

**Національна академія аграрних наук України**  
**Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків**

**УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ОТРИМАННЯ**  
**ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З**  
**АПОМІКТИЧНИМ СПОСОБОМ РОЗМНОЖЕННЯ**  
**МЕТОДАМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ**  
*методичні рекомендації*



Київ - 2015

УДК: 633.63:581.143.6:575.164

Методичні рекомендації розробили науковці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН:

**Роїк Микола Володимирович**, доктор с.-г. наук,

**Бех Наталя Степанівна**, старший науковий співробітник, завідувач сектору культури клітин і тканин *in vitro*;

**Коцар Марія Олександрівна**, молодший науковий співробітник;

**Недяк Тетяна Миколаївна**, науковий співробітник;

**Присяжнюк Олег Іванович**, кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії математичного моделювання та інформаційних технологій ІБКіЦБ

**Рецензенти:**

Балан В. М., доктор с.-г. наук, професор

Яцева О. А., кандидат с.-г. наук

**Методичні рекомендації «Біотехнологічні методи створення генотипів цукрових буряків з апоміктичним способом розмноження»** призначені для спеціалістів у галузі селекції і біотехнології рослин, фахівців науково-дослідних установ, аспірантів, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівня акредитації сільськогосподарського профілю.

**Рекомендовано до друку**

**Вченою радою Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків**  
від \_\_\_\_\_ 2015 року (протокол № \_\_\_\_\_)

© Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН, 2015

© Роїк М.В., Бех Н.С., Коцар М.О., Недяк Т.М., Присяжнюк О.І., 2015

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ.....	5
1.1 Вимоги до лабораторії .....	5
1.2 Посуд, інструменти та матеріали.....	5
1.3 Миття посуду .....	6
1.4 Асептичні умови роботи.....	6
2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ І ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА .....	8
2.1 Приготування маточних розчинів .....	8
2.2 Приготування живильного середовища.....	9
3. ДОБІР ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З АПОМІКТИЧНИМ СПОСОБОМ РОЗМНОЖЕННЯ .....	10
3.1 Культура незапліднених насінневих зачатків цукрових буряків .....	10
3.2 Визначення рівня геному цитологічним методом .....	12
3.3 Поліплоїдизування гаплоїдних клонів <i>in vitro</i> .....	14
3.4 Отримання насіння цукрових буряків в безпилковому режимі .....	16
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	18

## ВСТУП

На сучасному етапі розвиток селекції цукрових буряків неможливий без використання нових методів, що дозволяють прискорено створювати різноманітні генотипи, які можуть використовуватися як вихідний матеріал з новими ознаками. У багатьох рослин статеве розмноження замінюється різними формами безстатевого розмноження. Це явище відоме під назвою апоміксис. Згідно «генетичної теорії апоміксису» виникнення регулярного апоміктичного розмноження в природі відбувається поступово під впливом природного добору [1-3].

Однак в природі це явище відбувається дуже рідко. Але завдяки використанню гаплоїдів у культурі *in vitro* та гібридизації можливе отримання гомозиготних ліній по трьох рецесивних генах. Отримання апоміктів експериментальним шляхом відкриває перспективу закріплення гетерозису використовуючи регулярне апоміктичне розмноження, яке стане одним із основних методів селекції рослин.

Проблема апоміктичного розмноження є однією з центральних у репродуктивній біології. Вона має вагомe значення для удосконалення методів селекції і підвищення якості нових сортів і гібридів перехреснозапильних культур, до яких відносяться і цукрові буряки. Цю проблему можна вирішити за допомогою методів біотехнології, зокрема метод гаплоіндукції з незапліднених насінневих зачатків та поліплоїдизування виділених гаплоїдів [4-5].

Розроблені біотехнологічні методи дозволять отримання гомозиготних ліній у культурі *in vitro* із незапліднених насінневих зачатків цукрових буряків і вихідний чистолінійний селекційний матеріал з елементами апоміксису, вивчати прояв дії рецесивних генів, внаслідок відсутності явища домінантності, що значно прискорює добір генотипів з бажаними ознаками та отримати селекційні гомозиготні матеріали за 5 років.

## **1. ОРГАНІЗАЦІЯ РОБІТ**

### **1.1 Вимоги до лабораторії**

Для проведення клонального мікророзмноження необхідно укомплектувати лабораторію спеціальними приміщеннями і обладнанням:

1. кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, дистиллятором, бідистиллятором, стелажем для сушіння посуду.

2. лабораторна кімната для приготування середовищ, забезпечена технічними і аналітичними терезами, рН-метром, холодильником, термокамерою, електроплиткою, водяною банею, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, мікроскопом та інше.

3. приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду з горизонтальними чи вертикальними автоклавами, сушильною шафою з режимом роботи 150-160 °С.

4. стерильне приміщення (бокс, операційна кімната) для ізоляції і пересадки культур. Для стерильних робіт застосовувати ламінар-бокси.

5. культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою 24±2°С, відотною вологістю повітря 70 %, освітленням 3-4 тис. лк., 16-годинним фотоперіодом, стелажми для розміщення колб і штативів з пробірками.

### **1.2 Посуд, інструменти та матеріали**

Для роботи з культурами тканин при приготуванні живильних середовищ необхідно мати: колби мірні (50-5000 мл), стакани хімічні (50-1000 мл), циліндри мірні (10-2000 мл), піпетки Мора (1-10 мл), піпетки градуйовані (1-10 мл), мікропіпетки градуйовані (0,1-0,5 мл), лійки, скляні палички різних розмірів.

Посуд для вирощування ізольованих тканин: колби Ерленмеєра (50-250 мл), пробірки біологічні.

Інструменти для ізолювання і посадки тканин: пінцети анатомічні різних розмірів (20,25 і 30 см), скальпелі анатомічні, препарувальні голки, ножиці, спиртівки.

Матеріали: фільтрувальний папір, вата, марля, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби та пробірки, в яких культивуються рослини.

### **1.3 Миття посуду**

Весь посуд, який використовується для приготування живильних середовищ і культивування рослинного матеріалу, піддається миттю у розчинах детергентів.

Найбільш поширеним і надійним методом очистки і обеззараження скляного посуду є обробка його концентрованою сірчаною кислотою з біхроматом калію протягом 4-6 годин з наступним промиванням теплою проточною водою впродовж 5 хвилин та двохразовим ополіскуванням дистильованою водою.

Можна застосовувати і таку схему миття: попереднє замочування у розчині 0,3 % перекису водню, потім миття розчином прального порошку з наступним ополіскуванням проточною і дистильованою водою.

Після висихання посуд прожарюють у сухожаровій шафі за температури 120 °C упродовж 2 годин.

### **1.4 Асептичні умови роботи**

Основною умовою успішного культивування ізолюваних культур є стерильність живильного середовища, посуду, матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу, приміщення для ізоляції і пересадки.

Роботи у культурі *in vitro* проводять в асептичних умовах – в операційних кімнатах чи в ламінар-боксах.

Операційну кімнату очищають від бруду миттям водою з будь-яким миючим засобом, потім проводять її стерилізацію ультрафіолетовим опроміненням упродовж 1-1,5 години.

Стерилізацію рук, робочої поверхні ламінар-бокса проводять 96 % етиловим спиртом.

Живильні середовища стерилізують в автоклавах під тиском за умов 1,5 атм упродовж 60 хв. Посуд та інструменти обеззаражують сухим жаром в сухожаровій шафі за температури 120 °С протягом 2 годин. Дистильовану воду, фільтрувальний папір, вату стерилізують в автоклаві під тиском 1,25 атм протягом 90 хвилин.

В ламінар-боксі перед роботою інструменти стерилізують, опускаючи в стакан з 96 % етиловим спиртом і обпалюючи у полум'ї спиртівки. Після цього їх кладуть на стерильну чашку Петрі і використовують тільки для однієї маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів стерилізацію в полум'ї спиртівки повторюють.

Перед відкриванням колби чи пробірки з живильним середовищем їх обтирають ватою, змоченою в спирті, горловину обпалюють над полум'ям спиртівки.

Проводячи посадку експлантів колбу слід тримати поблизу полум'я спиртівки. Після посадки ковпачок з фольги обпалюють і швидко закривають ним колбу чи пробірку.

Розрізання рослин зручно проводити на стерильних салфетках з фільтрувального паперу.

## 2. ПРИГОТУВАННЯ МАТОЧНИХ РОЗЧИНІВ І ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА

### 2.1 Приготування маточних розчинів

Для приготування живильних середовищ використовують реактиви високої хімічної чистоти. Для зручності в роботі мікроелементи готують у вигляді маточних розчинів, які в 10 разів більш концентровані, ніж необхідно для приготування середовищ. Їх зберігають в холодильнику не більше двох місяців за температури  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Розчини мікроелементів і вітамінів готують в 100 разів більш концентрованими і зберігають в замороженому стані.

При приготуванні хелатного заліза окремо розчиняють 37,3 мг  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  можна замінити трилоном Б) і 27,8 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Потім ці розчини зливають в одну колбу і доводять їх об'єм до 1000 мл.

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують відповідно їх властивостям:

1. 100 мг  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК), індолилоцтової кислоти (ІОК), індолілмасляної кислоти (ІМК), 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти розчиняють в 0,5-2 мл етанолу, підігрівають, додають бідистильовану воду до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);

2. 100 мг 6-бензиламінопурину (БАП), кінетину розчиняють у 1-2 мл 0,5 н  $\text{HCl}$ , підігрівають на водяній бані і доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл;

вітаміни – тіамін ( $\text{B}_1$ ), піридоксин ( $\text{B}_6$ ), глутамін,  $\beta$ -аланін, гіберелін, нікотинову кислоту (PP), аскорбінову кислоту (C), розчиняють у бідистильованій воді в концентрації 1 мг/мл.



## 2.2 Приготування живильного середовища

1. 6,5-7,0 г (залежно від марки агару) агару заливають бідистильованою водою ( $\frac{1}{2}$  об'єму середовища);
2. ємність з агаром розтоплюють на водяній бані або автоклавують за умов 1,25 атм упродовж 30 хв;
3. 20-40 г/л сахарози (глюкози) розчиняють у 100-150 мл дистильованої води за легкого нагрівання;
4. ємність для приготування середовища на  $\frac{1}{3}$  від запланованого об'єму наповнюють бідистильованою водою, додають необхідну кількість макро- та мікроелементів, Fe-хелату із маточних розчинів та наважку м-інозиту, розчин цукрози. Вітаміни і гормони додаються за допомогою піпеток із маточних розчинів;
5. за допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH реакцію живильного середовища доводять до рН 5,6-5,8, підігрівають, додають розтоплений агар;
6. живильне середовище розливають по 20 мл в 100 мл колби, закривають фольгою і стерилізують у автоклаві за умов 1,5 атм упродовж 60 хв.

### **3. ДОБІР ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ З АПОМІКТИЧНИМ СПОСОБОМ РОЗМНОЖЕННЯ**

Проводять індивідуальний добір рослин цукрових буряків здатних до зав'язування насіння в безпилковому режимі під індивідуальними ізоляторами. З насіння вирощують коренеплоди, а на наступний рік насінники. Як вихідний матеріал для отримання гаплоіндукції використовують верхівки квітконосних пагонів другого порядку (7-12 см) з нерозкритими бутонами. Зрізані пагони розміщують у пакети з фільтрувального паперу, вкладають реєстраційний номер, зволожують і занурюють у целофанові пакети. Пакети з вихідним матеріалом витримують в термокамері або холодильнику при +4 °С до 5-6 діб для стимулювання гаплоіндукції (обробка холодом більше 7 діб не є ефективною і знижує регенераційну здатність незапліднених насінневих зачатків).

#### **3.1 Культура незапліднених насінневих зачатків цукрових буряків**

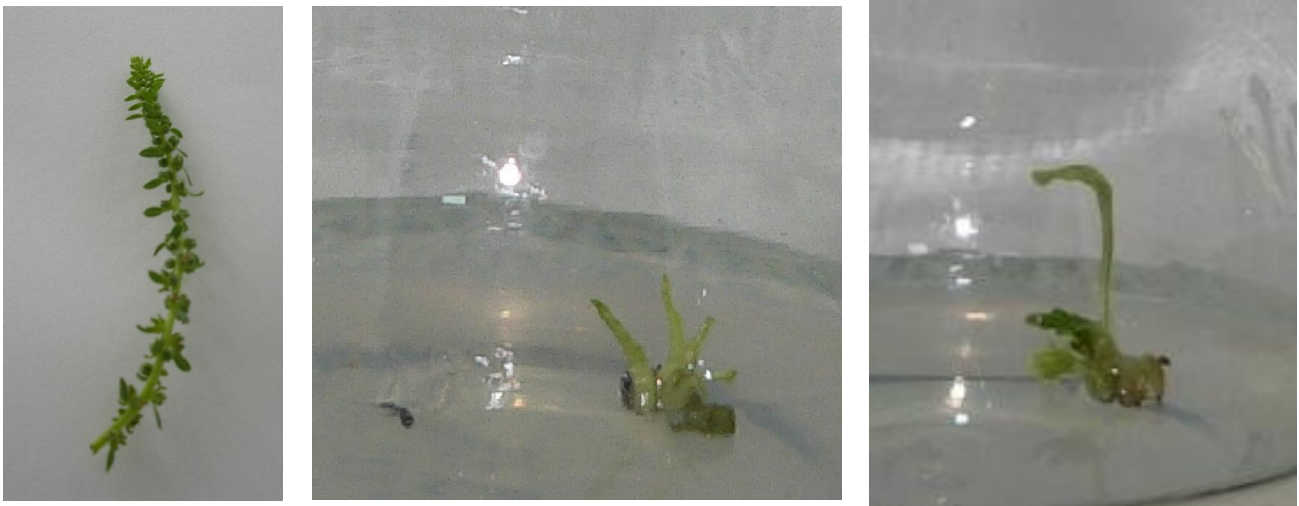
Для отримання звільненої від інфекції культури незапліднених насінневих зачатків квітконосні пагони обробляють розчином миючого засобу (мила господарського 72 %) упродовж 30 хв, після цього проводять додаткову обробку слабким розчином  $KMnO_4$  – 2-3 хв. В умовах стерильного приміщення підготовлені квітконосні пагони переносять у проавтоклавований стерильний посуд і додають розчин відбілювача «Білізна», масовою часткою 35 %. Експозиція стерилізації 60-80 хв. Після обробки квітконосних пагонів, їх промивають 4 рази з інтервалом 15-20 хв стерильною дистильованою водою. Ізолювання незапліднених насінневих зачатків проводять препарувальною голкою під збільшеною лупою. Вилучений насінневий зачаток висаджують на косий агар у пробірки довжиною 10 см по п'ять штук. Для індукції органогенезу використовують модифіковані живильні середовища Гамборга і Евелега наведені у таблиці 1.

Таблиця 1. Склад живильних середовищ для культивування насінневих зачатків цукрових буряків у культурі *in vitro*

Назва	Одиниці виміру	Живильні середовища для культивування насінневих зачатків			
		I варіант	II варіант	III варіант	IV варіант
Макро	мл	50,0	50,0	50,0	50,0
Мікро	мл	1,0	1,0	1,0	1,0
Вітаміни	мл	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe- хелат	мл	5,0	5,0	5,0	5,0
Аскорбінова кислота	мг	1,0	1,0	1,0	1,0
Мезо-інозит	мг	300,0	100,0	50,0	100,0
Глутамін	мг	1,0	1,0	1,0	1,0
β-аланін	мг	1,0	1,0	1,0	1,0
Гідролізат казеїну	мг	-	100,0	50,0	-
Гіберелін	мг	0,1	-	-	-
БАП	мг	0,5	0,5	0,5	0,5
НОК	мг	0,1	0,1	0,05	0,5
Цукроза	г	30,0	60,0	30,0	50,0
Глюкоза	г	20,0	-	-	-
Кінетин	мг	1,0	2,0	1,0	-
2,4-Д	мг	0,1	-	-	-
Дроп	мг	-	-	-	1,0
Агар-агар	г	7,0	7,0	7,0	7,0
pH 5,6-5,8					

Пробірки з культурою незапліднених насінневих зачатків витримують 2 тижні в умовах термостату з температурою  $24 \pm 2$  °C без освітлення. Після цього пробірки з культурою переносять в термальне приміщення з температурою  $24 \pm 2$  °C, відносною вологістю повітря 70 %, освітленням 3-4 тис. лк, 16-годинним фотоперіодом для стимулювання органогенезу.

Проростання незапліднених насінневих зачатків спостерігається упродовж 60-70 діб від початку культивування (рис. 1).



а) б) в)  
Рис. 1. Квітконосний пагін цукрових буряків з нерозкритими бутонами (а) та розвиток гаплоїдного проростка в культурі *in vitro* (б, в)

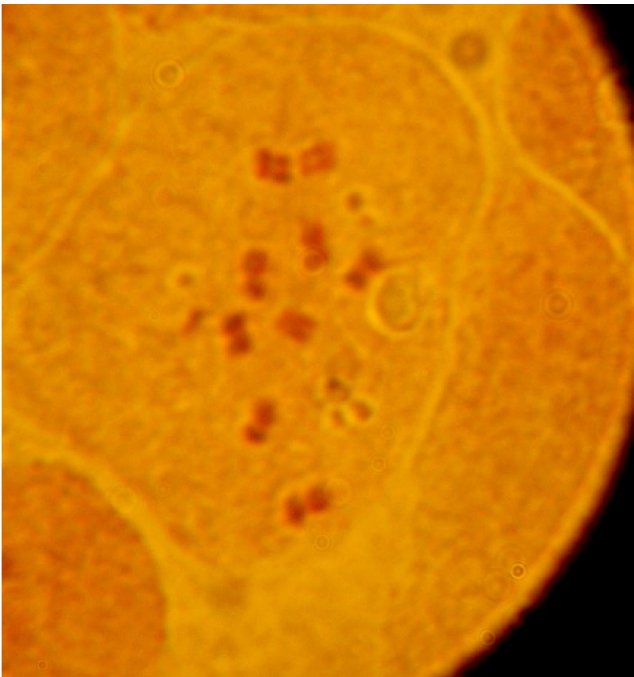
Перші проростки з первинним корінцем, або без нього, починають формуватися через 3-4 тижні культивування. Спостерігається утворення калюсу з різною регенераційною здатністю. Утворені бруньки і проростки переносять на живильне середовище Гамборга і Евелєга (В5) без гормонів [6] для стабілізації гормонального рівня на 2-3 тижні. Проростання незапліднених насіннєвих зачатків залежить від генотипу рослини донора, порядку цвітоносного пагону, складу живильного середовища і варіює в межах 0,8-4,0 %.

Здатність до формування пазушних бруньок спостерігається після третього пасажу на середовищі В5 з додаванням БАП – 0,1 мг/л, мезоінозит – 100 мг/л, цукроза – 45 г/л.

### 3.2 Визначення рівня геному цитологічним методом

Визначення рівня геному проводять на культуральних бруньках четвертого вегетативного покоління цитологічним методом. Перед фіксацією рослинного матеріалу колби з бруньками переносять на 12 годин у холодильник за температури +4 °С для затримки поділу клітин, після цього в термальне приміщення з температурою 24±2 °С та освітленням інтенсивністю 3000-4000 лк – на 2,5-3 години.

У стерильних умовах ламінарної камери відділяють новоутворені бруньки, а материнську бруньку відсаджують на середовище для розмноження. У новоутворених бруньок виділяють точку росту з двома листочками, які занурюють у пробірку з водним розчином орто-оксихіноліну (масова частка 0,03%) на 3 години за кімнатної температури. Після фіксації мітотичних поділів матеріал тричі промивають дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв. Мацерацію тканин проводять розчином спирту і соляної кислоти (дві частини 96 % етилового спирту і одна частина концентрованої соляної кислоти) – за експозиції 6 хв. Після мацерації промивають три рази дистильованою водою з інтервалом 10-15 хв. На предметному склі препарувальною голкою відокремлюють листочки, які прикривали точку росту, і фарбують її у краплі розчину оцетоорсеїну (масова частка 3%) від 3 до 4 хв. Пофарбований об'єкт накривають покривним склом. Фільтрувальним папером легким надавлюванням видаляють зайву фарбу, легким надавлюванням дерев'яною паличкою на покривне скло готують тимчасовий давлений препарат. Проглядають препарати під мікроскопом при збільшенні об'єктиву  $\times 60$ ,  $\times 90$  і окуляру  $15^{\times}$ ,  $17^{\times}$  [7] (рис. 2).



а)



б)

Рис. 2. Метафазні пластинки цукрових буряків  
а) гаплоїд –  $n=9$ ; б) подвоєний гаплоїд –  $2n=18$

### 3.3 Поліплоїдизування гаплоїдних клонів *in vitro*

Поліплоїдизування проводять методом культивування гаплоїдних бруньок на селективному середовищі з колхіцином, масовою часткою 0,02 %, за експозиції 4-5 діб.

Токсична дія колхіцину може викликати потемніння і деформацію точок росту культивованих клонів і в подальшому привести до загибелі бруньок в наступних трьох пасажах після пересадки на середовище без колхіцину. Післядії колхіцину призводить до зменшення живих бруньок до 22-70 %.

Після трьох пасажів новоутворені бруньки від кожного колхіцинованого клону аналізують на рівень плоїдності. Добирають тільки ті клони у яких усі дочірні бруньки утворені в третьому вегетативному поколінні мають рівень геному  $2n=18$  (рис. 3).



а)

б)

Рис. 3. Поліплоїдизування *in vitro* гаплоїдних клонів  
а) гаплоїдна форма; б) подвоєний гаплоїд

Після клонування і утворення необхідної кількості селекційного матеріалу подвоєні гаплоїди укорінюють на живильному середовищі (табл. 2). Перед укоріненням проводять один пасаж культивування клонів на середовищі В5 без гормонів – 2-3 тижні.

Таблиця 2. Склад живильного середовища для укорінення цукрових буряків у культурі *in vitro*, на 1 л

Назва	Одиниці виміру	Кількість
Макро	мл	50,0
Мікро	мл	1,0
Вітаміни	мл	1,0
Fe- хелат	мл	5,0
Аскорбінова кислота	мг	1,0
Мезо-інозит	мг	100
Глутамін	мг	1,0
β-аланін	мг	1,0
Гіберелін	мг	0,1
ІМК	мг	0,8
Цукроза	г	45
Кінетин	мг	1,0
Агар-агар	г	7,0
рН 5,6-5,8		

Формування кореневої системи починається на 10-11 добу, через місяць культивування отримані рослини з *in vitro* пересаджують у ґрунтові суміші та вирощують коренеплоди (рис. 4).



Рис. 4. Подвоєні гаплоїди цукрових буряків з ознакою апоміксису

### 3.4 Отримання насіння цукрових буряків в безпилковому режимі

Отримані коренеплоди подвоєних гаплоїдів вирощених з культури *in vitro* можуть мати різну неправильну форму з виступаючою голівкою, розміром від 1,5 см до 6,0 см, що поступається розмірам вихідних диплоїдних форм (3,5-9,5 см). Для визначення можливості подвоєних гаплоїдів цукрових буряків з ознакою апоміксису утворювати насіння в безпилковому режимі на квітконосні пагони одягають індивідуальні ізолятори. Насіння збирають по мірі дозрівання.

Наявність апоміктичних зародків визначають по ембріологічному аналізу за методикою Е.Е. Ширяєвої [8].

Розроблений метод створення цукрових буряків з нередукованим автономним апоміксисом включає:

I етап – отримання гаплоіндукції з незапліднених насіннєвих зачатків;

II етап – поліплоїдизування гаплоїдних клонів *in vitro*;

III етап – клональне мікророзмноження гомозиготних ліній, отримання розсади та вирощування коренеплодів;

IV етап – отримання насіння в безпилковому режимі та ембріологічні дослідження з оцінки наявності (відсутності) апозиготичних зародків (рис. 5).



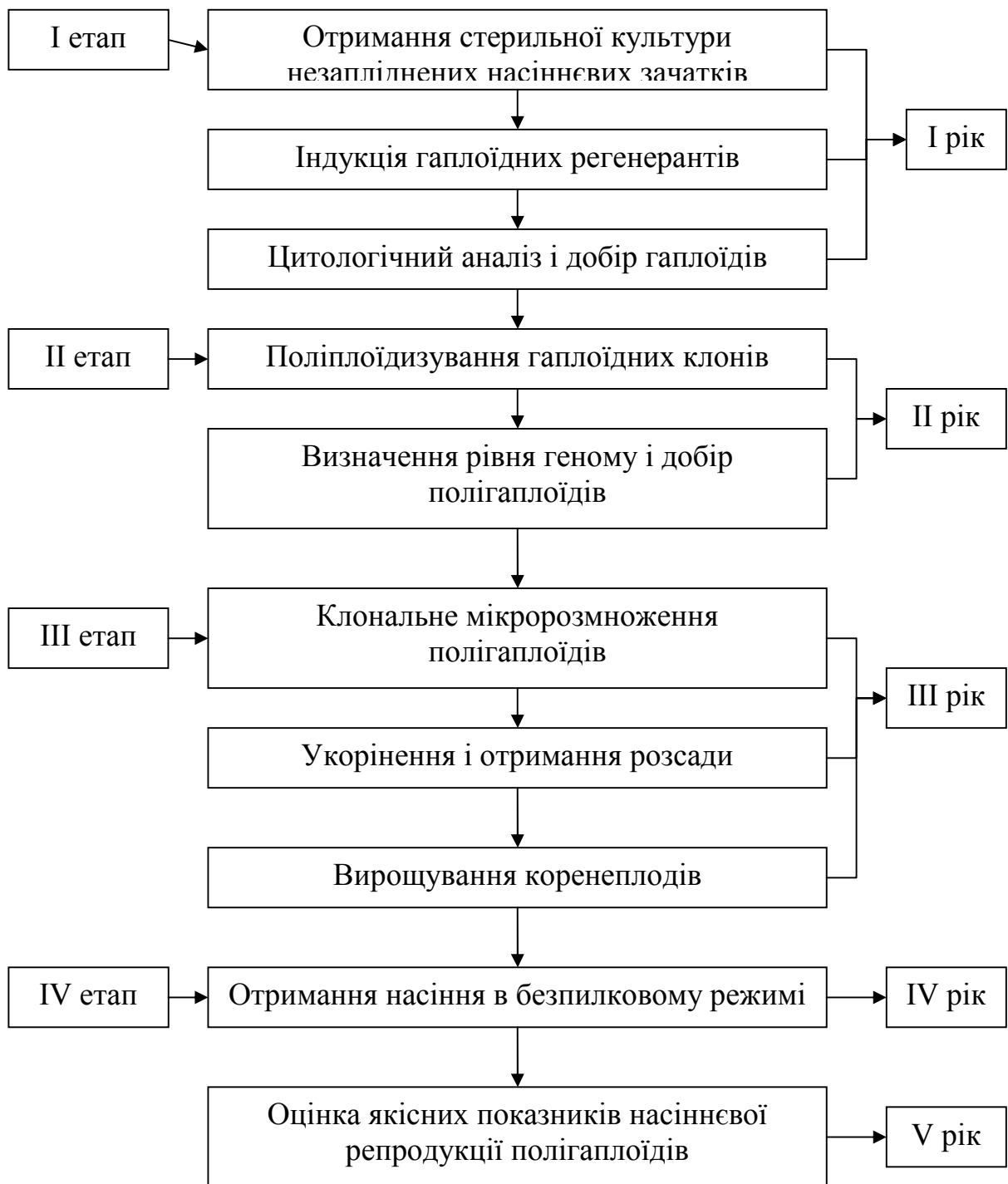


Рис. 5. Етапи створення гомозиготних ліній цукрових буряків з ознакою апоміксису з використанням біотехнологічних методів

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Богомолов М.А. Особенности использования апомиксиса у сахарной свеклы при создании нового исходного материала / М.А. Богомолов // Сахарная свекла. – 2008. – №5. – С. 18-20.
2. Петрушина М.П. Явление апомиксиса у сахарной свеклы с ЦМС. / М.П. Петрушина // Тезисы совещания по селекции сахарной свеклы. – К.: ВНИС, 1972.
3. Знаменская В.В. Принципы и методы создания и поддержания исходного материала на современном этапе селекции сахарной свеклы : автореф. дис. д-ра с.-г. наук 06.01.05 / ВНИИСС. – Рамонь, 1999. – 40 с.
4. Гаплоидия и селекция / Хохлов С.С., Тарнов В.С., Гришина Е.В. и др. – М.: Наука, 1976. – С. 202.
5. Методичні рекомендації зі створення, добору і розмноження гомозиготних ліній цукрових буряків / М.В. Роїк, Н.С. Бех, Т.М. Недяк [та ін.]; редкол. : М. В. Роїк (відп. ред.) [та ін.] ; Нац. акад. аграр. наук України, Ін-т біоенерг. культур і цукр. буряків. - Київ: ТОВ "Поліграф-Консалтинг", 2012. – 18 с.
6. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженню цукрових буряків / В.І. Редько, І.І. Ільєнко, Л.Л. Павловська, В.О. Білоус – К., 1997. – 12 с.
7. Ярмолук Г.И. Цитологические и цитогенетические исследования в селекции сахарной свеклы. / Г.И. Ярмолук, Э.И. Ширяева – К.: Наукова думка, 1982. – 54 с.
8. Ширяева Э.И. Методические указания по цитозембриологическим исследованиям в селекции сахарной свеклы / Э.И. Ширяева, Н.Э. Зайковская, З.А. Болелова – К., 1984. – 64 с.

*Наукове видання*

**Удосконалення способу отримання генотипів цукрових  
буряків з апоміктичним способом розмноження  
методами біотехнології**

**Методичні рекомендації**

*Відповідальний за випуск – О.І. Присяжнюк  
Комп'ютерний набір – М.О. Коцар*

Підписано до друку 11.12.2015 р. Формат 60x84/16.  
Папір Data Copy. Гарнітура Таймс. Друк циф. дуплікаттор.  
Ум. Друк. Арк. 1,69. Обл.-вид. арк. 1,04.  
Тираж 100. Зам. 17/03.  
Видавництво – «ІБКіЦБ НААНУ».  
Друк - ІБКіЦБ НААНУ.