних препаратів та вдосконалення методів їх застосування дозволить здобути значну перемогу над вірусними захворюваннями рослин.

Використання хіміотерапії для оздоровлення рослин від вірусів має свої недоліки, які важливо враховувати при виборі цього методу.

Основні проблеми пов'язані з природою та концентрацією хімічної сполуки, що використовується як антивірусний препарат. Поєднання стресових факторів, таких як культура *in vitro* та вплив антивірусного препарату, може призвести до мутацій в організмі рослин. Внаслідок цього може утворитися змінений генотип, що не є бажаним ефектом при оздоровленні. Адже при

оздоровленні не менш важливою є отримання сортотипових рослин, які зберігають всі характеристики вихідного сорту. Тому при використанні активних методів оздоровлення необхідно приділяти велику увагу вибору хімічної сполуки: необхідно ретельно дослідити різні антивірусні препарати, щоб вибрати той, який буде максимально ефективним проти конкретного вірусу та мінімально шкідливим для рослини; концентрацію препарату: занадто висока концентрація може призвести до мутацій та інших негативних наслідків, тоді як занадто низька концентрація може не дати бажаного ефекту; вірусологічному контролю: регулярно проводити вірусологічний контроль регенерантів, щоб переконатися, що вірус був повністю інактивований; генетичному контролю: проводити генетичний аналіз регенерантів, щоб переконатися, що їх генотип не був змінений. Очікується, що розробка нових методів оздоровлення, які не мають таких побічних ефектів, дозволить максимально зберегти цінні властивості сортів та зменшити ризики мутацій.

Тільки ретельний підхід до всіх етапів дозволить отримати якісний результат та зберегти цінні властивості сорту.

2.2 Ефективність регенерації та оздоровлення при використанні антивірусних сполук

Вплив противірусних сполук на регенерацію меристем – це тема, яка викликає багато дискусій серед науковців. З одного боку, противірусні препарати дозволяють знищити віруси, що позитивно впливає на регенерацію меристем. З іншого боку, ці ж препарати можуть мати негативний вплив на сам процес регенерації. Для вивчення цієї складної проблеми було проведено ряд досліджень.

В цих дослідженнях використовували різні противірусні сполуки та аналізували їх вплив на регенерацію меристем різних видів рослин. Результати досліджень показали, що вплив противірусних сполук на регенерацію меристем може бути дуже різним. Деякі сполуки стимулюють регенерацію, інші – пригнічують, а треті не мають помітного впливу. Вплив цих сполук залежить

від багатьох факторів, таких як: тип вірусу, вид рослини, концентрація противірусної сполуки, умови культури меристем.

Важливо зазначити, що регенерація меристем – це складний процес, який регулюється багатьма факторами. Противірусні сполуки – це лише один з цих факторів, і їх вплив не можна розглядати окремо.

Щоб отримати більш точні результати необхідно проводити комплексні дослідження, які б враховували всі фактори, що впливають на регенерацію меристем.

Віруси завдають значної шкоди сільськогосподарським культурам, призводячи до зниження врожаю та погіршення якості продукції. Культура меристем, що полягає у вирощуванні вільних від вірусів рослин з невеликих фрагментів апікальних меристем, є одним з методів боротьби з вірусами.

Ефективність вірусної елімінації в меристематичних культурах залежить від багатьох факторів З одного боку, великі меристеми ймовірно містять вірусні частинки, з іншого боку, занадто маленькі (0,2-0,3 мм) ризикують некрозом через хіміотерапію. Додавання противірусних препаратів до культивативного середовища може підвищити ефективність елімінації вірусу, однак занадто високі концентрації пригнічують ріст меристем.

Різні сорти рослин мають різну стійкість до вірусів, деякі більш чутливі до хіміотерапії, ніж інші.

В дослідженні Національного інституту досліджень і розвитку картоплі та цукрових буряків Braşov вивчали вплив цих факторів на ефективність вірусної елімінації в меристематичних культурах. В однофакторному експерименті з шістьма повтореннями через місяць після першої інокуляції визначали відсоток регенерованих меристем залежно від сортів Marvis і Castrum. Для підвищення ефективності елімінації вірусу було розроблено чотири противірусні засоби з різними концентраціями. Ці засоби додавали до стандартного культурального середовища, яке містило 0,5 мг/л гіберелінової кислоти (AG3), 20 г/л сахарози та 9 г/л агару. рН середовища доводили до 5,8 перед автоклавуванням, використовуючи 1N NaOH або 1N HCl для корекції.

Було проведено три субкультури з інтервалом у 30 днів, при цьому використовували ті самі типи культурального середовища з додаванням різних концентрацій противірусних засобів. Після закінчення цього періоду оцінювали швидкість регенерації експлантів, щоб визначити ефективність кожного з засобів.

Отримані результати піддавали статистичному аналізу за допомогою методу дисперсійного аналізу, щоб визначити, які концентрації противірусних засобів найкраще сприяли елімінації вірусу та регенерації експлантів.

Дисперсійний аналіз результатів регенерації меристем показав значущу позитивну різницю для сортів Marvis та Castrum порівняно із середніми значеннями. Противірусні сполуки, використані в експерименті для оцінки їх впливу на швидкість регенерації меристем, мали помітний ефект на цей процес.

Зокрема, використання 5-бромурацилу призвело до дуже значущого позитивного впливу на регенерацію меристем. Цей противірусний засіб значно покращив швидкість регенерації порівняно із середніми значеннями.

Дослідження проводилося як трифакторний експеримент із 24 варіантів та було розділене на 5 повторів.

Фактор А - сорт рослин з 2 варіантами: a1 – Marvis, a2 – Castrum;

Фактор В - противірусний препарат із 4 варіантами: b1 – рибавірин, b2 - 5-бромурацил, b3 - 2-тіоурацил, b4 – ацикловір.

Фактор С - концентрації противірусних препаратів з 3 варіантами: c1 - 0 мг/л (контроль, стандартне середовище Мурасіге-Скуга), c2 - 15 мг/л, c3 - 30 мг/л.

У протилежність цьому, застосування 2-тіоурацилу мало негативний вплив на швидкість регенерації меристем. Цей негативний ефект був дуже суттєвим, що проявлялося у значно гірших результатах порівняно із середніми значеннями.

Дослідження також показали, що концентрації противірусних сполук впливають на розвиток меристеми. При використанні концентрацій 15 та 30 мг/л вірусного агента було зафіксовано негативний вплив на швидкість

регенерації меристеми. Ці концентрації значно знижували швидкість регенерації порівняно із середніми значеннями, що свідчить про їх шкідливий вплив на процес регенерації.

Таким чином, розробка нових противірусних засобів для терапії є критично важливим завданням, оскільки наявний асортимент препаратів з антивірусною активністю проти фітовірусів є надто обмеженим і майже недоступним для практичного застосування. Ключовою умовою перед початком впровадження нових сполук у експериментах з оздоровлення є проведення біологічного аналізу на вірусні частинки в соку уражених рослин, що дозволяє оцінити ефективність нових засобів і забезпечити їх безпечне використання у сільськогосподарській практиці.

РОЗДІЛ 3

Отримання мікробульб та мінібульб

3.1 Метод отримання мікробульб в пробірці

Загальноприйняті методи вирощування мікробульб картоплі, що широко застосовуються, складаються з двох основних етапів: стадії розмноження пагонів і стадії формування бульб. Для стимулювання утворення бульб до середовища часто додають фітогормони, такі як цитокініни. Наприклад, використовуються бензиладенін, бензиламінопурин та 2-хлоретилтриметиламоній хлорид. Однак, відповідно до цих методів, продуктивність виробництва мікробульб є низькою, а кількість отриманих мікробульб дорівнює або навіть менша за кількість культивованих рослинних матеріалів. Через низьку ефективність традиційної технології вирощування мікробульб, як зазначено вище, вартість виробництва залишається високою, що заважає цій технології досягти практичного застосування. Відповідно, технологія виробництва мікробульб наразі використовується лише для обмежених цілей, таких як збереження або поширення генетичного матеріалу.

Хоча багато регуляторів росту рослин успішно використовуються в культивуванні *in vitro*, деякі з них досі не знайшли широкого застосування.

До таких належать жасмонова кислота, саліцилова кислота, етилен, поліаміни та брасиностероїди. Вважається, що додавання цих регуляторів росту до культурального середовища та попередня обробка маточних рослин картоплі може покращити якість мікробульб, прискорити мікророзмноження картоплі та стимулювати утворення бульб *in vitro*. Крім того, ці регулятори росту забезпечують вищі темпи мікророзмноження картоплі, хоча кількісний ефект спостерігався не завжди .

Проміжний етап між розмноженням *in vitro* і укоріненням пасльонових у польових умовах, відомий як мікробульбоподібність, демонструє використання мікробульб як альтернативного методу для національного та міжнародного поширення генетичного матеріалу картоплі та як безпатогенного джерела для програм розмноження насіння. Ці дрібні бульби мають певні переваги перед

розсадою *in vitro*, зокрема легкість розподілу та обробки завдяки зменшеному розміру, підвищену стійкість до транспортування та можливість довготривалого зберігання в темряві при низьких температурах. Окрім цього, мікробульби можуть слугувати джерелом експлантатів у дослідженнях генетичної трансформації. Були розроблені кілька протоколів для індукції бульбоциліндрів *in vitro*, таких як протокол Вана та Ху (1982), який використовується Міжнародним центром картоплі (Centro Internacional de la Papa - CIP). Цей протокол передбачає додавання 6-бензиламінопурину, хлорхоліну хлориду та сахарози до рідкого культурального середовища. Бульбоутворення також може бути досягнуто в біореакторних системах, що забезпечує більшу врожайність та зменшення гіпергідричності порівняно з рідкою культурою. Мікробульби *in vitro*, піддані відповідним стимулам, можуть бути висаджені безпосередньо у відкритий ґрунт.

Оптимальні умови вирощування мікробульб (включаючи фотоперіод, температуру, джерело та концентрацію поживних речовин) можуть різнитися залежно від конкретного генотипу. Науковці дослідили 22 генотипи картоплі та встановили, що для більшості з них мікробульби утворюються за умов короткого фотоперіоду (10 годин на світлі з інтенсивністю світла $12 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) і низької температури ($20 \pm 2^\circ\text{C}$ вдень і $18 \pm 2^\circ\text{C}$ вночі). Щодо джерела та концентрації вуглецю у культуральному середовищі, встановлено, що 6% сахарози та 4% мальтози є оптимальними для формування бульбоциліндрів картоплі *in vitro*. Таким чином, взаємодія між генотипом та умовами середовища свідчить про необхідність розробки індивідуальних протоколів для кожного сорту картоплі з метою максимізації мікророзмноження, що забезпечить наявність достатньої кількості високоякісного посадкового матеріалу для фермерів.

У галузі біотехнології, при використанні штучних поживних середовищ із правильно підібраними біологічно активними речовинами, можна вкорінювати пагони та стимулювати появу мікробульб картоплі. Зазвичай використовують середовище з високим вмістом солей мінерального походження, складних

вуглеводів (сахароза до 8%), абсцизової кислоти та цитокінінів. Протягом перших 12 днів після черенкування живці вирощують при 17-годинному світловому режимі, освітленості до 5 тисяч люкс і температурі +24°C вдень та до 20°C вночі. Подальше вирощування проводять за аналогічних фізичних умов, але при 12-годинному світловому режимі. При деяких обставинах, наприклад, після вирощування за умов довгого дня (16-годинний світловий режим), пробірки з експлантатами розміщують у холодильну камеру при температурі +10°C. Утворення мікробульб спостерігається вже через місяць. Отримані мікробульби зберігають у стерильних пробірках без середовища (по 10 мікробульб) в холодильній камері при температурі +5°C і вологості до 95% протягом пів року, що створює умови, аналогічні до періоду спокою у картоплі, покращуючи їх схожість та життєздатність. Весь цикл – від черенкування до отримання мікробульб – триває 60-65 діб.

3.2 Потенціал отриманих мінібульб з пробіркових рослин картоплі та мікробульб в первинному насінництві картоплі

Первинне насінництво картоплі є критично важливим етапом у виробництві якісного посадкового матеріалу. Воно забезпечує фермерів генетично чистими та здоровими рослинами, що вкрай необхідно для отримання високих врожаїв. Одним із перспективних методів у первинному насінництві є використання мінібульб, отриманих з пробіркових рослин картоплі, та мікробульб, вирощених *in vitro*. Ці методи пропонують численні переваги, включаючи швидке розмноження, високу якість матеріалу та економічну ефективність.

Незважаючи на оздоровлення, насіннєвий матеріал все одно може бути повторно інфікований вірусами, якщо джерела та вектори інфекції не усунені. Науковці стверджують, що оздоровлений матеріал навіть більш вразливий до реінфекції, ніж той, що отриманий іншими методами. Тому дуже необхідним є для збереження безвірусності насіннєвої картоплі під час її вирощування впроваджувати комплекс профілактичних заходів, спрямованих на запобігання повторному зараженню вірусами та іншими хворобами.

Для отримання високоякісного насіння картоплі найвищих категорій наразі використовується комплексний метод, який поєднує біотехнологічні методи оздоровлення вихідного матеріалу (термо- та хемотерапія, апікальна меристема) з методом двоврожайної культури та наступним польовим репродукуванням.

Початковий етап розмноження оздоровлених рослин розпочинається з їх живцювання в лабораторних умовах, що дозволяє отримати розсаду та мікробульби. Щоб уникнути повторного зараження, ці рослини пересаджують у тепличні умови, де вони утворюють мінібульби до 5 см в діаметрі. Головною метою цього етапу є досягнення максимальної кількості здорових рослин та мінібульб.

Ці мінібульби, вирощені у контрольованих умовах, служать основою для подальшого розмноження у відкритому ґрунті, з якого отримують насіннєвий матеріал найвищої якості. Весь процес ґрунтується на мікробульбах, вирощених методом *in vitro*. Кількість необхідних мікробульб для подальших етапів насінництва залежить від продуктивності рослин, вирощених *in vitro*.

Для розмноження елітних сортів картоплі в первинному насінництві застосовують різні типи початкового матеріалу: елітні клони, відібрані з посівів оздоровленої картоплі, розсаду, вирощену з лабораторних рослин, мікробульби, отримані в штучних умовах, та мінібульби, вирощені в закритому ґрунті на субстраті або гідропоніці.

Застосування технологій *in vitro* для вирощування мікро- та мінібульб картоплі потребує ґрунтового розуміння процесу бульбоутворення та методів регуляції його фізіолого-біохімічних аспектів. Встановлено, що ініціація бульбоутворення у рослині зумовлена комплексом факторів, включаючи надлишок продуктів фотосинтезу, гормональний статус рослини, фотоперіодизм, температурний режим, дефіцит азоту, зміну активності верхівкової меристеми стебла на користь стolonів і бульб, а також етап онтогенезу рослини. Таким чином, бульбоутворення піддається регуляції за допомогою ряду ендогенних та екзогенних факторів, що становить основу для

розробки технологій культивування мікро- та мінібульб у первинному насінництві картоплі.

Мікро- та мінібульби картоплі характеризуються низкою переваг, таких як тривале зберігання, зручність транспортування та універсальність у посадці. Однак їх широке застосування у насінництві стримується високою собівартістю. Тому подальші дослідження повинні бути спрямовані на оптимізацію технологій виробництва мікро- та мінібульб з метою зниження їх виробничих витрат. Це може зробити мікро- та мінібульби більш доступними та конкурентоспроможними, що відкриє нові можливості для розвитку насінництва картоплі.

Для отримання мінібульб картоплі рослини *in vitro*, розсаду та мікробульби можна розмножувати за допомогою різноманітних методів, таких як гідропонна культура, іонітопонна культура, тепличне вирощування та інші технології, а також у польових умовах.

Найкращім способом отримати насінневий матеріал – у культиваційних спорудах для одержання з мікробульб, розсади чи рослин *in vitro* - мінібульби. Впровадження технології отримання мінібульб картоплі *in vitro*, розсади та мікробульб ускладнюється низкою факторів. По-перше, значні обсяги приготування субстратів, які у процесі експлуатації втрачають свої фізико-хімічні властивості та стають середовищем для розмноження патогенної мікрофлори, включаючи небезпечні види нематод та збудників хвороб, роблять цю технологію дорогою та ризикованою. По-друге, тепличні умови, хоча і дозволяють отримувати мінібульби, не забезпечують високого коефіцієнта розмноження. Оздоровлений посадковий матеріал має обмежену площу живлення, а експлуатація теплиць потребує значних додаткових витрат.

Також дієвим методом є використання гідропонного методу, що дозволяє вирощувати мінібульби на мінеральних та органічних субстратах. матеріал характеризується винятковою життєздатністю, демонструючи високий відсоток проростання. Їх відрізняє стійкість до механічних пошкоджень під час транспортування, що робить їх зручними для перевезення на далекі відстані.

Завдяки однорідності розмірів, гідропонні мінібульби легко піддаються механізованій посадці, що значно економить час та ресурси.

При висаджуванні насінневого матеріалу в субстрати на основі іонітів (перліт, цеоліт, іонообмінні смоли), ґрунтується технологія гідропоніки. Ці технології дозволяють отримувати мінібульби до 70 грамів з однієї рослини, даючи урожай в середньому до 13 штук.

Незважаючи на значний потенціал гідропонних технологій у промисловому виробництві мінібульб картоплі, їх широке впровадження стримується високими витратами. Амортизація обладнання, приміщень, систем обігріву, освітлення та кондиціювання, необхідних для підтримання оптимального мікроклімату, робить цю технологію занадто дорогою для багатьох фермерів.

Висновки та пропозиції

Методи культивування тканин рослин (*in vitro*) відіграють значну роль у вирішенні проблеми нестачі якісного посадкового матеріалу картоплі. Серед них особливо виділяється мікророзмноження, протоколи якого добре опрацьовані та визнані як основний шлях отримання насінневої картоплі, вільної від патогенів.

Отримання безвірусного посадкового матеріалу шляхом культивування *in vitro* апікальних експлантів картоплі сприяє ефективному виживанню регенерованих рослин та скорочує період їх відновлення. Однак цей метод не забезпечує звільнення від бактеріальної контамінації. Стерильні мікророслини можуть бути заражені бактеріальними, грибовими та іншими інфекціями під час культивування.

За результатами проведених досліджень різних наукових джерел встановлено ефективність використання агаризованого модифікованого поживного середовища Мурасіге-Скуга у поєднанні з хіміотерапевтичними речовинами, фітогормонами та інгібіторами, що суттєво покращують стан експлантів та призводять до успішного отримання безвірусного посадкового матеріалу, утворенню мікробульб, а в подальшому мінібульб.

Список літературних джерел

1. C. Bhatt, P.S. Bisht, M.S. Tomar, R.K. Verma. APPLICATION OF TISSUE CULTURE TECHNIQUES IN POTATO. Bioscience Journal, Uberlândia, v. 34, n. 4, July/Aug. 2018. P. 253/
2. Faccioli G. Colalongo MC. 2002. Eradication of Potato virus Y and Potato leafroll virus by chemotherapy of infected potato stem cuttings Phytopathol. Mediterr. 41: 76–78.
3. S.K. Peshin, A.A. Zaidi, M.S. Javed, A. Naeem. Effect of antiviral compounds on the regeneration of potato meristems. ResearchGate, 2014.
4. S.K. Peshin, A.A. Zaidi, M.S. Javed, A. Naeem. Potato in Vitro Culture Techniques and Biotechnology. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. Global Science Books. 2008.
5. Балашова Г.С. Наукові основи насінництва картоплі на півдні України: Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук. Національна академія аграрних наук України, Інститут зрошуваного землеробства. Херсон, 2016, с. 74-99.
6. Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія / А.А. Подгаєцький, В. В. Мацкевич, А.Ан. Подгаєцький. – Біла Церква: БНАУ, 2018, с. 9-28, 109-110, 158-160.
7. Олійник Т.М.. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем у поєднанні із хіміотерапією/ Методичні рекомендації. Інститут картоплярства НААН України. Немішаєве, 2013. 52с.
8. Демчук І.В., Зарицкий М.М. Ефективність оздоровлення сортів картоплі біотехнологічними методами. Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН. с. 155-165, 179-193.
9. М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко Біотехнологія а агросфері: Навчальний посібник. К., 2014. 245 с.
10. Конспект лекцій з дисципліни „Біохімічні основи мікробного синтезу для студентів напряму 6.051401 „Біотехнологія“/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю., Дніпродзержинськ, ДДТУ, 2016. 183 с.

11. Харченко О.О., Ковальчук Л.М. Картопля: біологія, селекція, насінництво, агротехніка. Київ: Аграрна наука, 2008.
12. Духовська О.М., Дяченко О.П., Гуцал В.В. Методи оздоровлення насінневого матеріалу картоплі. Київ: Аграрна наука, 2012.
13. Правила насінництва сільськогосподарських культур. Затверджені наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України від 15 листопада 2018 року № 829.
14. Моргун В.Ф., Зайцев Г.А., Лук'яненко О.В. Імунітет картоплі до хвороб та шкідників. Київ: Аграрна наука, 2003.
15. Гайдаренко О.М., Коваленко О.В., Скрипник І.М. Оздоровлення посадкового матеріалу картоплі від вірусів *in vitro*. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. № 76. С. 115-120.
16. Бондаренко Н.В., Шпичак О.В., Дробязко О.М. Вплив методів оздоровлення на фізіолого-біохімічні показники та врожайність картоплі. Вісник Національної академії аграрних наук України. 2017. № 12. С. 90-95.
17. Авраменко О.В., Олійник М.М. Вплив різних методів оздоровлення на фізіолого-біохімічні показники та врожайність картоплі. Вісник Сумського НАУ. 2016. № 3-4. С. 95-100.
18. Харіна А. В., Будзанівська І.Г., Поліщук В.В. Хіміотерапія вірусних інфекцій. Посібник для студентів. К., 2003.

URL:

[extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Upload/Kafedry/Virusologiya/kharina_khimioterapiya_2003.pdf](https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Upload/Kafedry/Virusologiya/kharina_khimioterapiya_2003.pdf)