ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ФАКУЛЬТЕТ АГРОТЕХНОЛОГІЙ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ
КАФЕДРА РОСЛИННИЦТВА, СЕЛЕКЦІЇ ТА НАСІННИЦТВА

# МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для виконання лабораторних робіт з дисципліни

## «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за спеціальністю Н1 (201) «Агрономія»

м. Кам’янець-Подільський, 2026 р.

**УКЛАДАЧІ:**

**КЛИМИШЕНА Ріта**, кандидат с.-г. наук, доцент

**ГОРАШ Олександр**, доктор с.-г. наук, професор

**ШЕЙКО Ірина**, асистент

Рекомендовано до друку науково-методичною радою ЗВО «ПДУ» (протокол №_ від __.__.2026 р.)

**РЕЦЕНЗЕНТИ:**

**М'ЯЛКОВСЬКИЙ Руслан**, доктор с.-г. наук, професор, завідувач кафедри садово-паркового господарства, геодезії та землеустрою ЗВО «ПДУ»

**КОЗАК Максим**, кандидат біологічних наук, доцент кафедри біології та екології Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнологія» розраховані для здобувачів, які навчаються у вищих сільськогосподарських навчальних закладах III–IV рівнів акредитації за спеціальністю H1 (201) «Агрономія» освітнього ступеня «Бакалавр».

Методичні рекомендації для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Біотехнологія» розглянуті та затверджені на засіданні кафедри рослинництва, селекції та насінництва ЗВО «ПДУ» (протокол №17 від 09.03.2026 р.); розглянуті та схвалені методичною комісію факультету агротехнологій і природокористування (протокол №4 від 29.04.2026 р.).

©ЗВО «ПДУ»

# ЗМІСТ


| | | |
|---|---|---|
| ВСТУП | | 4 |
| 1 | ТЕМА 1: БІОТЕХНОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ | 6 |
| 2 | ТЕМА 2: РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН | 15 |
| 3 | ТЕМА 3: ЖИВЛЕННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН, ТКАНИН І ОРГАНІВ РОСЛИН | 26 |
| 4 | ТЕМА 4: КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН, ТКАНИН І ОРГАНІВ РОСЛИН | 42 |
| 5 | ТЕМА 5: МОРФОГЕНЕЗ В УМОВАХ IN VITRO | 59 |
| 6 | ТЕМА 6: ФАКТОРИ ВПЛИВУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН | 67 |
| 7 | ТЕМА 7: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН | 75 |
| 8 | ТЕМА 8: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР | 90 |
| 9 | ТЕМА 9: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТЕХНІЧНИХ КУЛЬТУР | 102 |
| 10 | ТЕМА 10: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ КАРТОПЛІ | 108 |
| 11 | ТЕМА 11: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗЕРНОБОБОВИХ КУЛЬТУР | 112 |
| 12 | ТЕМА 12: КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ | 117 |
| 13 | ТЕМА 13: КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ПРОТОПЛАСТІВ | 125 |
| 14 | ТЕМА 14-15: МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ: ВУГЛЕВОДИ ТА БІЛКИ | 139 |
| 15 | ТЕМА 16-17: МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ: НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ ДНК | 152 |
| 16 | ТЕМА 18-19: ОСНОВИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ | 165 |
| 17 | ТЕМА 20: ОСНОВИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ РОСЛИН | 177 |
| 18 | ТЕМА 21: ПЕРВИННІ ТА ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ | 183 |
| 19 | ТЕМА 22: МЕТОДИ ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКИ | 190 |
| 20 | ТЕМА 23: ТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ | 202 |
| ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ | | 214 |
| ВИКОРИСТАНА ТА РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА | | 216 |

# ВСТУП

За останні 50 років площі земель, які використовуються у сільському господарстві залишились практично без змін, тоді як населення Землі зросло більше ніж у двічі. Забезпечення зростаючої кількості населення продуктами харчування відбувалося у ці роки за рахунок поліпшення існуючих та створення нових високопродуктивних, стійких до біотичних і абіотичних факторів сортів рослин, порід тварин, корисних штамів мікроорганізмів. Важливу роль у вирішенні цих питань відіграє біотехнологія і особливо сучасна біотехнологія.

*Біотехнологія* – напрямок сучасної науки і техніки, основним завданням якого є використання живих організмів і біологічних процесів у виробництві.

Широкого поширення термін *«біотехнологія»* набув у середині $70^{-х}$ років XX ст., хоча такі галузі біотехнології як хлібопечення, виноробство, пивоваріння, сироваріння, які базуються на використанні мікроорганізмів, відомі з давніх часів.

Сьогодні до складу біотехнології входять промислова мікробіологія, генетична інженерія, клітинна інженерія. Сучасна біотехнологія характеризується використанням біологічних методів для боротьби з забрудненням довкілля, захисту рослин від шкідників та хвороб, виробництва цінних біологічно активних речовин (антибіотиків, ферментів, гормональних препаратів тощо).

Сфера використання біотехнологічних процесів постійно розширюється, особливо у сільському господарстві, в охороні здоров’я (сюди можна віднести медицину, фармакологію, охорону навколишнього середовища), харчовій промисловості (харчові та кормові добавки).

Провідною ідеєю сільськогосподарської біотехнології є отримання повноцінних харчових продуктів безпосередньо із рослинної сировини, без участі тварин.

Біотехнологію прийнято поділяти на традиційну, або класичну і нетрадиційну, або сучасну.

Традиційні біотехнології, які існують тисячоліттями використовують для отримання необхідних людині продуктів мікроорганізми, організми тварин та рослин.

Об’єктами дослідження нетрадиційної біотехнології, розвиток якої розпочався наприкінці XIX століття, стали тканини і клітини вищих багатоклітинних організмів, а також мікроорганізми, створені методами генної інженерії. Вищим досягненням сучасної біотехнології є генетична трансформація – перенесення чужорідних генів та інших носіїв спадковості у клітини рослин, тварин і мікроорганізмів, отримання трансгенних організмів з новими або покращеними властивостями і ознаками. Саме цей напрямок біотехнології дозволить вирішити докорінні завдання селекції біологічних об’єктів на стійкість, високу продуктивність і якість продукції. Уже сьогодні у багатьох лабораторіях світу, у тому числі і в Україні, за допомогою методів генетичної трансформації створені принципово нові трансгенні рослини, тварини і мікроорганізми, які отримали комерційне визнання.

Лауреат Нобелівської премії Норман Борлауг вважає, що лише нові біотехнології можуть врятувати світ від голоду та екологічних катастроф. І суттєва роль у цьому належить біотехнології рослин.

*Біотехнологія рослин* – це сукупність технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин.

Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин поза організмом на штучних живильних середовищах у строго контрольованих умовах дозволяє:

– отримувати результати незалежно від клімату, сезону, ґрунтових умов;

– вивчати такі складні процеси як ріст, клітинна диференціація і розвиток рослинного організму, метаболізм і його регуляція у клітинах і тканинах цілої рослини;

– проводити швидке розмноження у дуже великих кількостях;

– отримувати безвірусний рослинний матеріал;

– створювати принципово нові технології для промисловості і сільського господарства;

– скоротити селекційний процес у 2, а той і 3 рази.

# ТЕМА 1: БІОТЕХНОЛОГІЧНА ЛАБОРАТОРІЯ

***Мета:*** ознайомлення з комплектацією та основними вимогами до біотехнологічних лабораторій

## *Теоретична частина*

Дослідження в галузі біотехнології та виробництво продукції вимагають у більшості випадків особливих умов, які можливо створити лише у спеціалізованих лабораторних приміщеннях. Оскільки роботи переважно проходять в асептичних умовах, це і визначає основні вимоги до організації робіт та оснащення приміщень.

Приміщення лабораторії повинно бути по можливості просторим та світлим. Лабораторію не слід влаштовувати в тих місцях, де з різних причин відбувається вібрація будинку, оскільки це заважає роботі і часто унеможливлює застосування аналітичних ваг, а також мікроскопів та інших оптичних приладів.

Не можна розміщувати лабораторію близько до котельних, димових труб та місць, де можливе забруднення повітря пилом, сажею, мікроорганізмами або хімічно активними газами. Останні можуть псувати прилади, реактиви та впливати на розвиток організмів, що культивуються.

Досить суттєвим є освітлення приміщень. По можливості лабораторія повинна мати великі вікна, що забезпечують достатнє освітлення. Для вечірнього освітлення, крім стелі, над кожним робочим місцем повинно знаходитися джерело світла.

Типова біотехнологічна лабораторія, як правило, складається із спеціальних приміщень:

*1. Кімната для миття посуду* оснащена декількома раковинами із кислотностійкого матеріалу з гарячою та холодною водою і стелажами для сушіння посуду. В зв’язку з великою кількістю скляного посуду, який використовується в роботі, мийку роблять глибокою і широкою, зручною для роботи декількох чоловік. Над мийкою встановлюють дистилятор. В кімнаті при можливості встановлюють миєчні машини, що значно дозволяє економити час і працю, які затрачаються на миття скляного посуду.

*2. Кімната для приготування поживних середовищ* забезпечена технічними, аналітичними, торзійними вагами, pH-метром, бідистилятором, холодильними камерами, електроплитками, водяними

банями, лабораторними столами, шафами для зберігання реактивів та чистого посуду, полицями для розміщення хімічних реактивів, приладів тощо. В кімнаті можна розмістити машину для виготовлення ватних пробок.

*3. Автоклавна* – важлива складова частина лабораторії. В ній встановлюють вертикальні (типу ВК-60, ВК-70) або горизонтальні (ГК-100) автоклави, сушильні шафи з режимом роботи 160-180°С, дистилятор, столи та полиці для розміщення простерилізованих предметів і, по можливості, стерилізатор.

*4. Операційна (асептична) кімната* є основою лабораторії. Вона забезпечена ламінар-боксами і використовується для проведення стерильних робіт. В ламінар-боксах відбуваються живцювання та інші маніпуляції з рослинними об'єктами в асептичних умовах. Основна вимога, яка ставиться до цієї кімнати – можливість легко забезпечити асептичні умови. Ламінар-бокс – це невелика камера, в яку повітря подається під тиском через спеціальні стерилізуючі фільтри. Надлишковий тиск, який створюється в середині робочого об'єму камери, перешкоджає попаданню в неї неочищеного повітря. Невеликі розміри дозволяють розміщувати по 3-6 боксів в одній кімнаті.

*5. Світлова культуральна кімната* використовується для культивування ізольованих тканин рослин та рослин-регенерантів (рис. 1). В цій кімнаті автоматично регулюється і підтримуються на постійному рівні освітленість, температура 25-26°С, вологість повітря 70-80%, 14-годинний фотоперіод, кондиційоване повітря. Кімната оснащена стелажами, які зручно розміщуються ярусами (один над другим). На стелажах встановлюють штативи з пробірками і культуральні колби таким чином, щоб вони не затіняли одна другу. Джерела світла повинні забезпечувати спектр, сприйнятливий для протікання в рослинах основних біологічних процесів (400-700 нм), а інтенсивність випромінювання - бути в межах

Рис. 1. Світлова культуральна кімната

1000-10000 лк. Освітлення в кімнаті повинно бути боковим або верхнім. Регулювання світлового режиму забезпечується за допомогою реле часу.

*6. Теплиця* необхідна для заключного етапу робіт по перенесенню та адаптації рослин-регенерантів з умов in vitro в умови in vivo. Найчастіше її розміщують окремо від основної будівлі лабораторії. Адаптацію до нестерильних умов проводять в різних тепличних комплексах (гідро- та аеропонні установки і тощо) (рис. 2).

Рис. 2. Постасептичне гідропонне вирощування гербери

Лабораторні приміщення також оснащують обладнанням, необхідним для біохімічних, гісто- і цитогенетичних та інших досліджень, пов'язаних з основними роботами по вирощуванню рослинних тканин.

***Лабораторний посуд, інструменти та матеріали.*** Для роботи з культурами *in vitro* необхідно мати певний набір посуду, інструментів, матеріалів, різноманітність і кількість яких залежать від напрямку і характеру та масштабу виробництва (рис. 3).

Рис. 3. Набір посуду, інструментів необхідний для отримання і розмноження регенератів:

1 – штативи; 2 – чашки Петрі; 3 – спиртівки; 4 – пробірки з поживним середовищем; 5 – ватно-марлеві пробки до пробірок; 6 – ланцети зі змінними лезами; 7 – звичайні ланцети; 8 – голки багаторазові; 9 – тримачі для голок; 10 – пінцети; 11 – ножиці; 12 – вата; 13 – брусок для точіння голок та ланцетів

Посуд, який використовують при роботі з культурою ізольованих тканин можна розділити на 3 групи:

1. Посуд для приготування і зберігання поживних середовищ: бутлі з темного скла, колби Ерленмейера, колби мірні, колби Бунзена, колби плоскодонні, стакани хімічні, циліндри мірні, піпетки Мора, піпетки градуйовані, часові скельця, лінійки, скляні палички різних розмірів, фільтри Зейтца, скляні та мембранні фільтри.

2. Посуд для вирощування ізольованих тканин: бутлі для культивування клітинних суспензій, колби Ерленмейера, колби Ерленмейера широкогорлі, чашки Петрі різного діаметра, пробірки біологічні, флакони, скельця предметні з ямкою і без ямки, скельця покривні.

3. Посуд, який використовується при пересаджуванні тканин: стакани з кришкою, чашки Петрі, колби Ерленмейера, піпетки, стакани фарфорові для стерилізації інструментів.

*Інструменти*, які використовують для ізолювання і пересадки тканин на середовища: скальпелі, пінцети анатомічні, очні пінцети, довгі пінцети з тонкими кінцями, ножиці, пробкові свердла різного діаметра, леза для безпечних бритв і корцанги для їх утримання, металічні петлі, голки анатомічні.

*Матеріали*, які потрібні для роботи з культурою тканин: вата, марля, нейлонова тканина, целофан, алюмінієва фольга, обгортковий папір, пергаментний папір, фільтрувальний папір, гумові кільця. Вату використовують для виготовлення пробок, ватних тампонів для піпеток, протирання робочих поверхонь при стерилізації. Марля необхідна для обгортання ватних пробок, фільтрування середовищ, виготовлення мішечків. Для фільтрування клітинних суспензій необхідна нейлонова тканина різної щільності. Із целофану роблять ковпачки для запобігання середовищ від висихання, які закріпляють гумовими кільцями. Алюмінієвою фольгою зручно закривати культуральні посудини замість ватних пробок. Для загортання посуду при стерилізації в автоклаві потрібний обгортковий або пергаментний папір. На фільтрувальному папері підсушують рослинний матеріал після стерилізації.

Досить часто рослини вирощують не тільки у пробірках, але й у різноманітних банках та контейнерах. Для культивування об’єктів *in vitro* окрім пробірок з ватно-марлевими пробками використовують банки місткістю 150-250 мл з різьбовими кришками (рис. 4). Для газообміну в

такі кришки вставляють поролон, через який проходить повітря, не пропускаючи мікроорганізми.

Рис. 4. Вирощування рослин *in vitro*: а – картопля в пробірках закритих ватно-марлевими пробками; б – ведмежий горіх в пробірці, закритій пробкою із фольги; в – суниця та черешня в банках.

Ватно-марлеві пробки, якими закриваються пробірки та колби, виготовляють на спеціальних приладах (рис. 5).

Як виняток культуральні ємності (пробірки, колби, банки, ...) закривають фольгою. Але використання фольги небажане з багатьох причин; головні, це:

Рис. 5. Прилад для виготовлення ватних пробок.
*Ватна пробка формується під час подачі вати на вісь, що обертається. Поверхня пробки ущільнюється зволоженою рукою. Потім вату обгортають марлею.*

1 – фольга не пропускає повітря, і в пробірках утворюється конденсат (рис. 4, б);

2 – порушується газообмін;

3 – досить часто у фольгових пробках, особливо у разі повторного використання утворюються невидимі для людини мікротріщини, через які проникає небажана мікрофлора.

Для культивування рослин in vitro іноземні компанії випускають спеціальні банки (рис. 6), які усувають вказані недоліки.

Під час вирощування пробіркових рослин пробірки з рослинами розміщують у штативах на спеціальних освітлювальних блоках-стелажах (рис. 7). Освітлювальні блоки існують найрізноманітніших конструкцій. Штучне освітлення в них може бути двох типів: 1 – збоку від культивованих об’єктів, 2 – зверху від культивованих об’єктів (рис. 7).

Посуд та реактиви зберігають у спеціальних шафах, що вберігають його від посторонніх, потрапляння пилу та сонячних променів (рис. 8).

***Створення та підтримання асептичних умов.*** Основною умовою

успішного культивування in vitro є стерильність поживного середовища, посуду, матеріалів, інструментів, садивного матеріалу, приміщень. *Стерилізацією* називається повне знищення всіх мікроорганізмів (вегетативних і спорових форм).

Існують такі методи стерилізації, які використовуються разом або окремо залежно від технологічних потреб: прожарювання на полум'ї, кип'ятіння, сухий жар, вологий жар, автоклавування. Розчини, які розкладаються під час термічної обробки, стерилізують за допомогою спеціальних мікрофільтрів з порами 0,22 мкм в діаметрі (рис. 9). Щоб уникнути потрапляння мікроорганізмів та їх спор у ламінарні шафи, працюють за постійного потоку повітря, яке нагнітається через фільтри і не дозволяє завислим у повітрі мікроорганізмам та їх спорам опускатися на робочу поверхню боксу.

Рис. 6. Культура троянд in vitro у спеціальних банках

***Миття посуду.*** Для зменшення кількості шкідливої мікрофлори важливими є особливості миття лабораторного посуду. Весь посуд, що використовується для приготування і зберігання середовищ, вирощування об'єктів, піддається ретельному миттю. Існує два методи миття посуду: кислотний і лужний.

Рис. 7. Освітлювальний блок-стелаж

Найбільш поширеним і надійним методом очищення скляного посуду є обробка його концентрованою сірчаною кислотою з біхроматом калію («хромпік») протягом 4–6 годин. Потім посуд багаторазово промивають теплою проточною водою і ретельно ополіскують

Рис. 8. Шафа для лабораторного посуду

дистильованою водою.

Використаний посуд звільняють від залишків середовища і ретельно миють з застосуванням звичайних мийних засобів (лужний метод), і ополіскують дистилятом.

Вимитий посуд сушать і стерилізують сухим жаром у сушильній шафі при температурі 170-180$^0$С 1-2 год, закривають целофановими ковпачками і зберігають у металевих біксах і пеналах або шафах, захищених від проникнення пилу.

*Стерилізація посуду*. Увесь посуд перед стерилізацією необхідно ретельно вимити та висушити. поміщати вологий посуд в гарячу шафу, тому, що це може бути причиною його пошкодження.

Стерилізація сухим жаром. Культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо ) перед наповненням живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром в сушильній шафі. Тривалість стерилізації: при 150$^0$С – 2,5 год, при 160$^0$С – 2 год, при 170$^0$С – 1 год.

Стерилізація сухим паром – автоклавування при 2 атм (133$^0$С) 30-40 хв в залежності від заповнення автоклава.

*Камера автоклава заповнюється не більше як на 2/3 об'єму.*

Посуд загорнутий в папір або з ватними тампонами стерилізують автоклавуванням. При автоклавуванні піпеток верхню частину закривають ватним тампоном (приблизно на 2 см) і кожну окремо загортають в папір. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких слід покласти вату, щоб запобігти обламуванню носиків піпеток.

*Стерилізація інструментів.* Стерилізація сухим жаром. Інструменти попередньо стерилізують сухим жаром в сушильній шафі. Тривалість стерилізації: при 150$^0$С – 2,5 год, при 160$^0$С – 2 год, при 170$^0$С – 1 год.

Стерилізація полум'ям. В боксі безпосередньо перед роботою інструменти занурюють у фарфоровий стакан з 96$^0$ спиртом і стерилізують обпалюванням у полум'ї спиртівки. Стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним використанням його слід знову простерилізувати спиртом і обпалити.

Допоміжні матеріали: вату, пробки, марлю, папір, целофан, фольгу стерилізують автоклавуванням.

Перед початком операцій у ламінарному боксі необхідно його підготувати до роботи. Для цього використовують стерилізацію ультрафіолетом 30 хв з послідуючим протиранням робочої поверхні 70-96$^0$

спиртом. Іноді досить продування боксу 30 хв стерильним повітрям і протирання спиртом.

*Стерилізація приміщень.* Передпосадкова стерилізація операційної кімнати (боксу) є обов'язковим процесом, в результаті якого необхідно усунути джерела можливої інфекції тканевих і клітинних культур (бактерії, спори, гриби).

Стерилізацію проводять у два етапи. Приміщення слід утримувати в абсолютній чистоті, тому в першу чергу його звільняють від бруду та пилу. Бруд видаляють ретельним відмиванням водою з хлорним вапном. Наступним етапом обробки є стерилізація ультра-фіолетовим промінням, яке згубно діє на вегетуючі форми мікроорганізмів. Як джерела опромінення використовують бактерицидні лампи (рис. 10), випромінювачем в яких є електрична дуга, що виникає в парах ртуті низького тиску.

Рис. 9. Мікрофільтр для стерилізації розчинів: 1 – мікрофільтр в стерильній упаковці; 2 – мікрофільтр і шприц перед фільтруванням

Застосовувати такі лампи безпосередньо в присутності людей не можна. Тому стерилізацію ультрафіолетом проводять за 8–12 годин до початку роботи.

*Важливо знати:* бактерицидна лампа – призначена для знезараження приміщень від мікробів, бактерій тощо. Широко застосовуються у медицині і промисловості для знезараження повітря, води, продуктів харчування. Бактерицидні лампи низького тиску типу ДБ є джерелом ультрафіолетового випромінювання з довжиною хвилі 253,7 нм, яке має сильну бактерицидну дію.

Випромінювання ультрафіолетове – оптичне випромінювання, що займає діапазон між видимим і рентгенівським випромінюванням, довжиною хвиль у вакуумі від 10 нм до 400 нм.

Під час роботи уникають розмов та рухів руками над пересаджуваними об'єктами. Виконувати посадку необхідно як можна швидше, зменшуючи час, за якого культуральні посудини залишаються відкритими.

Рис. 10. Бактерицидна лампа типу ДБ. Будова подібна до ламп ЛБ, ЛД. Виготовляються потужністю 60 Вт (лампа ДБ-60) і 30 Вт (ДБ-30).

Після роботи робоче місце і все приміщення прибирають. Робочі столи дезінфікують спиртом.

*Стерилізація рослинного матеріалу*. Різні методи культури *in vitro* передбачають використання у роботі асептичного матеріалу. Для отримання стерильних рослин відбирають в in vivo необхідні рослини, відмивають їх від бруду, розділяють на сегменти (їх називають експлантатами або експлантами, що є одне і теж саме). Ними можуть бути живці, бруньки, шматочки коріння, стебла, листка та ін. і стерилізують одним з наступних розчинів антисептиків: 70-відсотковий етанол, діоцид, гіпохлорид натрію. Щоб видалити антисептик з поверхні рослинного об'єкта, його тричі промивають стерильною автоклавованою водою. Після стерилізації експлант переносять на штучні живильні середовища для подальшого культивування *in vitro*.

***Завдання***

1. Які загальні принципи організації біотехнологічної лабораторії?
2. Описати вимоги до кімнати для миття посуду.
3. Описати вимоги до кімнати для приготування середовищ.
4. Описати вимоги до операційної кімнати.
5. Описати вимоги до світлової культуральної кімнати.
6. Для чого необхідні теплиці?
7. На які групи поділяють посуд при роботі з культурою in vitro?
8. Який посуд та інструменти необхідні для отримання і розмноження регенератів?
9. Описати методи миття посуду.
10. Описати методи стерилізації посуду.
11. Описати методи стерилізації інструментів.
12. Яке призначення бактерицидної лампи?

# ТЕМА 2: РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН

***Мета:*** вивчення регуляторів росту і розвитку рослин

## *Теоретична частина*

***Регулятори росту рослин (РРР)*** – природні або синтетичні органічні сполуки, які активно регулюють фізіологічні та морфогенетичні програми росту і розвитку рослинного організму. Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називаються *фітогормонами.*

Фітогормони переміщуються по рослині і впливають на ріст і диференціацію тих тканин і органів, куди потрапляють. Таким чином, фітогормони – сполуки, за допомогою яких здійснюється взаємодія клітин, тканин і органів рослин. Вони синтезуються і функціонують в мікрокількостях і, на відміну від інших метаболітів, у тому числі вітамінів, здатні викликати в рослині формоутворюючі ефекти (ріст коренів, пагонів, утворення квіток, плодів та ін.).

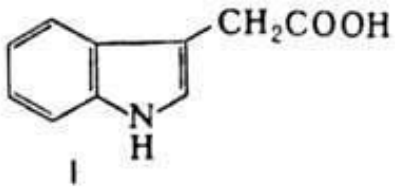
У рослин розрізняють такі основні типи фітогормонів: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен, брасиностероїди. Спеціалісти ведуть активний пошук нових ендогенних фізіологічно активних речовин, які з часом можуть набути статус фітогормонів. Тільки за останні роки до фітогормонів були віднесені жасмонова кислота, олігосахарини, фузікокцин (Муромцев Г.С., 1996).

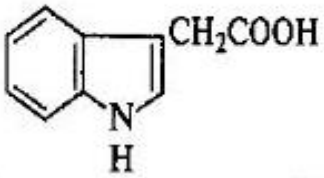
**Ауксини** (від грецького auxein – збільшуватись, рости) – група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягування клітин, сприяють формуванню коренів, провідних пучків, оплодня.

ІОК є основним ауксином рослин, але не єдиним. Відомо багато речовин індольної природи з ауксиновою дією, які синтезовані лабораторним шляхом: індолілпропіонова, індолілмасляна, індолілпіровиноградна, нафтилоцтова кислота. Існують ауксини неіндольної природи: 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д); 2,4,5-трихлорфеноксиоцтова кислота (2,4,5-Т); 2,3,6-трихлорбензойна кислота та ін. Вони у високих концентраціях використовуться як гербіциди.

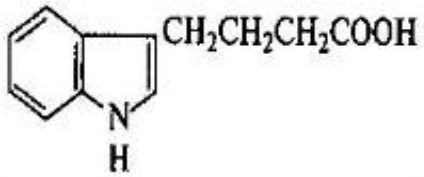
До ауксиноподібних речовин відносять також деякі природні фенольні сполуки: ферулову кислоту, коніфериловий спирт, ванілін, кофейну кислоту. Їх активність нижча, ніж ІОК. Саме те, що знайдено багато спонук із ауксиновою активністю, говорить про ауксин у множині, а не про ауксин як одну хімічну сполуку.

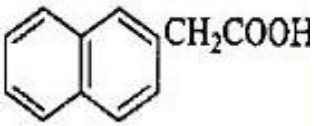
Ауксини утворюються в молодих частинах рослин, які активно ростуть: точках росту стебла, верхівках коренів, молодих листках, бруньках, квітках і плодах. Транспортування ІОК по рослинних тканинах відбувається полярно – від верхівки пагона до кореня, від листка до верхівки пагона або ж вгору по кореню. В тканинах рослин ІОК знаходиться у двох формах: вільній і зв'язаній. Біологічна активність притаманна тільки вільним формам ІОК. Нерівномірним розподілом ауксинів в осьових органах пояснюють ростові рухи, а також тропізми рослин.




***Ауксин*** ***Індолілоцтова кислота (ІОК)***




***Індолілмасляна кислота (ІМК)*** ***Нафтилоцтова кислота (НОК)***

*Фізіологічна дія ауксинів.* Класична дія ауксинів – посилення росту за рахунок стимуляції розтягнення клітин. ІОК активує роботу мембранної помпи іонів $H^+$, знижує pH позаклітинного середовища і посилює, тим самим, пластичність клітинних стінок. Підвищення концентрації протонів послаблює водневі зв'язки між мікрофібрилами целюлози, геміцелюлози і ксилоглюканів, що дозволяє їм ковзатись відносно одна одної при підвищенні тургорного тиску. Цікавим спостереженням є «кислий ріст» клітин за рахунок розтягнення клітинних стінок без ауксинів при pH близьких до 3,0. Можливо, що у розпушуванні клітинної стінки беруть участь ферменти із низькими значеннями pH.

Однак видовження клітини – це не просто розтягнення клітинної стінки. Про це свідчить той факт, що клітинні стінки при розтягненні не стають тоншими, тобто одночасно відбувається синтез de novo компонентів стінки. Це, в свою чергу, дає підстави враховувати участь ауксинів в синтезі і транспорті нових клітинних полісахаридів. Вченими

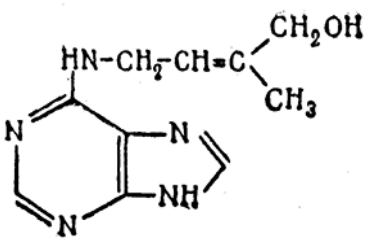
вже встановлена причетність ІОК да стимуляції синтезу різних типів РНК (м-РНК, т-РНК. р-РНК) і білка в клітинах, які розтягуються.

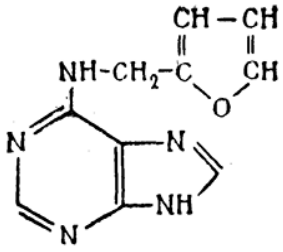
ІОК зумовлює явище апікального домінування, коли апікальна меристема гальмує ріст бокових меристем. Домінування верхівки – класичний приклад того, як одна частина рослини контролює іншу за допомогою фітогормонів. Природу апікального домінування пояснюють декілька гіпотез:

1) верхівочна меристема (брунька) найбільш насичена ауксином, і є атрагуючим центром притягнення води та різних поживних речовин, яких не вистачає для бокових бруньок;

2) під дією ауксину синтезується інгібітор росту, який проникає у бокові меристеми і гальмує їх розвиток.

**Цитокініни** отримали свою назву через здатність стимулювати цитокінез (клітинний поділ). З хімічної точки зору вони є похідними 6-амінопурину (аденіну). На сьогодні ідентифіковано близько 15 природних цитокінінів (зеатин, зеатинрибозид, зеатинрибозидфосфат та ін.). В умовах ін вітро широко використовують високоактивний синтетичний препарат кінетин (одержують при автоклавуванні ДНК) і бензиламінопурин /БАП/.




***Зеатин*** ***Кінетин***

Більше всього цитокінінів там, де проходить швидкий поділ клітин. Особливо багато міститься їх у проростаючому насінні, достигаючих плодах, верхівках коренів, пухлинних клітинах; менше – у стеблах, листках. Синтез цитокінінів у дорослих рослин локалізується в апікальній меристемі коренів, звідки вони транспортуються у надземні органи з ксилемним соком.

*Фізіологічна дія цитокінінів.* Цитокініни поліфункціональні у своїй дії на різних етапах росту і розвитку рослин. Сучасна наробка фактичних даних і їх обговорення дозволяють акцентувати увагу на двох основних ефектах фізіологічної дії цитокінінів: 1 – стимуляція процесів клітинного поділу і диференціації; 2 – затримка процесів старіння відокремлених органів.

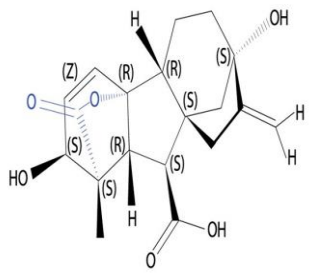
Структурна подібність цитокінінів з аденіном – компонентом ДНК і РНК – не випадкова і пов’язана з їх функціональними особливостями. Достовірно встановлена специфічність дії цитокінінів як стимуляторів мітозу. При вирощуванні ізольованих клітин ін вітро особливо чітко виявляється залежність поділу клітин від введення до поживного середовища екзогенного цитокініну.

При взаємодії з ауксинами і гіберелінами цитокіни беруть участь у новоутворенні і диференціації органів ін віво та ін віво, що пов’язують з їх впливом на біосинтез ДНК, РНК, білків, а також на перерозподіл продуктів обміну у рослині.

Цитокініни стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. Ми розглядали, що ауксини утворюються у верхівках, переміщуються вниз по стеблу і пригнічують розвиток бокових бруньок. Чим ближче бокові бруньки розміщені до верхівки, тим сильніше пригнічені, і навпаки. Таке гальмування росту можливо зняти шляхом видалення перхівки або нанесенням цитокініну на бокові бруньки. Саме цим способом домагаються утворення пагонів з усіх пазухових меристем бруньки ін вітро на підвищених концентраціях цитокінінів в поживних середовищах.

Здатність цитокінінів затримувати старіння проявляється на листках. Відокремлений листок у воді швидко старіє, що проявляється у пожовтінні, втраті ним білка, ДНК, РНК. Якщо нанести на такий листок краплю кінетину, то оброблена ділянка залишиться зеленою. Затримка старіння листка також відбувається при утворенні коренів на черешку листка. З цього можна зробити висновок, що цитокініни, які утворюються в коренях, переміщуються в листки і підтримують структурно-функціональну життєдіяльність листків. Цитокініни продовжують тривалість життя (об’єкти довго зберігають гарний вигляд) свіжої капусти, салату та інших зелених овочів, а також зрізаних квітів, що використовується на практиці.

**Гібереліни** (від назви патогенного гриба-аскоміцета *Gibberella fujikuroi*, в якому вони були вперше виявлені) – це тетрациклічні дитерпенові кислоти, що за кількістю вуглецевих атомів розподіляються на $C_{19}$- та $C_{20}$-гібереліни, які синтезуються з ацетил-СоА через мевалонову кислоту та геранілгераніол. Найбільш відомий



гіберелін – гіберелова кислота (ГК або $ГА_3$).

У вищих рослин найбільш багаті на гібереліни швидкоростучі органи – молоді апікальні листки, бруньки, не зріле насіння і плоди. Звідси вони мігрують по флоемі і ксилемі уверх-вниз, тобто гібереліни не виявляють полярності транспорту, яка характерна для ауксинів. Велике значення для утворення гіберелінів у рослині має світло (воно сприяє їх біосинтезу в хлоропластах листків).

*Фізіологічна дія гіберелінів.* Різнопланові експерименти з вивчення фізіологічної дії гіберелінів дозволяють зробити висновок, що гібереліни – компоненти систем, які регулюють ріст і розвиток рослин.

Найбільш виражена дія гіберелінів – їх здатність стимулювати ріст, видовження стебла за рахунок розтягування клітин (а не їх поділу), що вказує на подібність із ефектом дії ауксинів. За допомогою гіберелінів відновлюють нормальний ріст карликових сортів гороху, кукурудзи або перетворюють карликову форму квасолі у витку ліану. На практиці гіберелінами обробляють коноплю та льон для підвищення виходу волокна.

Другий класичний ефект дії гіберелінів пов’язаний з виходом насіння злакових із стану спокою. Після того, як насіння поглине крізь мікропіле воду, зародок в зоні щитка починає синтезувати гібереліни $ГА_3$, $ГА_4$. Гібереліни переміщуються в алейроновий прошарок, що оточує ендосперм, і стимулюють утворення гідролітичних ферментів (альфа-амілаз та ін.). Ферменти починають розщеплювати запасний крохмаль ендосперму до простих цукрів, які використовуються для росту зародка. Таким чином, гіберелінів «запуск» утворення амілаз є необхідною умовою для проростання насіння. Механізм цього процесу остаточно не з’ясований. Вважають, що гібереліни стимулюють синтез м-РНК, які специфічні для амілаз.

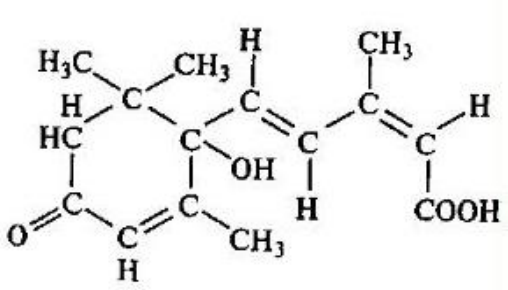
Важливе значення гіберелінів у процесі яровизації і цвітіння. Яровизація – реакція рослин на вплив низьких позитивних температур (+2 – +10°С) у певний період онтогенезу. Центром сприйняття яровизаційного впливу в рослині може бути точка росту або будь-яка зона, в якій відбувається поділ клітин. Яровизація проявляється у прискоренні початку періоду плодоношення (цвітіння). Встановлено, що у ході яровизації підвищується рівень гіберелінів, що дозволяє холодову обробку замінити обробкою неяровизованих рослин гіберелінами. Так, екзогенно введений гіберелін у багатьох дворічних рослин виключає потребу в яровизації і

викликає їх цвітіння.

Гібереліни викликають партенокарпію – процес, при якому плоди розвиваються без запліднення. Для цього квітки рослин обприскують розчином гібереліну, що практично застосовується у виноградарстві (отримують безнасіннєві ягоди великого розміру).

Серйозної уваги заслуговує здатність гіберелінів змінювати у деяких рослин вираженість статі. Встановлено, що вміст гіберелоподібних речовин в рослинах огірка корелює із кількістю чоловічих квіток. Багаточисельними роботами показана маскулінізація (зсування статі у чоловічий бік) рослин родини гарбузових під впливом гіберелінів.

**Абсцизова кислота (АБК).** Абсцизин (від лат. abscisio – опадати, спадати) – виділена з молодих плодів бавовнику сполука, яка викликає опадання листків цієї рослини. У 1967 році було вирішено назвати цю речовину абсцизовою кислотою (АБК).



З хімічної точки зору АБК відноситься до терпеноїдів із складною будовою. Більшість органів вищих рослин здатні синтезувати АБК, транспорт речовини відбувається по провідній системі (флоемі, ксилемі). Вміст АБК визначають за допомогою біотестів та фізичними методами.

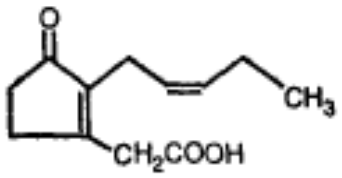
Механізм дії на сьогодні невідомий. Експериментально доведена функція АБК як природного інгібітора в явищі геотропізму кореня. Замикання продихів в умовах посухи супроводжується збільшенням концентрації АБК. Дія АБК пов’язана із спокоєм бруньок і насіння, опаданням і квіток, плодів, старінням і дозріванням.

У світовій практиці АБК використовують для обприскування плодових, щоб викликати одночасне опадання плодів для скорочення часу при збиранні врожаю.

Проводяться дослідження дії АБК в умовах ін вітро. Додавання до поживного середовища 7,6 мкМ АБК впливало на ріст і формування ембріогенних клітинних агрегатів у суспензійних культур клітин ярої пшениці Triticum durum L. (Шаяхметов І.Ф., Шакирова Ф.М., 1996). Автори вважають, що АБК бере участь у зміненні балансу фітогормонів і сприяє «дозріванню» соматичних ембріоїдів. АБК попереджує утворення кореневих структур, що виводить процес регенерації з тупикового напрямку – ризогенезу, після якого, як правило, не вдається відновити

ембріогенн9і потенції культури і одержати рослини-регенеранти.

**Жасмінова кислота.** Повідомлення про жасмінову кислоту (ЖК), як про фітогормон з'явились недавно. Її роль в системі фітогормональної регуляції не зовсім зрозуміла, проте відомо, що ця речовина характеризується міцною інгібіторною дією.




Під дією жасмінової кислоти різко збільшується рівень іншого фітогормона – абсцизової кислоти. Вона здатна також регулювати рівень етилену, стимулюючи його біосинтез в молодих ростучих тканинах і знижуючи – у старих.

Жасмінова кислота індукує біосинтез певних білків, функції яких до теперішнього часу не відомі. Цей фітогормон може також управляти активністю вже існуючих в клітині ферментів, наприклад активність поліфенолоскидаз під дією жасминової кислоти підвищується в 6-9 разів.

Дія жасмінової кислоти подібна до дії АБК. В той же час спостерігається різна чутливість органів до АБК і ЖК.

**Саліцилова кислота.** Перші повідомлення про гормональну дію саліцилової кислоти з'явились у 1988 р., коли був встановлений ефект підвищення температури пробиваючого сніг крокуса, який контролюється саліциловою кислотою. Відомий також ряд інших ефектів саліцилової кислоти: блокування біосинтезу етилену на рівні його утворення з АЦК (аміноциклопропан-1-карбонової кислоти), переривання відновлення нітратів на рівні NO, індукування цвітіння короткоденної рослини, що знаходиться в умовах довгого дня.

**Олігосахариди.** В теперішній час існує багато численних експериментальних даних, що свідчать про те, що деякі олігосахариди, які утворюються при частковому гідролізі клітинних стінок рослин, грибів і комах, характеризуються регуляторною дією на рослини. Їх вплив проявляється у підвищенні стійкості рослин до шкідливих організмів за рахунок активації системи фітоімунітету. Встановлено, що збільшення рівня олігосахаридів сприяє посиленню утворення етилену в рослинах. Проте до останнього часу залишається відкритим питання про те, чи мають олігосахариди вплив безпосередньо активуючи власну систему відповіді або індукуючі ним ефекти пов'язані з збільшенням біосинтезу етилену.

**Інгібітор цвітіння BEHD.** В кінці 80-х років велику зацікавленість вчених світу викликало відкриття інгібітора цвітіння, який називається

BEHD. Воно являє собою лінійну молекулу ліпіду з 18 вуглеводними атомами і декількома ненасиченими зв’язками. Ця речовина синтезується у довго-денних і коротко-денних рослинах в умовах не індукційного фотоперіоду і швидко метаболізується при перенесенні рослин в індуктивні умови. Встановлені експериментальні дані дозволяють стверджувати, що BEHD здатний відіграти значну роль в переході рослин до формування генеративних органів.

Список фітогормонів не вичерпується наведеними класами. Ці речовини присутні в рослинах у дуже малих кількостях, тому знайти, виділити та ідентифікувати їх надзвичайно важко, але шляхи в цьому напрямі активно ведуться.

**Фітогомони**

Для росту і диференціації будь-яких рослинних клітин необхідні ауксини і цитокініни. Оскільки різні клітини і тканини в культурі відрізняються за здатністю до автономного синтезу і метаболізму окремих груп фітогормонів, то у зв’язку з цим їхній ріст у різній мірі залежить від забезпечення екзогенними регуляторами росту.

За відмінністю в потребі в екзогенних ауксинах і цитокінінах виділяють кілька груп тканин:

1) тканини, які ростуть на середовищах з ауксинами;

2) тканини, для росту яких у складі середовища потрібні тільки цитокініни;

3) тканини, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни.

До першої групи тканин належать експлантати бульби топінамбура, коренів цикорію і скорцени. Ріст тканини топінамбура прямо пропорційний від’ємному логарифму концентрації ауксину в середовищі, у зв’язку з цим ця тканина використовується для дослідження ауксинової активності природних рослинних екстрактів або нових синтезованих сполук.

Тканин, які ростуть при наявності в середовищі цитокініну, не багато. До них належать культура кінчика кореня турнепса і сім’ядолей сої. Тканину сої використовують для дослідження цитокінінової активності.

Найчисельнішою є третя група тканин, для росту яких в умовах *in vitro* в середовищі необхідні і ауксини, і цитокініни.

Із ауксинів для отримання і підтримання культури тканин найбільше використовуються β–індолілоцтова кислота (ІОК), α–нафтилоцтова

кислота (НОК) і 2,4–дихлорфеноксіоцтова кислота (2,4-Д) у концентраціях 1–30 мг/л, 0,1–2 мг/л, 1 мг/л відповідно. Для індукції калюсоутворення звичайно використовують 2,4-Д, яка у 300 разів активніша, ніж ІОК і у 10 разів активніша, ніж НОК. Для індукції калюсоутворення звичайно використовують високі концентрації ауксинів, а при наступних пересадках тканина може рости при вмісті ауксинів у 10 разів меншому.

Для отримання калюсних культур дводольних рослин в середовища додається ІОК в концентраціях 1–10 мг/л. При наступних пересадках концентрацію зменшують до 0,1–0,05 мг/л. Для отримання калюсу однодольних рослин використовуються досить високі дози 2,4–Д – 2–10 мг/л. Винятком є тканина ендосперму кукурудзи, яка здатна до автономного синтезу ауксину і росте на середовищі без регуляторів росту.

Цитокініни, а саме кінетин, були відкриті Скугом при вивченні росту калюсу тютюну. Встановлено, що він не тільки активує клітинні поділи, але є обов'язковим компонентом індукування органогенезу. Кінетин значно підвищує ріст багатьох калюсних культур, наприклад моркви, сої, топінамбура. Кінетин вводиться в середовище у концентраціях 0,001–10 мг/л.

Крім кінетину для культивування ізольованих рослинних тканин використовують і інші цитокініни, зокрема, бензиламінопурин (БАП) і зеатин, які мають більш високу активність підтримки росту та індукції органогенезу. Є дані, що високі концентрації кінетину (0,1–1 мг/л) можуть забезпечити ріст ауксин незалежних калюсних тканин.

Цитокініни разом з ауксинами беруть участь в процесах органогенезу у рослин. Для закладення у калюсі коренів або пагонів необхідні певні концентрації і співвідношення цитокініну і ауксину.

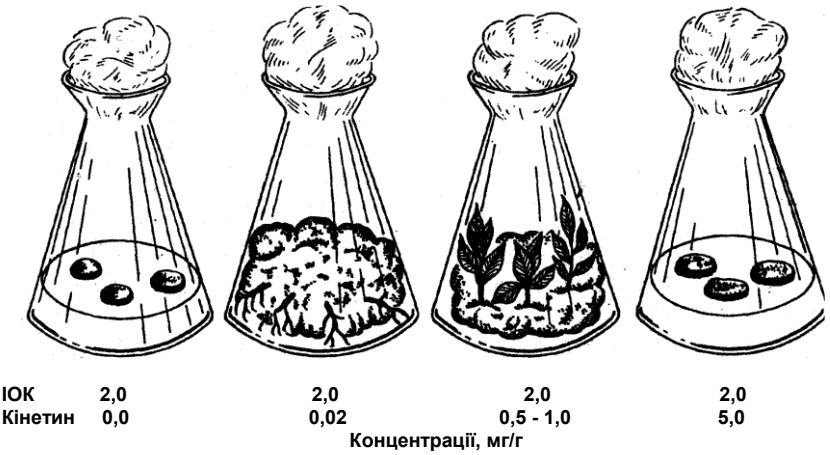



***Схема спільної дії ІОК та кінетину на органогенез калюсу тютюну.***

Для диференціації коренів у калюсі тютюну необхідно 2 мг/л ІОК і 0,02 мг/л кінетину (100:1). Підвищення концентрації кінетину до 0,5–1 мг/л індукує формування стеблових бруньок. Таким чином, зміщення співвідношення концентрацій ауксин-цитокінін в бік цитокініну сприяє утворенню стеблових бруньок, а в бік ауксину – закладанню коренів. Однак, як правило, і для індукції коренеутворення необхідна наявність цитокініну в низьких концентраціях.

Таким чином, ауксини додають для індукції клітинного поділу і диференціації; вони активують утворення коренів, регулюють регенерацію пагона. Цитокініни активують і прискорюють процес дедиференціації, клітинного поділу, калюсоутворення, активують диференціацію стеблових бруньок.

Гібереліни, як правило, не є необхідними для росту клітин у культурі, але Стюард і Стріт (1971) вказують, що при низький густині клітин явора у суспензії гібереліни необхідні. Крім цього гібереліни активують ріст і витягування стебла, тобто сприяють отриманню рослин з потужною надземною частиною.

**pH – СЕРЕДОВИЩА.** Відомо, що рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації іонів водню. Відносна стабільність величини pH у внутрішньому і оточуючому клітину середовищах підтримується буферними системами, в яких найважливішу роль виконують білкові молекули як амфоліти. Ці особливості варто враховувати і при вирощуванні клітин тканин *in vitro*, бо до складу живильних середовищ входить ряд складних або активних компонентів, поглинання і функціонування яких залежить від міри протонізації всередині клітини і в оточуючому середовищі. Тому відносну стабілізацію pH середовища необхідно підтримувати введенням в нього хелатованих сполук або відповідних буферів. Стійкість і засвоєння цілого ряду компонентів живильного середовища залежить від величини pH. Найбільш чутливі до pH такі компоненти середовища: ІОК, $ГА_3$, вітаміни ($B_1$, пантотенова кислота). При низьких значеннях pH не відбувається желатинування агар-агару. Від pH середовища залежить доступність для тканин різних форм заліза.

Більшість культур ростуть на середовищах з pH 5,5–5,8. Звичайно pH готового середовища встановлюється за допомогою 10 % або 1 N розчину KOH або NaOH, або 1 N HCl перед автоклавуванням. Однак, слід враховувати, що під час автоклавування pH середовища змінюється, а саме

зменшується в результаті утворення цукрових кислот.

Особлива увага надається встановленню оптимального pH в суспензійних культурах, так як останні здатні змінювати його значення за рахунок метаболітів, що вони виділяють в живильне середовище. Можливо, у зв'язку з цим культура тканин арахісу здатна рости на середовищах з pH від 3,4 до 8,2 (оптимальне значення 6,4), а клітини кореня сої – на середовищах з pH від 4,5–5,5.

Тканини деяких рослин при культивуванні *in vitro* виділяють в середовище фенольні сполуки. Середовище швидко темніє і тканина відмирає. Щоб запобігти цьому необхідно додавати в середовище активоване вугілля (1-2 г/л).

***Завдання***

1. Показати схематично будову основних представників природних і синтетичних ауксинів, дати їм визначення.
2. Показати схематично будову гібереліновоі кислоти, дати визначення.
3. Показати схематично будову типових цитокінінів, дати їм визначення.
4. Показати схематично будову абсцизової кислоти, дати визначення.
5. Охарактеризувати жасмінову кислоту, як фітогормон.
6. Охарактеризувати саліцилову кислоту, як фітогормон.
7. Охарактеризувати олігосахариди, як фітогормон.
8. Охарактеризувати інгібітор цвітіння BEHD.
9. На які групи розділяють рослинні тканини за потребою у фітогормонах?
10. Як впливає співвідношення ауксин:цитокінін на процеси органогенезу?
11. Які оптимальні межі pH для більшості рослинних культур?
12. Які типи культур особливо чутливі до значення pH?
13. У яких випадках до складу поживного середовища додається активоване вугілля?

# ТЕМА 3: ЖИВЛЕННЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН, ТКАНИН І ОРГАНІВ РОСЛИН

***Мета:*** вивчення живильного середовища для вирощування рослинних клітин, тканин і органів

## *Теоретична частина*

Живильне середовище для вирощування рослинних тканин і клітин, по аналогії з середовищем для культивування тканин тварин мало б містити все те, що тканини в рослинному організмі отримують від ксилемного та флоемного току речовин. Однак, на практиці з'ясувалося, що рослинні соки не можуть слугувати повноцінним живильним середовищем для вирощування ізольованих тканин і клітин. У цьому проявляється специфіка надходження, транспортування і особливо перерозподілу поживних речовин у рослині.

Основою для підбору різних середовищ для культури рослинних тканин стали живильні розчини, які використовували при вирощуванні цілих рослин. Основоположники методу Р.Готре і Ф.Уайт використали живильну суміш Кнопа і розчин Успенських відповідно. Ці розчини були доповнені цукрами, мікроелементами, вітамінами. Р.Готре, крім того, зменшив вдвічі концентрацію мінеральних солей вихідного розчину Кнопа. Середовище Ф.Уайта, створене ним у 1943 році на основі розчину Успенських, використовувалось спочатку для вирощування культури ізольованих коренів, а потім без змін – для вирощування рослинних тканин.

З розвитком методу культури тканин і введенням в культуру все нових і нових тканин рослин різних видів виникла необхідність зміни складу живильних середовищ. Найбільш повне дослідження мінерального живлення тканин було проведене Р.Хеллером у 1953 році. Щоб досягти точності роботи, він відмовився від використання твердих агарових середовищ і вирощував тканини лише на рідких живильних середовищах. Р.Хеллер детально дослідив значення окремих іонів для живлення тканин і вплив їх виключення зі складу середовища на подальший ріст тканини при пересаджуваннях. Він запропонував живильне середовище, склад якого суттєво відрізнявся від середовищ, які використовували для цілих рослин, так і від середовищ, які використовували раніше для культивування ізольованих тканин. Це середовище дуже багате на $K^+$ і $P^+$. Р.Хеллер запропонував також новий склад суміші мікроелементів.

Таблиця 1

**Склад живильних середовищ для культивування ізольованих тканин рослин**

| Компоненти середовища | Концентрація, мг/л | | |
|---|---|---|---|
| | Гамборга та Евелега | Мурасиге і Скуга | Уайта |
| Макросолі | | | |
| $NH_4NO_3$ | | 1650 | |
| $KNO_3$ | 2500 | 1900 | 80 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 150 | 440 | |
| $Ca(NO_3)_2$ безводний | | | 200 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 250 | 370 | 360 |
| $KH_2PO_4$ | | 170 | |
| KCl | | | 65 |
| $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ | 169,6 | | 18,7 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 134 | | |
| $Na_2SO_4$ | | | 200 |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 28,0 | 27,8 | |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | | 37,3 | |
| $Fe_2(SO_4)_3$ | | | 2,5 |
| Мікросолі | | | |
| $H_3BO_3$ | 3,0 | 6,2 | 1,5 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 2,0 | 8,6 | 3,0 |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,02 |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,025 | 0,025 | |
| KI | 0,75 | 0,83 | 0,75 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,25 | 0,25 | 0,0025 |
| $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 13,2 | 22,3 | 7,0 |
| Вітаміни | | | |
| Мезоінозит | 100,0 | 100,0 | |
| Гліцин | | 2,0 | 3,0 |
| РР | 1,0 | 0,50 | 0,5 |
| $B_1$ | 10,0 | 0,10 | 0,1 |
| $B_6$ | 1,0 | 0,5 | 0,1 |
| Стимулятори росту | | | |
| ІОК | | 2,0 | |
| 2,4-Д | 2,0 | | |
| Кінетин | | 0,2 | |
| Вуглеводи | | | |
| Сахароза | 20000 | 30000 | 20000 |
| Агар | 7000 | 8000 | 7000 |
| pH | 5,5 | | 5,6-5,8 |

В результаті ряду досліджень уточнювались вимоги тканин до джерел вуглеводного живлення, вітамінів і фізіологічно активних речовин.

Зараз уже розроблено значну кількість живильних середовищ для культивування *in vitro* органів, тканин і клітин рослин, більшість з них є модифікаціями основних живильних середовищ (Уайта, Гамборга, Мурасиге і Скуга) (табл. 1). До складу будь-якого живильного середовища для вирощування культури ізольованої рослинної тканини входять слідуючі групи речовин:

– мінеральні солі – макро- і мікроелементи;

– вуглеводи;

– вітаміни;

– амінокислоти;

– стимулятори росту – синтетичного і натурального походження;

– вода;

– агар.

У зв'язку з необхідністю змінювати склад живильного середовища під час пошуку оптимуму для нової, ще невипробуваної в культурі, тканини варто зупинитися на характеристиці особливостей живлення ізольованих тканин.

**Макроелементи**

***Азот*** – один з найважливіших елементів, необхідних для нормального росту і розвитку рослин. Азот входить до складу амінокислот (білків), нуклеїнових кислот, пігментів (хлорофіли), алкалоїдів, гормонів та інших органічних сполук. У живильних середовищах основними джерелами азоту є амонійні ($NH_4^+$) і нітратні ($NO_3^-$) форми, хоча відомо, що деякі культури можуть використовувати азот, який міститься в амінокислотах. Згідно дослідженням Т.Ардітті, практично всі амінокислоти, які входять до складу живильних середовищ, як і сечовина, можуть бути додатковим джерелом азоту для проростаючого насіння. Процеси розпаду азотовмісних сполук у рослинних клітинах завершуються утворенням аміаку, який реутилізується (повторно використовується рослиною).

При дефіциті азоту спостерігається хлороз листків, пригнічення росту й уповільнення загальних темпів розвитку рослини. Встановлено, що в асептичних умовах невеликий надлишок азоту хоча й підтримує інтенсивний ріст рослин, але пригнічує розвиток генеративних органів.

***Фосфор.*** У рослинних тканинах фосфор входить до складу

нуклеїнових кислот, білків, фосфоліпідів, фосфорних ефірів цукрів, нуклеотидів, фітину й інших сполук. Основна сполука, у вигляді якої запасається фосфор – фітинова (міо-інозитгексафосфорна) кислота. Крім органічної форми фосфор міститься у рослинних клітинах у вигляді ортофосфорної кислоти ($H_3PO_4$) та її солей. Тризамісні солі ортофосфорної кислоти малорозчинні у воді і майже недоступні для рослин. Дво- і особливо однозаміщені кальцієві і магнієві солі ортофосфорної кислоти чи солі калію, натрію й амонію добре розчиняються у воді й поглинаються кореневою системою рослин. У вигляді універсальних хімічних сполук фосфор приймає безпосередню участь у внутрішньоклітинних енергетичних перетвореннях як у рослинному, так і тваринному організмах. Унікальна функція фосфору – його участь у фосфорилюванні білків за допомогою ферментів протеїнокіназ. Фосфор зазвичай додають до живильних середовищ у вигляді однозаміщених фосфату калію ($KH_2PO_4$) або фосфату натрію ($NaH_2PO_4$).

На ранніх етапах розвитку, особливо в асептичних умовах, сіянці й рослини-регенеранти найбільш чутливі до нестачі фосфору. Особливо фосфор накопичується у швидкоростучих тканинах (меристемах), у клітинах яких інтенсивно протікають метаболічні процеси. Візуальними ознаками нестачі фосфору є пурпурний відтінок вегетативних органів і уповільнений ріст рослин.

***Калій*** — головний потенціалоутворюючий іон в процесах електрогенезу рослинної клітини. Концентрація калію у вакуолі клітини (клітинний сік) значно вища, ніж в живильному середовищі. Тому в частинах рослин, безпосередньо контактуючих з живильним середовищем, функціонує потужна система іонних насосів, яка підтримує градієнт його концентрації на належному рівні. У тканинах рослин калій знаходиться в основному в іонній формі, має дуже високі рухливість і здатність до реутилізації. На сьогодні відомо більше 60 ферментів, для нормального функціонування яких необхідні іони калію. Калій впливає на водний потенціал рослинних клітин і відіграє важливу роль у процесах поглинання й транспорту води по рослині. Він необхідний для підтримання процесів оптимального росту і розвитку рослин, прямо чи опосередковано беручи участь в біосинтезі основних класів органічних сполук.

До складу живильних середовищ калій вносять у вигляді нітрату ($KNO_3$), фосфату ($KH_2PO_4$) або хлориду калію (KCl). При нестачі калію

гальмуються процеси поділу й розтягнення клітин, що призводить до утворення розеткових форм рослин. Пригнічується також прояв домінуючого ефекту апікальної бруньки та інтенсивність фотосинтетичних процесів, насамперед, внаслідок зниження швидкості відтоку утворених фотоасимілятів. Дефіцит калію візуально проявляється у вигляді плямистості або зміни морфології листків (скручування, рваний край).

***Кальцій*** відіграє важливу роль у метаболізмі клітин, шляхом зв'язування побічних токсичних продуктів білкового обміну у вигляді солей щавлевої кислоти - оксалату кальцію ($Ca_2C_2O_4$). У формі пектинату кальцію входить до складу клітинних стінок (мембран), що підвищує їх проникність і сприяє транспорту вуглеводів і амінокислот по рослині. Як вторинний посередник, кальцій має також важливе значення для процесів клітинної сигналізації.

До складу живильних середовищ кальцій вводиться у вигляді хлориду кальцію ($CaCl_2$), нітрату кальцію ($Ca(NO_3)_2$) або складного фосфату кальцію ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). При складанні живильних середовищ необхідно враховувати біоекологічні особливості досліджуваного рослинного об'єкта, оскільки відомо, що рослини по відношенню до солей кальцію умовно поділяються на три групи: кальцієфіли, кальцієфоби і нейтральні види. Разом з тим встановлено, що дводольні рослини містять у своїх тканинах значно більше цього елемента, чим однодольні. Кальцій не реутилізується, а накопичується в старих тканинах рослин. Тестувати нестачу того чи іншого мінерального елемента в культурі *in vitro* (у тому числі й кальцію) візуально досить проблематично, оскільки в асептичних умовах значно змінюється морфологія рослин. При створенні фізіологічно врівноваженого іонного складу середовища, кальцій, як правило, виступає в ролі іонного баласту, тому його нестача *in vitro* зустрічається досить рідко. Однак при довготривалому культивуванні відбувається закислення живильних середовищ і доступність кальцію може суттєво знижуватись. При дефіциті кальцію різко зростає текучість мембран, що призводить до порушення процесів мембранного транспорту і біоелектрогенезу, відбуваються пригнічення процесів поділу і розтягнення клітин та коренеутворення.

Візуальною ознакою нестачі кальцію в асептичній культурі можуть бути відмерлі кінчики коріння і верхівки пагонів. Спостерігається також деформація форми листкових пластинок: їх кінчики спочатку біліють, а потім відмирають.

***Сірка*** вводиться до складу живильних середовищ у вигляді сульфатів різних елементів і поглинається кореневою системою рослин тільки в окисленій формі (у вигляді іона $SO_4$). В основному сірка транспортується в надземні, зелені частини рослин і підтримує нормальний розвиток кореневої системи. У рослинних тканинах сірка знаходиться як в окисленій, так і у відновленій формах. Сульфатгідрильні групи входять до складу амінокислот (цистин, цистеїн, метіонін), вітамінів (ліпоєва кислота, біотин, тіамін), ліпідів, коферменту А. Однією з найважливіших функцій сірки в рослинному організмі є формування третинної структури білків, шляхом утворення ковалентних зв'язків дисульфідних містків між залишками цистеїну.

При відсутності сірки гальмуються процеси росту й розвитку рослин, фотосинтезу, синтезу білків та ін. Як і кальцій, сірка не реутилізується і може в значній кількості накопичуватись в старіючих частинах рослин.

***Магній*** додають до живильних середовищ у вигляді сульфату ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Магній входить до складу молекул хлорофілу, який надає зеленого забарвлення рослинам. У насінні більша частина магнію знаходиться у вигляді фітину. Участь магнію в процесі обміну речовин пов’язана з його здатністю регулювати роботу низки ферментів: він є кофактором майже всіх ферментів, які каталізують перенесення фосфатних груп, а також необхідний для функціональної діяльності ферментів гліколізу, циклу Кребса, спиртового й молочнокислого бродіння. При підвищеній концентрації магнію в рослинних клітинах активуються ферменти, які беруть участь в метаболізмі фосфату, що призводить до зростання вмісту в тканинах органічних і неорганічних сполук фосфору. Магнієве голодування в першу чергу позначається на фосфорному обміні, а отже і на загальній енергетиці рослини, структурі пластид та спричинює порушення в біосинтезі білка. При його нестачі спостерігається хлороз листків.

***Кремній*** в рослинних організмах використовується в основному як будівельний матеріал для клітинних стінок, забезпечуючи їх міцність і еластичність. Хоча кремній практично ніколи не вводиться до складу живильних середовищ, його відсутність може призводити до порушень в структурі органоїдів клітини.

**Мікроелементи**

***Залізо*** в рослинних тканинах часто міститься у досить високій

концентрації, внаслідок чого його відносять до групи макроелементів. Однак функції, властиві цьому хімічному елементу у вищих рослинах більшою мірою характерні для мікроелементів. До складу білкових молекул залізо може входити як у гемовій (цитохроми, пероксидаза, каталаза), так і в негемовій (у складі залізовмісних кластерів) формах. Залізо бере участь у біосинтезі хлорофілу і функціонуванні основних елементів електрон-транспортних ланцюгів дихання і фотосинтезу при переході із тривалентної форми у двовалентну. Основна маса заліза запасається в хлоропластах у вигляді особливої форми фосфопротеїду – фітоферитину, який проявляє здатність до переміщення по рослині.

При його нестачі на молодих листкових пластинках з'являються ознаки хлорозу, особливо між жилками листка. До складу живильних середовищ залізо зазвичай вносять у формі сульфату ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$). Для оптимізації доступності заліза для рослин, його вводять разом з $Na_2$ЕДТА ($C_{10}H_{16}N_2O_8Na_2 \cdot H_2O$).

***Мідь.*** В живильні середовища мідь додають в основному у вигляді сульфату ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Для більшості культур мідь необхідна в концентраціях 0,025-0,020 мг/л. Як і залізо, вона зв'язується з ферментами і бере участь в окиснювально-відновних перетвореннях обміну речовин. Майже половина міді, яка знаходиться в тканинах рослин концентрується в хлоропластах у вигляді пластоціаніну. Крім того, мідь входить до складу деяких рослинних ферментів (аскорбатоксидази, поліфенолоксидази, супероксиддисмутази, цитохром-оксидаза), бере участь у біосинтезі пігментів та в енергетичних процесах клітин, переходячи з одновалентного стану у двовалентний.

При нестачі міді знижується ефективність процесів дихання та фотосинтезу, порушується лігніфікація клітинних оболонок, уповільнюється ріст рослин і спостерігаються відхилення в їх морфологічному розвитку. Вони набувають темно-зеленого забарвлення із подальшим розвитком некрозів, хлорозу кінчиків листків, відмирання апексів пагонів і втрати тургору.

***Цинк*** додають до живильних середовищ у вигляді сульфату ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Як кофермент, бере участь в біосинтезі хлорофілів і деяких ауксинів, зокрема, триптофану – попередника ІОК. Нестача цинку візуально проявляється в зміні кольору листкових пластинок (вони набувають жовтуватого відтінку) і порушенні нормального розвитку кореневої системи. Надлишок цинку токсичний для рослин.

***Марганець*** входить до складу міжгранних і гранильних тилакоїдів мембран хлоропластів. В складі одного з поліпептидів бере участь у фотолізі води. Крім того, марганець є складовою частиною каталітичного центру ферменту супероксиддисмутази і сприяє детоксикації активних форм кисню. Відомо більше 30 ферментів, для активування яких необхідні іони $Mn^{2+}$.

При нестачі марганцю істотно знижується виділення кисню в процесі фотосинтезу, пригнічується біосинтез вуглеводів у тканинах рослин, на листках між жилками з'являються ознаки хлорозу. У живильні середовища марганець додають у вигляді кристалогідрату сульфату ($MnSO_4 \cdot H_2O$).

***Бор*** – один з найважливіших мікроелементів. У рослинних тканинах перебуває у вільній формі сполук $B(OH)_3$, $B(OH)_4$ та у вигляді комплексів з органічними сполуками. Зокрема в клітинах зв'язується з полісахаридами клітинних стінок. На відміну від інших мікроелементів бор не є компонентом або активатором ферментів, проте бере участь у метаболізмі фенолів, вуглеводів, гормонів, нуклеїнових кислот, азотному та ауксиновому обмінах, у формуванні структури клітинних стінок, поділі клітин, регулює процеси росту й розвитку рослин, транспорту води, підсилює ріст пилкових трубок. Бор необхідний для дводольних рослин протягом всього процесу онтогенезу, тоді як для однодольних - головним чином в репродуктивну фазу.

До культуральних середовищ додають у вигляді борної кислоти ($H_3BO_3$). Дефіцит бору проявляється у відмиранні апікальних меристем, деформації та хлорозі листкових пластинок, порушенні анатомічної будови осьових органів рослин. Надлишок бору токсичний і може викликати загибель рослин.

***Кобальт*** в рослинному організмі може перебувати в іонній формі і у вигляді порфіринової сполуки цианокобаламіну (вітамін $B_{12}$). Рослини не проявляють здатності до синтезу вітаміну $B_{12}$, тому кобальт вводять в живильні середовища екзогенно у вигляді кристалогідрату ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$). Симптоми нестачі кобальту подібні до симптомів азотного голодування.

***Хлор*** засвоюється рослинами у невеликій кількості. До складу живильних середовищ хлор вводиться у вигляді хлориду кальцію ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$). Крім того хлор може потрапляти у вигляді домішок до інших мінеральних солей. Хлор необхідний для процесів фотосинтезу (фотолізу води) і підтримання нормального росту рослин, шляхом регулювання

осмотичного тиску. Деякі культури рослин дуже чутливі до наявності іонів хлору в живильному середовищі. При дефіциті хлору листки в'януть, листкові пластинки жовтіють. Стійка нестача, як і надлишок цього елемента, є летальними для рослин.

***Йод*** додають до культуральних середовищ у вигляді йодиду калію (KI). Входить до складу деяких амінокислот. Необхідний для рослин у слідових кількостях.

**Органічні сполуки**

Основні класи органічних сполук - це вуглеводи, білки, гормони, жири, вітаміни та ін., які перебувають в стані газу, рідини або твердої субстанції. Органічні молекули переважно нерозчинні у воді, не проводять електричного струму. Більшість органічних сполук здатна до горіння, хоча в хімічні реакції вони вступають досить повільно.

Рослини - єдині на нашій планеті автотрофні організми, які синтезують органічні сполуки з неорганічних і не проявляють потреби в готових органічних сполуках *in situ* (хоча у випадку наявності в середовищі можуть їх засвоювати).

Однак в умовах асептичної культури, після вичленення з цілої рослини окремих груп тканин або окремих клітин для вирощування на штучних живильних середовищах, як правило, вони не синтезують всіх органічних сполук, необхідних для нормальної життєдіяльності організму. Тому органічні речовини є обов'язковими компонентами культуральних середовищ.

**Вуглеводи.** До групи вуглеводів відносяться органічні сполуки, які найчастіше зустрічаються в тканинах рослин – моно-, дисахариди, крохмаль, целюлоза та ін. Вуглеводи майже повністю складаються з вуглецю, водню і кисню - первинних хімічних елементів, які в достатній кількості знаходяться у навколишньому середовищі (діоксид вуглецю, вода). Метаболізм вуглеводів займає найважливіше місце в основному обміні речовин вищих рослин. Тому різні форми вуглеводів є обов'язковою і необхідною складовою живильних середовищ в культурі *in vitro*, впливаючи безпосередньо на процес накопичення біомаси культури. Проте взаємозв'язок процесу росту культури із вуглеводним метаболізмом значно глибший і складніший, і для розробки основ раціонального культивування ізольованих тканин (як в експерименті, так і на практиці) необхідно опановувати шляхи метаболізму вуглеводів, їх контролю й регулювання.

Найбільш ефективним джерелом вуглецю для культур клітин і тканин рослин найчастіше слугує сахароза. Взаємоперетворення глюкози, фруктози й сахарози забезпечує залучення кожного із цих головних для росту ізольованих культур компонентів в основні метаболічні процеси – гліколітичний і пентозофосфатний, всі етапи яких натепер детально досліджені й описані. Загалом, перший шлях більше відповідає високим енергетичним затратам, а другий – синтетичним запитам.

***Сахароза*** - дисахарид, найбільш поширений в рослинних тканинах. Низка структурних особливостей сахарози, що забезпечує високий енергетичний потенціал молекули й захищеність її головних реакційно-здатних зв'язків (подвійний глюкозид), і є тією основою, яка визначає особливе положення сахарози. Сахароза складається із двох хімічно пов'язаних моноз, β-фруктози і α-глюкози. Це основний енергетичний матеріал рослин, що використовується як джерело енергії для протікання будь-яких енергозалежних процесів, оскільки є будівельним матеріалом. Сахароза синтезується в цитоплазмі клітин мезофілу листка рослин в процесі фотосинтезу, і є основним транспортним вуглеводом, який переміщується по ситовидних трубках флоеми. Ключовим регуляторним ферментом біосинтезу сахарози в листках є сахарозофосфатсинтаза, яка значною мірою визначає і формування її транспортного фонду. Частина утвореної сахарози за допомогою ферменту сахарозосинтази легко гідролізується з утворенням глюкози і фруктози, які використовуються в різних метаболічних процесах рослини.

Рослинні культури не можуть синтезувати *in vitro* необхідну для їх нормального розвитку кількість вуглеводів, тому в культуральні середовища сахарозу додають в концентрації 20-30 г/л, що рекомендовано для більшості прописів живильних середовищ. Відомо, що змінюючи рівень сахарози, можна істотно впливати на характер морфоутворювального процесу, особливо при взаємодії з регуляторами росту. Більш того, наявність сахарози (або інших її похідних) у середовищі необхідна для укорінення рослин-регенерантів, оскільки при її відсутності навіть за наявності ІМК процес ризогенезу в більшості культур істотно уповільнюється або припиняється. Для більшості живильних середовищ у культурі тканин використовують сахарозу, одержану з цукрової тростини *(Saccharum officinanim* L.*)* або цукрового буряка *(Beta vulgaris* L.*),* які є 100% чистою її формою.

Виділено три основні аспекти використання вуглеводів у культурі

рослинних тканин:

- якісний склад цукрів;
- кількість цукрів, що додають у живильні середовища;
- транспорт вуглеводів в рослині.

Для більшості культур найбільш ефективний ріст спостерігається на середовищах із глюкозою або фруктозою. Дисахариди, що складаються тільки із глюкозних субодиниць - мальтоз, целобіоз, трегалоз, здебільшого також успішно використовуються, як сахароза і глюкоза. Це пов'язано, ймовірно, з високою активністю відповідних ферментів гідролаз, швидкість розщеплення яких перевищує швидкість метаболізації глюкози. У деяких випадках підвищення концентрації сахарози сприяє утворенню вторинних сполук.

Дисахариди, до складу яких крім глюкози входить і галактоза (лактоза й мелібіоза), використовуються лише деякими видами рослин однаковою мірою із сахарозою, тоді як більшість культур не виявляє ознак росту з даними субстанціями. Це свідчить про великі можливості вуглеводного обміну ізольованих культур, здатного включати навіть ті сполуки (наприклад, лактозу), з якими в інтактному стані рослини не зустрічаються. Більш рівномірно розподіляються культури різних видів рослин за здатністю використовувати для росту трисахарид рафінозу, що містить крім галактозної одиниці іще глюкозну і фруктозну, та на відміну від лактози є метаболітом деяких рослин.

Необхідно зазначити, що культури різних видів рослин досить рівномірно розподіляються за здатністю до використання крохмалю. Досить ефективним джерелом вуглецевого живлення крохмаль виявився, в основному, для злаків. У культур родини розоцвітих на середовищі із крохмалем ріст відсутній.

Меншою мірою досліджено вплив інших груп вуглеводів. Зокрема, більша частина вивчених культур нездатна до росту на середовищах із цукроспиртами (сорбітом або манітом), пентозами (рибозою, арабінозою або ксилозою), дезоксигексозою (рамнозою). Лише деякі види рослин (в тім числі й троянда) уповільнено ростуть на пентозах. Однак максимальне накопичення біомаси в них є в декілька разів нижчим, ніж при використанні сахарози. При створенні живильних середовищ використовуються багатоатомні спирти, які утворюються в рослинах шляхом відновлення моноцукрів, зокрема їх альдо- і кетогруп. Найбільш поширені в рослинах сорбіт, манніт, дульцит (галактит).

***D-маннiт*** - цукровий етиловий спирт, який утворюється в рослинах при відновленні маннози або фруктози. Використовується як живильний субстрат або як речовина, що змінює осмотичний тиск, особливо при стимулюванні формування та злитті протопластів.

***Сорбiт*** широко розповсюджений в рослинах, біосинтез якого відбувається при відновленні фруктози або глюкози. Міститься в основному в плодах. Вперше був виділений із плодів горобини. Іноді додається до культуральних середовищ.

Відомо, що манніт успішно використовується при культивуванні ясеня, сорбіт – деяких видів розоцвітих, крохмаль - злаків. Культури рослин інших родин не проявляють здатності до росту при внесенні цих вуглеводів в живильні середовища або використовують їх значно меншою мірою, що засвідчує про збереження в ізольованих культурах деяких біохімічних особливостей вихідних рослин.

Культури, ізольовані з рослин одного виду або виділені із різних органів однієї рослини, можуть істотно відрізнятись за використанням різних джерел вуглецю. Більш того, одноклітинні клони або навіть вторинні одноклітинні клони дають широкий спектр реакції на окремі цукри. Тому клональна гетерогенність, спричинена мутаційною мінливістю, утруднює оцінку видової специфіки основного обміну, що відкриває нові можливості для дослідження метаболізму вуглеводів в культурі ізольованих тканин рослин (одержання біохімічних мутантів за тими або іншими ланками основного обміну).

Слід наголосити, що сахароза - найкраще джерело для росту ізольованих культур тканин рослин. Однак для багатьох досліджених культур оптимальна концентрація сахарози виявляється значно вищою, рекомендованої в стандартних прописах. Так, на 30 добу вирощування культури тканини одного з видів кактусових *Neomammillaria prolifera* Miller. максимальне накопичення сирої і сухої біомаси, спостерігалось на середовищі з внесенням 10% сахарози. Оптимальну для росту концентрацію сахарози можна підвищити шляхом збалансованої зміни співвідношення деяких компонентів живильного середовища, що успішно здійснюється при його оптимізації на основі методу математичного планування експерименту.

На збалансованих культуральних середовищах вихід біомаси пропорційний концентрації цукрі. Однак в разі використання їх підвищених концентрацій така закономірність порушується, внаслідок

виникнення високого осмотичного тиску. Тому ефективне використання сахарози, порівняно з іншими моносахаридами, може бути наслідком більш низького осмотичного тиску сахарозного середовища при однаковому вуглеводневому навантаженні.

**Вітаміни** – це досить гетерогенна група органічних сполук, життєво необхідних для нормального росту і розвитку рослинних тканин, наявність яких у живильних середовищах є доцільною в невеликих кількостях. Відсутність одного або декількох вітамінів може істотно позначитись на розвитку рослинного організму. Вітаміни до живильних середовищ почали додавати практично після відкриття методу клонального мікророзмноження. Проте встановлення дози того або іншого вітаміну і його необхідності для певних видів культур виявилось досить проблематичним, оскільки для приготування середовищ використовували недостатньо очищені компоненти (вуглеводи, агар-агар), які містили слідові кількості тих або інших сполук, у тім числі й вітамінів.

До комплексу вітамінів групи В, який містить важливі компоненти для обміну речовин і росту рослин, відносять цілий ряд сполук. Більшість цих вітамінів входить до складу дріжджового екстракту, що зазвичай раніше використовувався в культурі тканин in vitro. Натепер здебільшого компоненти цього комплексу ідентифіковані й для більш повного контролю над процесами росту і розвитку рослинних тканин їх рекомендується вносити окремо.

***Тіамін*** (вітамін $B_1$; $C_{12}H_{17}ClN_4OS$) рекомендований для більшості культуральних середовищ, оскільки він функціонує у формі пірофосфату як кофермент циклу трикарбонових кислот (цикл Кребса). До складу середовищ вводять у вигляді хлоргідрату тіаміну в концентраціях 0,1-0,4 мг/л. Встановлено, що тіамін в рослинному організмі синтезується головним чином в листках і відноситься до світлозалежного процесу. Молекула тіаміну складається із двох компонентів: перший із них є залишком піримідину, другий – половиною молекули тіазолу.

***Рибофлавін*** (вітамін $B_2$, вітамін G; $C_{17}H_{20}N_4O_6$) - активізує вуглеводний обмін і є важливим компонентом для клітинного дихання. Подібно до інших водорозчинних вітамінів рибофлавін може синтезуватись в рослинах, особливо на початкових етапах розвитку насіння. При додаванні в живильні середовища проявляє стійкість до автоклавування, але легко руйнується на світлі.

***Нікотинова кислота*** (вітамін $B_3$, вітамін Р, вітамін РР; $C_6H_5NO_2$) -

універсальна сполука, яка широко зустрічається як у тваринних, так і в рослинних організмах. Нікотинова кислота є попередником синтезу багатьох необхідних сполук у метаболізмі рослин. Однією із важливих функцій нікотинової кислоти є участь в синтезі НАДФ і НАФ. Для багатьох рослин шляхи її метаболізму сполучені із триптофаном, який у рослинних організмах є попередником ІОК. Нікотинова кислота в системі обміну речовин входить до складу коферментів, схильних проявляти активність в анаболічних реакціях. Вітамін В3 додають до багатьох культуральних середовищ в концентраціях від 0,1 до 10 мг/л. При внесенні в живильне середовище екзогенної нікотинової кислоти спостерігається поліфункціональний ефект: в одних випадках - позитивний ефект, в інших - негативний.

***Аденін*** (вітамін $B_4$, 6-амінопурин; $C_5H_5N_5$) - важливий для клітин рослин як складова частина нуклеїнових кислот (ДНК і РНК). У культурі тканин виявляє слабкий цитокініновий ефект. Зокрема, у концентрації 2-6 мг/л стимулює утворення вторинних протокормів у більшості тропікогенних орхідних. До складу живильних середовищ вводиться у вигляді сульфату аденіну ($AdSO_4$; $(C_5H_5N)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$) і використовується в основному як стимулятор адвентивного пагоноутворення.

***D-пантотенова кислота*** (вітамін $B_5$, $C_9H_{16}NO_5$) - водорозчинний вітамін, який є частиною молекули коензиму А. Введення вітаміну $B_5$ до складу культуральних середовищ не рекомендується на ранніх стадіях розвитку рослин-регенерантів, що зумовлено відсутністю ендогенних пантотенової кислоти і СоА. D-пантотенова кислота – це активний кофермент жирового обміну рослин. В середовища для культури рослинних тканин додається у вигляді солі кальцію ($(C_9H_{16}NO_5)_2Ca$) - термолабільної сполуки, яка вимагає проведення холодної стерилізації.

***Піридоксин*** (вітамін $B_6$, $C_8H_{11}NO_3$) також слугує коферментом деяких реакцій обміну речовин. До складу живильних середовищ зазвичай додається у формі хлоргідрату ($C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$). Вітаміну $B_6$ належить провідне місце в метаболізмі амінокислот. Він позитивно впливає на процеси проростання насіння і росту проростків, тому часто використовується як компонент живильних середовищ. Однак іноді спостерігається й зворотний ефект, що, вірогідно, пов'язано із супероптимальними (завищеними) концентраціями екзогенного піридоксину, який може накопичуватись в рослинах у фазі їх активного

росту, а, отже, і активного метаболізму амінокислот.

***Цианокобаламін*** (вітамін $B_{12}$, $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) іноді додають до живильних середовищ для інтенсифікації ростових і формоутворюючих процесів, є необхідним для росту пухлинних тканин. Приймає участь в синтезу пуринів і піримідинів.

***Фолієва кислота*** (вітамін $B_0$, вітамін М; $C_{19}H_{19}N_7O_6$) синтезується в листках та інших рослинних тканинах. Її дія подібна до інших вітамінів групи В. При взаємодії з молекулами ферментів набуває властивостей коферменту. Фолієва кислота обмежено застосовується в культурі рослинних тканин, зокрема може бути використана для укорінення рослин. Руйнується при автоклавуванні в кислих розчинах. В темряві уповільнює ріст тканин, на світлі стимулює. Стимулююча дія вітаміну пов'язана з утворенням при дії на неї світла пара-амінобензойної кислоти.

***Інозитол*** (*міо*-інозитол, мезо-інозит, $C_6H_{12}O_6$) – цукровий спирт комплексу вітамінів групи В. В тканинах рослин у формі фосфату входить до складу різних мембран, особливо таких органоїдів, як хлоропласти. Міститься в ендоспермі незрілого кокосу, бере участь у циклі синтезу поліуронідів (polyuronides). Інозитол є компонентом багатьох культуральних середовищ і синергістам активної фракції кокосового молока, сприяє розвитку рослин- регенерантів в концентрації 100 мг/л. Термостійкий та стійкий до дії світла.

***L-Аскорбінова кислота*** (вітамін С, $C_6H_8O_6$) - найбільш відома сполука із групи вітамінів, яка у вищих рослин синтезується з деяких вуглеводів (глюкози, галактози).

Приймає участь в окиснювально-відновних метаболічних процесах рослин. В складі живильних середовищ проявляє певні властивості дезінфікуючого засобу, однак використовується, головним чином, як потужний антиоксидант для запобігання фенольного окиснення рослин, що містять фенольні смоли. Разом з тим використання аскорбінової кислоти в живильних середовищах ускладнюється через її фізико-хімічні властивості, а саме здатність до повного розкладу при автоклавуванні середовища. Тому аскорбінову кислоту стерилізують через спеціальні мікрофільтри, або до середовища додають уже стерильну речовину, яку можна придбати в запаяних скляних ампулах. Вітамін С не рекомендується використовувати протягом тривалого часу, оскільки він безпосередньо може проявляти окиснювальну дію. Застосовується для запобігання утворення токсичних для тканин меланінів.

***Біотин*** (вітамін Н, $C_{10}H_{16}N_2O_3S$) - важливий для метаболізму жирів, білків і вуглеводів. Функціонально пов'язаний з метаболізмом жирних кислот, насамперед - з карбоксилюванням ферментів (ПВК-карбоксилази). Рідко використовується в культурі тканин *in vitro,* оскільки його дія недостатньо вивчена.

***Вітамін Т*** - це комплекс рістстимулюючих речовин, які в літературі відомі під назвами *tegotin, termitin, torutilin, temina,* фактор Т та ін. Структура його не встановлена. Однак висловлено припущення, що вітамін Т може складатись з декількох різних вітамінів. Наразі відомі роботи, в яких повідомляється про позитивний вплив вітаміну Т на проростки орхідних (*Cattleya, Dendrobium).*

***Вітамін К*** - антагоніст 2,4-Д в культурі тканин, тобто може знімати пригнічувальну дію високих концентрацій цієї речовини.

***Завдання***

1. Які групи речовин входять до складу живильного середовища для вирощування *in vitro* клітин, тканин та органів рослин?
2. Які основні джерела азоту використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі азоту.
3. Які основні джерела фосфору використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі фосфору.
4. Які основні джерела калію використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі калію.
5. Які основні джерела кальцію використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі кальцію.
6. Які основні джерела заліза використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі заліза.
7. Які основні джерела міді використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі міді.
8. Які основні джерела цинку використовують для культивування у живильних середовищах? Ознаки нестачі цинку.
9. Охарактеризувати основні вуглеводи, що входять до складу живильних середовищ.
10. Охарактеризувати основні вітаміни, що входять до складу живильних середовищ.

# ТЕМА 4: КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН, ТКАНИН І ОРГАНІВ РОСЛИН

***Мета:*** вивчення ізольованих рослинних клітин, тканин і органів

## *Теоретична частина*

*Культура ізольованих коренів* є зручним методом для вивчення впливу зовнішніх факторів, компонентів живильного середовища (макро- і мікроелементів, вуглеводів, фізіологічно активних речовин), токсичних елементів на їх ріст, для вивчення синтетичних функцій кореня, а також механізмів біосинтезу окремих речовин. Видільна функція коренів, яка проявляється у культурі, може бути використана для вивчення процесів взаємовпливу між коренями різних видів рослин, коренями і бульбочковими бактеріями, мікоризними грибами, бактеріями при спільному культивуванні.

Перші роботи по культивуванню ізольованих коренів були проведені Коте і Роббінсом у 1922 році. Тривалого культивування ізольованих коренів добився Уайт, а запропоноване ним у 1934 році середовище для культивування ізольованих коренів використовується і сьогодні.

Відносно невелика кількість видів рослин досліджена на здатність їхніх коренів рости в ізольованій культурі. Із класу голонасінних найбільше вивчені умови росту ізольованих коренів деяких видів сосни. Із інших деревних порід в ізольованій культурі успішно ростуть корені шовковиці, акації, ялини європейської, берези пухнастої, дуба черешчатого. До цього часу не вдалося виростити в безперервній культурі корені однодольних, за виключенням пшениці та жита.

В ізольованій культурі вирощують відрізки кінчиків коренів проростків, зародків непроростого насіння, адвентивні корені, що утворилися із калюсних культур, ділянки кореневих систем рослин. У останньому випадку корені невеликого діаметра спочатку стерилізують, а потім переносять в живильне середовище. Однак, так як тканини кореня легко пошкоджуються стерилізуючими сполуками, то загальноприйнятим способом є отримання коренів від проростків із простерилізованого насіння, вирощених в асептичних умовах.

Найчастіше ізольовані корені культивують на рідкому живильному середовищі у колбах об’ємом 100 мл, в які наливають 50 мл середовища.

Важливе значення для нормального росту ізольованих коренів має

температурний фактор, бо температура впливає на процеси клітинного поділу і росту розтягуванням. Для більшості коренів дводольних оптимальна температура в умовах *in vitro* становить 25°–27° С, а для коренів голонасінних – 18° – 20° С.

Іноді виникає потреба тривалого збереження культури коренів без пересадки. В таких випадках ватні пробки культуральних посудин обгортають тонкою поліетиленовою плівкою для зменшення випаровування середовища і поміщають у холодне приміщення з температурою 4°–5° С.

Корені томатів і люцерни при цій температурі зберігали свою життєздатність 7–10 місяців.

Як правило ізольовані корені вирощують у темряві. Світло впливає на них тільки під час пересадок. Але у ряді робіт показано значний вплив світла різної інтенсивності і різного спектрального складу на ріст і процеси обміну у коренях. Так, освітлення білим світлом у дослідах з коренями томатів стимулювало ріст головного кореня і інгібувало ріст бічних. Освітлення коренів сприяє синтезу в них ауксину. У дослідах з коренями люцерни та гірчиці білої встановлено, що синє світло сильніше інгібувало ріст, ніж червоне, проте під його впливом посилювався синтез аскорбінової кислоти і підвищувалась активність ІОК-оксидази. Щодо впливу червоного світла на формування і ріст бічних коренів, то припускають, що у цей процес включається фітохромна система тканин кореня, яка видозмінює мітотичну діяльність, що здійснюється при участі ІОК.

Для кількісного обліку росту кореневих культур використовують такі визначення: заміряють загальну довжину і щоденний приріст головного кореня, кількість і загальну довжину бічних коренів, вагу сирої і сухої речовини, біомасу коренів у одному культуральній посудині; об’єм кореневої системи, розмір клітин екзодерми тощо.

*Культура ізольованих листків* перспективна для вивчення тривалості їхнього життя, фізіології росту і розвитку в контрольованих умовах від становлення до завершення. Крім того, сегменти листка використовують для вивчення дії фізіологічно активних речовин, механізму переходу клітин до дедиференціації. Культура ізольованих листків використовується як метод для розмноження деяких видів рослин. Особливого значення культура ізольованих листків набула у зв’язку з розвитком методу виділення ізольованих протопластів.

Перші життєздатні культури листків були отримані для папоротей. Було виявлено, що у культурі ріст сповільнювався, а розвиток прискорювався, в результаті чого листки були менших розмірів, ніж *in vivo*. Зменшення розмірів листків, що культивуються було пов'язане головним чином зі зменшенням кількості, але не розміру клітин, що пов'язано з можливим усуненням впливу деяких речовин, які сприяють клітинному поділу.

На розвиток листків у культурі суттєвий вплив має вміст сахарози у середовищі:

- при низьких концентраціях формуються малі листки ювенільної морфології;

- при більш високих концентраціях формуються листки дорослого типу з виразною морфологічною складністю.

Залежно від цілей досліджень культивувати можна цілі листки (для розмноження), експлантати листків, листки апікальних бруньок. Перевагу слід надавати молодшим листкам або листкам з молодих рослин.

Експлантати листків більшості видів в умовах *in vitro* здатні до утворення калюсу і диференціації адвентивних бруньок, зародків, коренів. Шлях, по якому піде розвиток експлантата листка, залежить від співвідношення ауксинів та цитокінінів у живильному середовищі.

*Частини квітки* культивують з метою вивчення закономірностей їхнього розвитку, а також впливу факторів живильного середовища та інших умов, які індукують морфогенез. Як первинні експлантати в ізольованих умовах можна вирощувати цілі суцвіття, квіткові бруньки і окремі органи квітки (квітконіжки, пелюстки, квітколоже, маточка, чашолистики, пилок, пиляки). Результати, отримані при культивуванні різних органів квітки показали, що усі вони мають здатність до калюсоутворення та морфогенезу.

*Культура ізольованих зав'язей* перспективна для вивчення процесів запилення, впливу різних тканин квітки на розвиток зав'язі в плід. Перші дослідження розвитку зав'язей в ізольованій культурі пов'язані з іменем Ніча (1949, 1951). Він культивував квітки томатів, які запилювали за кілька днів до введення в культуру. Зав'язі ставали помітними через тиждень після посадки і поступово збільшувалися. Через 35 днів були червоні плоди, які за смаком нагадували звичайні томати. Більшість плодів мали життєздатне насіння, хоча його кількість була незначною. Якщо квітки ізолювали до запилення, то зав'язі формувалися лише на середовищі з

ауксином.

На сьогоднішній день в умовах культури вирощують тканини плодів цитрусових (лимона, апельсина, мандарина), яблука, груші, персика, айви, авокадо. Перспективним є використання суспензійних культур плодів для вивчення гормональної регуляції процесів дозрівання, біогенезу природних сполук.

Заслуговує на увагу властивість тканин деяких плодів накопичувати в умовах *in vitro* крохмаль і синтезувати метаболіти вторинного обміну. Так тканина зрілих плодів цитрусових *in vitro* здатна до синтезу флавоноїдів, глікозидів, ефірних олій. Властивість продукувати деякі ароматичні летючі сполуки характерна калюсній і суспензійним культурам яблука.

На сьогодні кількість видів плодів, що культивують *in vitro* залишається обмеженою і основна увага сконцентрована на визначенні джерел живлення для індукції проліферації.

*Культивування in vitro пилку і пиляків* дозволяє отримувати гаплоїдні рослини і калюсну тканину. Отримання гаплоїдних рослин на штучному живильному середовищі із ізольованих пиляків і пилку називають *андрогенезом*. Культивування *in vitro* пилку і пиляків має великий інтерес для генетики і селекції, так як у гаплоїдів простіше виявити і відібрати цінні мутації, а за допомогою колхіцину можна отримати повністю гомозиготні диплоїдні рослини. Крім цього пилкові зерна, які запрограмовані на утворення гамет, в умовах культури переключаються на процеси, які властиві вегетативній клітині. Завдяки цьому, культура пилку і пиляків використовується у фізіологічних і біохімічних дослідженнях. Інтенсивні дослідження в цьому напрямку сприяли тому, що для 247 видів рослин, які належать до 88 видів і 33 родин розроблені прийоми отримання гаплоїдів (методом ізольованого пилку і пиляків), 40 видів із них економічно важливі – пшениця, рис, кукурудза, ячмінь, люцерна, льон, перець, апельсин, виноград, яблуня, картопля та інші.

В умовах культури індукція до росту мікроспор і утворення ембріоїдів може відбуватися двома способами:

1) прямим ембріогенезом;

2) непрямим шляхом - через утворення калюсу і індукування в ньому ембріогенезу.

Прямого розвитку ембріоїдів із пилкових зерен досягли у чотирьох родів із родини *Solanaceae – Datura, Nicotiana, Atropa* і *Lucium.*

Для отримання гаплоїдної тканини рекомендують використовувати пиляки в момент першого мітозу або відразу після нього. Під час ізолювання пиляків ні в якому разі не можна їх травмувати, бо це може призвести до загибелі всього пиляка, і, крім того, калюс може утворитися не з пилку, а з соматичних диплоїдних клітин.

Важливо, щоб пиляки були взяті з відносно молодих рослин, бо у старих рослин на кінець цвітіння утворюються дрібні бутони, які містять пиляки з гетерогенною сумішшю мікроспор і багато пилку з дефектами.

При культивуванні пиляків тютюну та беладонни на простому середовищі без вітамінів і гормонів відбувається ембріогенез. А на середовищах з регуляторами росту індукується проліферація соматичних тканин в результаті чого утворюється суміш калюсів з різним рівнем плоїдності.

Позбавитися конкуруючого росту соматичних тканин можна культивуючи пилок. Цей метод дає можливість позбутися інгібіторів, які містяться у тканинах пиляка. Складнощі методу культивування пилкових зерен полягають в необхідності індукування перших поділів пилку *in vitro*. Найбільший ефект на цей процес має вплив на відокремлені від рослин бутони пониженою температурою (5°С) протягом $3^{x}$ днів. Крім того, встановлено, що для перших поділів пилку при ембріогенезі необхідна присутність ауксину.

Застосування техніки культивування пиляків та пилку дозволило китайським вченим за короткий строк вивести понад 80 сортів і ліній рису, високоврожайних (до 75 $ц/_{га}$), стійких до різних патогенних мікроорганізмів, з широким спектром адаптивності. За допомогою цього ж методу в Одесі було отримано 20 сортів пшениць та 2 сорти ячменю. Крім цього, отримані *in vitro* гаплоїди можна використовувати в роботах по генетичній інженерії і клітинній селекції. У деяких випадках для дослідів по генетичній трансформації зручніше використовувати пилкові зерна ніж протопласти.

*Культуру зародків* використовують для вивчення процесів формування зародка на материнській рослині, з'ясування причин і умов клітинного поділу, диференціації та морфогенезу. Відомо, що період ембріонального розвитку організму характеризується високою активністю процесів клітинного поділу і диференціації.

На самих ранніх етапах ембріогенезу відбуваються активні поділи зиготи без диференціації. На послідуючих етапах починається

диференціація. Клітини набувають здатності виконувати певну функцію, формується складний організм. Це неминуче супроводжується виникненням складної системи регуляторних механізмів, виникненням корелятивних зв'язків між ними. В основі складного процесу диференціації, морфогенезу, виникнення корелятивних зв'язків лежить зміна і регуляція активності генів на початкових етапах. Крім того, процеси ембріогенезу в нативних умовах зазнають впливу материнського організму. Цю залежність зародка від материнської рослини можна усунути відтворенням ембріогенезу в контрольованих умовах. Враховуючи це, метод вирощування ізольованих зародків ранніх етапів формування є єдиним із підходів, що дозволяє експериментально дослідити часову, послідовну реалізацію генетичної інформації, дію генів в ранній період індивідуального розвитку організму.

Всі дослідження з культури зародків *in vitro* варто розділити на дві групи.

В одних роботах в контрольованих умовах вирощували зрілі, в основному сформовані зародки, в інших – зародки на ранніх етапах ембріонального розвитку.

Дослідження по вирощуванню зрілих зародків, в основному, направлені на отримання дорослих рослин із абортивних зародків, несхожого в звичайних умовах насіння, отриманого в результаті віддаленої гібридизації.

За допомогою вирощування *in vitro* зародків насіння, що складно або довго проростає можна подолати період спокою і прискорити отримання дорослих рослин.

Вирощування в контрольованих умовах незрілих зародків допоможе дослідити первинні, елементарні процеси утворення біологічних структур, клітинного поділу і диференціації, органогенезу, морфогенезу. Особливо важливо здійснення і відтворення *in vitro* ембріогенезу, починаючи з перших поділів заплідненої яйцеклітини. Основна проблема, яка виникає при культивуванні незрілих зародків, пов'язана з пошуком шляхів збудження яйцеклітини до поділу.

*Культура ізольованих меристем* використовується для оздоровлення (звільнення від вірусів) та розмноження рослин. У фізіології та біохімії рослин культура *in vitro* апікальних меристем використовується головним чином, у дослідженнях морфогенезу.

Метод отримання безвірусних рослин із меристем базується на

спостереженнях Лімассе і Корнуе (1949), які встановили, що вміст вірусів у хворій рослині зменшується у напрямку до верхівки рослини, а власне меристема може бути цілком вільна від вірусної інфекції.

Меристемою звичайно називають тканину верхівки пагона розміром 0,1 мм – 1 см. Власне апікальну меристему – конус клітин, що активно діляться висотою 0,1 мм і шириною 0,25 мм складно виділити без пошкодження і індукувати до росту. У зв'язку з цим часто виділяють саму меристему і один або два листкових примордії. Рослинний матеріал для вичленення меристем доцільно брати із молодих проростків, новоутворених бруньок або молодих пагонів. Не варто використовувати меристеми із пагонів, які мають квітки.

На сьогодні практичні результати по оздоровленню рослин від вірусної інфекції отримані для картоплі, суниці, гвоздики, яблуні, черешні, шовковиці, смородини та ін. Найбільш детально розроблені умови культивування меристем картоплі.

Метод культури тканини меристем успішно використовують для прискореного розмноження рослин і масового виробництва посадкового матеріалу сільськогосподарських рослин, а також декоративних рослин, наприклад, орхідей.

Використання методу культури меристем для розмноження рослин набуває особливого значення у разі, коли звичайний спосіб вегетативного розмноження є тривалим процесом, а вихідний матеріал представляє цінність, як, наприклад, у орхідей. Розмноження орхідей поділом бульб – це повільний процес, розвиток повноцінної рослини потребує 10 років, а тому набуває значення метод розмноження орхідей за допомогою меристем, що культивуються *in vitro* (з 1965 року).

У орхідей апікальна меристема не розвивається у пагін, а формує *протокорми* – особливі ембріональні структури, які здатні до вегетативного розмноження. Так, кожний експлантат дає мінімум 2–3 протокорми через 4–6–8 тижнів, які протягом 4–5 тижнів розростаються. Після чого їх ділять і переносять на свіже середовище, де протягом 6–7 тижнів формуються пагони і корені. Сформовані рослини відділяють, а протокорми продовжують клонувати. Період розвитку від меристеми до пробірочної рослинки становить приблизно 20 тижнів.

Проте слід зазначити, що методика вегетативного розмноження *in vitro* з використанням культури меристем має певний недолік, який пов'язаний зі зменшенням генетичного різноманіття: оскільки всі рослини

даного виду походять із однієї меристеми, то нові хвороби можуть стати для них катастрофічними, так як ці рослини генетично ідентичні (або майже ідентичні) одна одній, і мають однакову чутливість до патогенних мікроорганізмів або паразитів. Тому, наряду з розвитком техніки масового розмноження необхідно створювати банки зародкової плазми (колекції насіння), для того щоб зберегти генотипи, які необхідні для підтримання генетичного різноманіття.

***Культура калюсних тканин.*** *Калюс – тканина, що виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин органів рослин.*

У природі калюс утворюється в результаті дедиференціації паренхімних клітин у відповідь на поранення. Утворення і ріст калюсу регулюються ауксинами і цитокінінами. За допомогою цих речовин можна індукувати утворення калюсу у тих тканин рослини, які не утворюють його у відповідь на поранення. Існують нові уявлення, згідно яких не ауксини і цитокініни, а полісахариди та якісь інші індуктори викликають ділення клітин, в результаті якого утворюється калюс.

Перехід клітини *in vitro* із диференційованого стану до дедиференціації і активних клітинних поділів обумовлений зміною активності генів (епігенетичною мінливістю). Активування одних генів і репресування інших приводить до зміни білкового складу клітин. В калюсних клітинах з’являються специфічні білки і водночас зникають або зменшуються в кількості білки, які характерні для фотосинтезуючих клітин листка.

При переході дедиференційованої клітини до неорганізованого анархічного розмноження, яке приводить до утворення калюсної тканини, в клітинах відбуваються біохімічні і цитологічні зміни. Дедиференціація починається з використання запасних речовин і руйнування спеціалізованих клітинних органел. Через 6-12 год після індукції дедиференціації клітинна стінка розпушується і розбухає, збільшується кількість вільних рибосом, зростає кількість елементів апарату Гольджі, збільшуються розміри і кількість ядерець. Всі ці зміни передують початку поділів, які починаються через 48-72 год.

Після індукування утворення калюсу в асептичних умовах його відділяють і поміщають на поверхню агарового живильного середовища. В результаті цього отримують стерильну калюсну культуру або тканину, яка є основним типом рослинної тканини, що культивується. Вперше калюс був отриманий із кореня моркви Р.Готре у 1938 році.

На сьогодні калюсні культури індукуються практично із будь-якого органа і тканини рослин (листків, стебел, коренів, квітконосів, частин квітки) і навіть таких спеціалізованих тканин рослин, як ендосперм насіння або мікроспори ізольовані із пиляків. Однак простота цього процесу залежить від виду рослини і тканини. Здатність утворювати калюс в умовах *in vitro* у молодих, ювенільних, рослин вища, ніж у зрілих. У випадку спеціалізованих тканин, наприклад ендосперму, утворення і ріст калюсу залежать від віку насіння. Як правило, калюс погано утворюється на експлантатах старших 8-11 діб після запилення. Відрізки стебла деревних рослин звичайно є поганими експлантатами для отримання калюсу.

Варто зазначити, що для успішної ініціації первинного калюсу в живильне середовище часто необхідно додавати антиоксиданти (глютатіон – 5 мг/л, діетилдитіокарбамат – 5, цистеїн – 5, аскорбінову кислоту – 5, полівінілпіролідон – 250-500 мг/л та інші), які будуть інгібувати ферменти, що окислюють феноли. Продукти окислення фенолів токсичні і пригнічують поділ клітин експлантата.

При отриманні первинного калюсу експлантати краще культивувати на кількох середовищах з різним співвідношенням ауксинів:цитокінінів. Успіх отримання калюсу у значній мірі залежить від підбору регуляторів росту, індукторів клітинного поділу.

Із ауксинів найчастіше використовують 2,4–Д або ІОК, яка має меншу активність. Для індукування калюсогенезу співвідношення ауксинів до цитокінінів у живильному середовищі повинно бути 10:1.

Для отримання калюсу клітини спеціалізованих тканин при поміщенні на живильне середовище повинні дедиференціюватися. У більшості випадків клітини переходять до спеціалізації із фази $G_1$, яка передує S-фазі – фазі синтезу ДНК, рідше із фази $G_2$. Досить часто експлантат, який використовують для отримання калюсу, містить тканини, клітини яких по різному диференційовані. Різне тканинне походження первинних калюсних клітин є однією з причин гетерогенності калюсної тканини, так як деякі функціональні особливості диференційованих клітин передаються у ряді клітинних поколінь, як стійкі модифікації. Однорідність вихідної тканини має особливе значення для злаків.

У дводольних рослин калюси легко утворюються на експлантатах різних органів: із насіння, що проростає в асептичних умовах, сегментів стебла і коренів, ізольованих фрагментів паренхіми бульб, ізольованої

серцевини стебла, із листка, органів квітки, зародків, плодів і т.д.

Для отримання калюсу голонасінних доцільно використовувати, як вихідний матеріал, бруньки, які ростуть, стерильні проростки, фрагменти флоеми. Калюси злаків отримують із зародків, мезокотилів, коренів або відрізків основи стебла. Основна проблема отримання калюсу злаків пов'язана із складністю виділення із цих рослин експлантату, який складається із однорідної тканини і має оптимальний, достатній розмір. Перша калюсна культура злакових отримана із ендосперму кукурудзи у 1949 році.

На сьогодні розроблені умови отримання калюсу ряду злакових культур. Так, калюс жита отримали із ізольованого кореня, калюс ячменю – із зародка, а суспензійну культуру – із відрізків кореня проростків, калюс риса – із вузлів стебла, відрізків коренів, пагонів, вівса – із насіння, що проростає, пшениці – із сім'ядольних вузлів і зародка.

Основною особливістю середовищ для калюсогенезу у злаків і подальшого культивування калюсу є високий вміст ауксинів, найчастіше 2,4–Д (до 10 $^{мг}/_{л}$). ІОК звичайно використовують у вищій концентрації, ніж її синтетичний аналог.

Оптимальна концентрація ІОК для злаків досягає 100 $^{мг}/_{л}$. Виключенням є калюс ендосперму кукурудзи, який росте на середовищі без ауксинів, так як здатний їх синтезувати.

Процес калюсоутворення залежить від розмірів експлантата – звичайно це 5–10 мм$^3$. Для багатьох експлантатів обов'язково дотримуватись фізіологічної полярності.

Калюси можна вирощувати дуже довго. Для цього необхідно кожні 3-4 тижні пересаджувати частину утворених клітин на свіже живильне середовище. "Найстарішим" вважають штам клітин, одержаний з коренеплоду моркви Роже Готре ще у 1938 році, який і сьогодні вирощують у багатьох лабораторіях світу.

У циклі вирощування калюсні клітини після ряду поділів проходять звичайний для рослинної клітини онтогенез, вони переходять до росту розтягуванням, потім диференціюються як зрілі калюсні клітини і нарешті відмирають.

Калюсна тканина представляє аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним.

Залежно від походження і умов вирощування калюсні тканини

бувають:

1) пухкими, сильно оводненими, розсипчастими;

2) середньої щільності, або компактними із меристематичними зонами;

3) щільними.

Консистенція калюсу залежить, в значній мірі, від складу середовища: на середовищах з ауксинами, особливо з 2,4–Д, калюси стають пухкішими. Із пухких калюсів дуже легко отримати суспензійну культуру при поміщенні їх у рідке середовище. Із компактних калюсів можна отримати пухкі, але не навпаки. Найбільша здатність до морфогенезу характерна для компактних калюсів, які повільно ростуть.

Пухкі і щільні калюси відрізняються анатомічно: щільні калюси менш диференційовані, містять багато вакуолізованих клітин, які щільно упаковані. Крім цього у щільних калюсів загальна кількість полісахаридів клітинної стінки вища, але вміст целюлози порівнюючи з пектиновими речовинами і геміцелюлозами занижений.

Калюсні тканини використовують для збереження у ростучому стані колекцій різних штамів, ліній, мутантів, із них отримують клітинні суспензії, які культивують в рідкому живильному середовищі, для регенерації рослин.

*Особливості калюсних клітин.* Калюсні клітини *in vitro* зберігають багато фізіолого-біохімічних рис властивих нормальним клітинам, які входять до складу рослинного організму. Калюсні клітини зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів. Калюсам, які отримані від морозостійких рослин, притаманні морозостійкість і здатність до загартування. Такої властивості не мають калюси і тканини тропічних і субтропічних рослин. Отже, стійкість до низьких температур зберігається при переході клітини до калюсного росту.

Спільним у калюсних і нормальних клітин також є стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засолення.

Поряд з тим калюсні клітини можуть набувати деяких властивостей, які відрізняють їх від материнських. У них з’являються специфічні білки і зменшується кількість білків, які властиві фотосинтезуючим клітинам листка, або вони зовсім зникають. Калюсні клітини відрізняються значною генетичною гетерогенністю та фізіологічною асинхронністю.

В результаті виходу з під контролю організму калюсні клітини ростуть неорганізовано і асинхронно.

Клітинний цикл калюсних клітин довший, ніж у материнських клітин. Особливістю калюсних клітин є гетерогенність за віком. В калюсній тканині одночасно присутні клітини молоді в $G_1$-фазі, старі в $G_2$- і S-фазах циклу.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калюсних клітин. Вони споживають менше кисню у порівнянні з нормальними. Дихальний коефіцієнт калюсних клітин більший 1, що свідчить про зсув співвідношення між диханням і бродінням в бік посилення бродіння. Мітохондрії в калюсних клітинах розвинуті слабо, у них мало крист, що не може не впливати на активність аеробного дихання.

В калюсних клітинах спостерігається зсув в сторону пентозофосфатного шляху, який є джерелом пентоз, необхідних для клітин, що діляться.

*Генетика калюсних клітин.* Тривалий час вважали, що калюсні клітини генетично однорідні. Однак в 60-х роках XX ст. було виявлено, що калюсні тканини мають виражену генетичну гетерогенність.

Однією з причин генетичної нестабільності клітин, що культивуються *in vitro* може бути генетична неоднорідність вихідного матеріалу (гетерогенність експлантата). У багатьох рослин диференційовані тканини містять клітини різної плоїдності. Другою причиною може бути тривале культивування культур *in vitro*, яке призводить до накопичення в них генетичних змін, в тому числі до нерівномірної зміни плоїдності. Порушення кореляційних зв'язків при ізолюванні ділянок тканин рослин і поміщення їх на штучне живильне середовище теж призводить до генетичної нестабільності клітин. Подібні результати можуть бути обумовлені впливом на генетичний апарат клітини фітогормонів, які входять до складу живильних середовищ. Найактивнішим мутагеном є 2,4-Д, яка є складовою більшості живильних середовищ. Цитокініни, зокрема кінетин, сприяють поліплоїдизації клітин.

Генетичне різноманіття калюсних клітин дозволяє використовувати їх для клітинної селекції на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів і на підвищену продуктивність.

***Культура клітинних суспензій.*** *Культура клітинних суспензій або суспензійна культура – вирощування окремих або невеликих агрегатів у завислому (суспендованому) стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію і перемішування.*

Суспензійна культура використовується для вивчення фізіологічних

закономірностей росту, диференціації, метаболізму соматичних клітин вищих рослин. Особливе значення має використання біосинтетичного потенціалу рослинних клітин для промислового отримання при великомасштабному культивуванні ряду економічно цінних речовин – алкалоїдів, стероїдних сполук, глюкозидів, ефірних олій, ферментів тощо.

Клітинну суспензію отримують з шматочка калюсу в рідкому середовищі, яке перемішується. Для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої калюсної маси на 60-100 мл рідкого живильного середовища. Первинну суспензію отримують на коловому шейкері зі швидкістю перемішування 100-120 об/хв.

Суспензійну культуру можна отримати також із фрагмента органа рослини (листок, стебло, корінь). Спочатку на поверхні експлантата утворюється первинний калюс, а потім від нього відділяються клітини і клітинні агрегати, які дають початок клітинній суспензії.

Для отримання високо диспергованої суспензійної культури велике значення має тип вихідної калюсної тканини. Оптимальною є калюсна тканина пухкого типу, яка легко розсипається при внесенні в рідке середовище, що перемішується. Для цього калюс вирощують на середовищі з високою концентрацією ауксинів і зменшеною концентрацією або без цитокінінів і без іонів $Ca^{2+}$. Додавання в середовище фермента пектинази, який руйнує пектат кальцію, що склеює окремі клітини, полегшує отримання суспензії.

Необхідною умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування середовища. Якщо клітинна суспензія перебуває в нерухомому стані, то ділення суспензійних клітин призводить до утворення калюсної тканини.

Первинну суспензійну культуру перед субкультивуванням фільтрують через 1-2 шари марлі, нейлонові або металічні сита, щоб позбутися від великих і щільних шматків калюсної тканини і крупних агрегатів.

Для глибинного культивування рослинних клітин користуються способами вирощування, які розроблені в мікробіології. Використовують закриті або відкриті системи в періодичному або протоковому режимах.

У закритій системі при періодичному режимі вирощування клітинна маса поміщається в певний об’єм середовища. До закінчення вирощування система залишається закритою за всіма параметрами окрім газів.

У закритій безперервній культурі у систему періодично подається

свіже живильне середовище, а старе видаляється у тому ж об’ємі. Клітини залишаються в системі протягом всього періоду вирощування.

У відкриті протокові культури періодично поступає свіже середовище, однак відбирається не лише старе середовище, а й частина клітинної маси. Регуляція цього процесу може здійснюватися за принципом турбідостата або хемостата. У турбідостаті подача свіжого середовища і відбір суспензії відбуваються після досягнення клітинною суспензією певної заданої густини. Сигнал на включення поступає від реле, яке зв’язане з оптичною системою, що визначає густину суспензії. В хемостаті швидкість протоку задається експериментатором і від неї залежить швидкість росту клітинної маси. Режим хемостата дозволяє за допомогою фіксованої швидкості розбавлення підтримувати постійну швидкість поділу і густину клітин у популяції. Найпоширенішим режимом культивування клітинних суспензій є закрита періодична система. У цьому випадку для аерації і перемішування суспензії використовують різну апаратуру: ролери, шейкери (як правило колові), ферментери з механічними і магнітними змішувачами або ферментери барботажного типу, в яких аерація і перемішування здійснюється повітряним потоком.

Для роботи з суспензіями необхідно знати їхні характеристики: життєздатність, щільність клітин в суспензійній культурі, ступінь агрегованості, швидкість росту.

Життєздатність клітин визначають за їхнім забарвленням барвником (метиленова синь або синь Еванса). Живі клітини не фарбуються барвником так, як клітинні мембрани непроникні для нього. В мертві клітини фарба легко проникає, і вони забарвлюються у синій колір.

Одним із основних показників, які характеризують стан клітинної суспензії, є щільність клітинної популяції. Кількість клітин визначають в лічильній камері Фукс-Розенталя під мікроскопом після мацерації хромовою кислотою (10-20 %).

Звичайно пасаж культивування клітинної суспензії становить 14-16 днів. За цей час щільність зростає від $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегованості її клітин. Агрегати не повинні містити більше 10-12 клітин. Для видалення крупних агрегатів суспензії фільтрують через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє позбутися від залишків експлантата або щільних шматків калюсної тканини.

***Культивування ізольованих клітин.*** Для генетичних і фізіологічних досліджень, а також для практичного використання в клітинній селекції використовують ізольовані клітини. Отримання клону-потомства одиночної клітини допомагає з'ясувати причини генетичної неоднорідності калюсних клітин, оскільки спостереження в цьому випадку проводяться на тканині, яку отримали не з гетерогенного експлантата, а з однієї клітини. Ізольовані клітини також використовують як модель для вивчення взаємовідношень між клітиною і оточуючим середовищем, клітинами рослини-хазяїна і різними патогенними мікроорганізмами тощо.

Отримання одноклітинних клонів рослин складається з двох етапів:

1. виділення одиночних життєздатних клітин;
2. створення сприятливих умов для їх поділу і росту.

Для виділення життєздатних культур використовують такі методи:

1. вирощування калюсної маси і отримання із неї суспензії;
2. слабо агреговані суспензії;
3. виділення окремих клітин із тканин цілої рослини.

Отримання клітин із суспензійних культур пов'язане з меншим ризиком пошкодження порівняно з виділенням безпосередньо із органів рослини. Для отримання одноклітинної фракції суспензійної культури іноді достатньо простого відстоювання у колбі протягом 15-30 хв. При цьому крупні агрегати осідають на дно колби, а надосадова фракція містить тільки одинокі клітини або дрібні агрегати. Якщо при відстоюванні не вдається отримати одноклітинну фракцію, то застосовують ферменти для мацерації, центрифугування в градієнті сахарози або фільтрування через сита (нейлонові або металеві).

Труднощі культивування одиночних клітин пов'язані з тим, що окрема клітина не ділиться в тих умовах, в яких добре росте калюсна тканина. Для того, щоб змусити одиночні клітини ділитися, розроблені спеціальні методи:

1. метод культури "няньки";
2. метод мікрокультури або висячих крапель;
3. метод плейтінга.

Сюди можна віднести і культуру ізольованих протопластів, яку буде розглянуто далі.

Метод культури "няньки" запропонував Джонсон у 1960 році. Функцію "няньки", яка стимулює поділ одиночної клітини, виконують шматочки калюсної тканини, відокремлені від неї фільтрувальним

папером. У присутності “няньки” одиночна клітина ділиться і дає індивідуальну колонію клітин – клон (рис. 11).

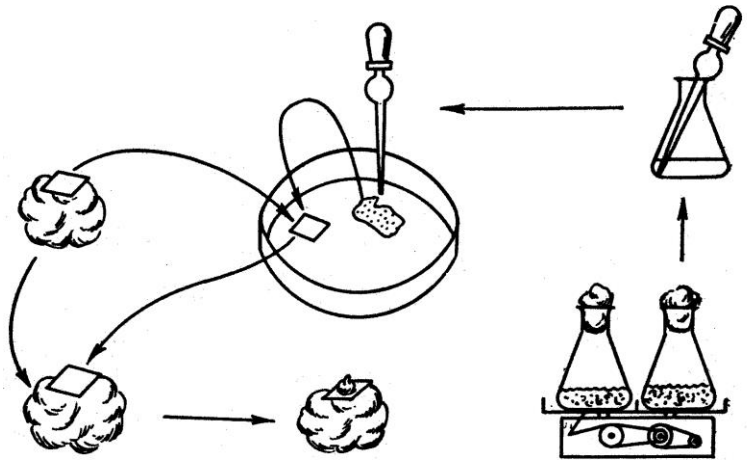


*Рис. 11. Метод культури “няньки” для вирощування культури із одиночної клітини*

Метод мікрокультури базується на використанні дуже малих об’ємів багатого живильного середовища і являє собою культивування одиночних клітин в мікрокраплі в чашці Купрака об’ємом 20 мл. Метод запропонував академік Глєба Ю.Ю. У мікрокраплях зручно спостерігати за отриманням і діленням клітин при соматичній гібридизації.

Метод плейтінга передбачає змішування клітин суспензії з розплавленим та охолодженим до 35°–40° С середовищем і розлив тонким шаром (1 мм) у чашки Петрі. Цей метод був розроблений Бергманом у 1960 році. Цей метод використовують для отримання одноклітинних клонів та оцінки життєздатності клітин.

Використання культури “няньки”, мінімального об’єму середовища, в якому культивується окрема клітина, пов’язані з феноменом, який називають “дія фактора кондиціонування”. Незважаючи на численні спроби визначити хімічну природу речовин (або речовини), які індукують ділення одиночної клітини, і механізм дії фактора кондиціонування, ця проблема залишається не вирішеною. Дослідження показали, що цей фактор хімічної природи і включає низькомолекулярні речовини (~700 Д).

*Методи оцінки результатів.* Для характеристики росту культур *in vitro* в першу чергу визначають збільшення сирої маси *($W_t$–$W_o$)*. Результати можуть бути виражені відносно вихідної маси $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}$. Це дозволяє встановити у скільки разів збільшилася маса протягом досліду. Величину приросту маси можна виразити у відсотках $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%$. Якщо

тривалість росту в окремих випадках неоднакова, необхідно ввести у формулу фактор часу $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot \frac{1}{t}$.

Таким же чином можна проводити облік результатів за масою сухої речовини.

Більше інформації про характер росту культури отримують при визначенні числа клітин на одиницю маси тканини. Підрахунок клітин дозволяє визначити збільшення маси тканини відбувається за рахунок поділу клітин чи їх росту. Це дає можливість розрахувати і середню вагу клітини. Кількість клітин визначають за методом розробленим Брауном, який полягає у мацерації і послідуючому підрахунку краплі суспензії клітин у лічильній камері під мікроскопом. Використовують кілька методів мацерації. Більшість з них базується на обробці тканин сильними кислотами, які гідролізують серединні пластинки, що з'єднують клітини.

Для суспензійних культур визначають об'єм ущільнених клітин. Для цього в градуйовані центрифужні пробірки переносять певний об'єм суспензії (15 – 30 мл) і центрифугують при 1500g 10 хв або суспензію поміщають в градуйований циліндр і відстоюють впродовж доби. Об'єм ущільнених клітин виражають в мл клітинного осаду на мл культури.

Розмір клітин визначають вимірюючи їхню довжину та ширину під мікроскопом за допомогою шкали окуляр-мікрометра та об'єкт мікрометра.

***Завдання***

1. Для яких цілей використовують культуру ізольованих коренів?
2. Для яких цілей використовують культуру ізольованих листків?
3. З якою метою використовують частини квітки?
4. Для яких цілей використовують культуру ізольованих зав'язей?
5. Для чого використовують культивування *in vitro* пилку і пиляків?
6. Для яких цілей використовують культуру зародків?
7. Для яких цілей використовують культуру ізольованих меристем?
8. Що таке протокорм?
9. Яка основна особливість середовища для калусогенезу у злаків?
10. Які причини генетичної нестабільності культивованих клітин?
11. Особливості отримання суспензійної культури.
12. Які основні показники суспензійної культури? Охарактеризувати їх.
13. Назвати методи культивування поодиноких клітин.
14. Які показники визначають для оцінки росту суспензійної культури?

# ТЕМА 5: МОРФОГЕНЕЗ В УМОВАХ IN VITRO

***Мета:*** вивчення морфогенезу в умовах in vitro

## *Теоретична частина*

Морфогенез – це розвиток структур із недиференційованого стану в диференційований. У культурі рослин цей процес може приводити до диференціації органів de novo (органогенез). Специфіка морфогенезу у виших рослин полягає в тому, що теоретично кожна соматична клітина зберігає здатність до диференціації і може дати початок цілій рослині внаслідок переходу в умовах in vitro до дедиференціації. Рослинній клітині властива тотипотентність, тобто спроможність клітини зберігати потенціал до формування усіх типів клітин зрілого організму. Іншими словами, тотипотентність – це здатність окремих клітин до відтворення ембріо- і морфогенезу без проходження репродуктивної фази – цвітіння. Отже, органогенез і соматичний ембріогенез є репродуктивною стратегією, альтернативною до цвітіння. Висловлюється припущення, що такий нестатевий тип розмноження – це релікт розвитку, який зберігся у рослин і завдяки якому можливе їх клональне розмноження. Фізіологічні, біохімічні та молекулярні процеси, які лежать в основі морфогенезу, вивчені недостатньо, що не дає можливості створити теорію морфогенезу. Труднощі у вивченні цього процесу полягають в тому, що диференціація клітин і органогенез відбуваються асинхронно: клітини, які диференціюють, розділені у просторі. У зв’язку з цим під час дослідження морфогенезу ведеться пошук найпростіших модельних систем, у яких зміна факторів навколишнього середовища супроводжується чіткою морфогенетичною реакцією.

Відтворення різних реакцій клітин і тканин у відповідь на зміни умов живлення, дії гормонів чи фізичних факторів дає змогу пізнати природу і механізм дії індукторів диференціації. Класичним прикладом демонстрації ролі співвідношення гормонів (ауксинів і цитокінінів) в утворенні коренів або стеблових бруньок є досліди з серцевиною тютюну.

Ізоляція рослинних клітин, що знаходяться у стані спокою, відділення від клітин, які їх оточують, і культивування в живильному середовищі з гормонами відновлюють проліферацію. Вважають, що у цілому організмі неконтрольована проліферація клітин усередині тканини пригнічується внаслідок контактного інгібування. При ізоляції зі зрілої

тканини, що знаходиться в стані спокою, і культивуванні у живильному середовищі рослинна клітина втрачає свою ідентичність, тобто ознаки диференціації, а також здатність відповідати пригніченням проліферації у відповідь на контактне інгібування.

Як відомо, органогенез у культурі тканин відбувається у дві фази. Перша – дедиференціація, під час якої спеціалізована клітина перетворюється в калусну. Необхідною умовою для цього є перенесення ізольованої рослинної тканини в агаризоване, або рідке живильне середовище, яке містить елементи живлення і гормональні фактори. Успіх в отриманні калусу переважно залежить від вдалого підбору концентрації і співвідношення фітогормонів та вибору експланта. Під час другої фази – індукції морфогенезу – в неорганізованих калусних тканинах утворюються морфологічні структури, в яких, у свою чергу, формуються адвентивні (утворені de novo) бруньки, корені, пагони, квітки або квіткові ініціалі, зародки, структурно подібні до тих, які формуються в насінні, листки (що засвідчує наявність меристеми пагонів) і окремі рослинки-регенеранти. Тканини або органи, які зберігають здатність до морфо- чи органогенезу, називають морфогенними або органогенними.

Морфогенні меристеми можуть утворюватись як на експлантах диференційованої тканини, перенесеної в умови in vitro, без утворення калусу, внаслідок прямого органогенезу, так і в ка- лусній тканині, яка складається із дедиференційованих клітин, або в культурі суспензії клітин, внаслідок непрямого органогенезу. Іноді на практиці важко чітко розрізнити ці два способи органогенезу, оскільки у морфогенних меристемах, що формуються на експлантах диференційованої тканини, перед утворенням соматичних зародків або пагонів спостерігається формування ділянок тканини, схожої на калус. Диференційовані клітини інтактної рослини дуже відрізняються за здатністю до дедиференціації і морфогенезу; деякі форми високоспеціалізо- ваних клітин втратили її назавжди. Клітини, які зберегли або набули здібності до певного типу диференціації чи морфогенезу у відповідь на конкретний стимул, називають компетентними. Як за прямого, так і за непрямого органогенезу на певній стадії утворення нової меристеми компетентні клітини вибирають різні програми, що визначають подальший розвиток (стадія детермінації). Існує припущення, що морфогенно компетентна клітина набуває здатності до диференціації певного типу, наприклад до диференціації лише пагонів. Окремі клітини або їх групи стають

детермінованими, коли вступають на генетично детермінований шлях розвитку до певного типу морфогенезу, і цей розвиток триває без подальшого впливу регуляторів росту. Стадії компетентності і детермінації часто важко розмежувати, оскільки у разі неорганізованої калусної тканини це програмування (детермінація) індукується регуляторами росту разом із відповідною комбінацією елементів живлення. Морфогенні центри утворюються лише з невеликої кількості клітин порівняно з їх загальною кількістю в культурі. Можливо, вони виникають із тих клітин, які були у відповідній фазі клітинного циклу в момент застосування індукторів диференціації (органогенезу). Крім того, є дані, що меристеми, які утворилися першими, пригнічують подальше формування цих структур за допомогою регуляторів росту, які синтезуються в первинних меристемах.

Як зазначено вище, молекулярні процеси, зокрема сигнальні системи, відповідальні за індукцію диференціації і органогенезу та їх зв'язок з регуляцією клітинного циклу, ще потребують подальших детальних досліджень. Серед фізіологічних характеристик, властивих клітинам калусу або суспензійної культури, що здатні переходити до морфогенезу, відмічають накопичення крохмалю, найчастіше в клітинах, розміщених там, де утворюються примордії пагонів. Крохмаль синтезується з цукрози, яка надходить з культурального середовища. Оскільки крохмаль швидко зникає з клітин після утворення мериcте- моїдів або примордіїв пагонів, зроблено висновок, що він є прямим джерелом енергії для клітини, яка переходить до морфогенезу. Встановлено також, що крохмаль накопичується в калусах перед утворенням пагонів або коренів. Для калусів, не здатних до морфогенезу, це не характерно.

У літературі, присвяченій органогенезу, широко дискутується питання, чи походять органогенні пагоневі меристеми з однієї епідермальної клітини, чи для їх ініціації потрібна асоціація епідермальних і субепідермальних клітин. Одноклітинне походження адвентивних пагоневих бруньок засвідчує висока частота утворення мутантних рослин, яка має місце при обробці рослин мутагенами. Якби органогенні меристеми виникали з декількох клітин, спостерігалося б утворення великої кількості химер. У зв'язку з цим C. Broetjis і A. Keen вважають, що адвентивні меристеми пагонів, які формуються в результаті прямого органогенезу, завжди утворюються з однієї або декількох дочірніх клітин, що, у свою чергу, беруть початок з окремої клітини. Водночас R. Norris і

R. Smith, вивчаючи регенерацію пагонів із листків сенполії, дійшли висновку, що в утворенні стеблових меристем беруть участь також клітини субепідермального шару.

Органи рослин часто формуються із сфероподібних утворів, меристемоїдів, що складаються з дрібних меристематичних клітин, заповнених цитоплазмою, і мають велике ядро.

При МКР використовують меристеми, верхівки пагонів, пазушні бруньки для індукції адвентивних пагонів і/або адвентивних соматичних зародків безпосередньо з експлантів, виділених із материнської рослини (прямий органогенез), або неорганізованих калусів чи суспензійних культур, отриманих проліферацією клітин експланта (непрямий органогенез).

Підсумовуючи багаторічний досвід МКР, рекомендують використовувати:

- культури меристем (0,2-0,5 мм), латеральні бруньки чи верхівки пагонів (1-2 мм), які укорінюють або розділяють на міжвузля і після підростання укорінюють;

- міжвузля, які отримують розрізанням пагонів, що ростуть в культурі in vitro; при культивуванні in vitro на кожному міжвузлі формується пазушна брунька, з якої утворюється пагін, придатний для розмноження;

- квіткові меристеми для отримання вегетативних пагонів, які використовують для розмноження, як описано вище;

- експланти листків, сегменти стебла чи запасаючих органів для регенерації стебла перед утворенням калусу (прямий органогенез);

- експланти ембріогенної тканини для отримання соматичних зародків до утворення калусу (прямий ембріогенез);

- морфогенний калус для регенерації пагонів, які після досягнення висоти 10 мм укорінюють (непрямий органогенез);

- калус або суспензійну культуру клітин, здатну утворювати соматичні зародки (непрямий ембріогенез).

Культуру пагонів отримують із верхівок латеральних або головних пагонів завдовжки до 20 мм, вичленених із пагонів, що активно ростуть, або сплячих бруньок. Великі експланти краще реагують на внесення в умови in vitro, швидше ростуть і мають більше пазушних бруньок, проте їх важче стерилізувати. З метою отримання великої кількості матеріалу для МКР в культурах пагонів індукують ріст пазушних бруньок введенням до

складу живильного середовища цитокінінів. При цьому усувається апікальне домінування й утворюється багато бічних пагонів, що використовують як мікроживці. Щоб позбутися апікального домінування, для деяких рослин (троянда, груша) рекомендують відщипнути верхівку основного пагона під час першої пересадки. Потрібно зазначити, що цитокініни, які вносять у середовище для індукції росту пазушних пагонів, як правило, пригнічують утворення коренів. Тому перед перенесенням їх із умов in vitro у ґрунт пагони спочатку укорінюють у живильному середовищі або стерильному грунті.

Іншим способом усунення апікального домінування є горизонтальне розташування експлантів на середовищі. Цей спосіб досить ефективний при культивуванні відрізків пагонів (2-3 міжвузля) деревних порід.

Для того щоб легше було розділити пагін на міжвузля, у середовище вводять гіберелову кислоту, яка спричинює його видовження.

Одним з ефективних методів отримання пагонів для МКР є пророщування насіння на середовищі з цитокініном. У цьому разі утворюються цілі пучки пазушних або адвентивних пагонів, які розділяють і пересаджують на таке ж середовище. Більшість повідомлень щодо пророщування насіння на середовищі з цитокінінами стосується утворення адвентивних пагонів під час пророщування насіння дводольних, як трав'янистих, так і деревних (сої, цукрового буряку, мигдалю, огірка і гарбуза), а також однодольних – кукурудзи і рису.

Крім того, при культивуванні сегментів молодих суцвіть, з яких ще не утворились індивідуальні квіткові меристеми, отримують пагони для МКР (цибулі, цвітної капусти.

Прямий ембріогенез, тобто формування на експлантах соматичних зародків без утворення калусної тканини, спостерігається при культивуванні пиляків із пилкових мікроспор, усіх частин зав'язі, яйцеклітини, особливо з тканин нуцелуса, зиготичного зародка або молодих проростків

Прямий ембріогенез in vitro відбувається лише у тих клітинах експланта, які вже попередньо підготовлені до диференціації в зародки, і перенесення їх в умови in vitro тільки прискорює цей процес. Експланти, здатні до прямого ембріогенезу, можуть утворювати калус, який регенерує зародки. Суспензійна культура клітин, отримана з такого калусу, має такі ж властивості. Отже, тканини, здатні до прямого ембріогенезу, зберігають цю властивість і в більш дедиференційованому стані, при культивуванні їх

у вигляді калусу або суспензії клітин.

Соматичні зародки завжди утворюються на поверхні калусу, легко відділяються від довколишніх клітин, оскільки не зв'язані з тканиною, на якій формуються. Ці структури утворюються також із клітин, що мають щільну цитоплазму та великі ядра і містять багато крохмалю, водночас звичайні клітини калусу є паренхіматичними з великими вакуолями. Соматичні зародки за структурою дуже подібні до зиготичних. Також майже немає різниці у стадіях їх розвитку, і тому вважають, що процеси зиго- тичного і соматичного ембріогенезів однакові. Для зародків дводольних розрізняють такі стадії розвитку: 1) проембріо – малі угруповання меристематичних клітин, з яких утворюються соматичні зародки; 2) глобулярна – більші групи меристематичних клітин, що за формою нагадують зародок; 3) серцеподібна – зародок має характерну 3-лопатеву форму; 4) торпедо – зародок видовжений, ініціалі сім'ядолей виразніші; 5) рослинка – можна розгледіти малий "проросток" з первинним корінцем і стебельцем. У однодольних стадії розвитку зародка дещо інші: на глобулярній утворюються пагони, які в процесі розвитку дають початок структурам, що нагадують щиток і колеоптиль. Від адвентивних пагонів вони відрізняються своєю біполярністю, тобто мають пагоневий і корінцевий полюси і не зв'язані судинами із тканиною, з якої утворились. Розвиток техніки культивування рослинних клітин і тканин in vitro дає змогу стимулювати соматичний ембріогенез у більшості видів.

***Прямий органогенез.*** Для його ініціювання, як правило, використовують відносно великі експланти. У живильних середовищах на них можуть формуватися корені, пагони або соматичні зародки без попереднього утворення калусу. Для реалізації морфогенного потенціалу має велике значення, з якого органу рослини відбирають експланти. Адвентивні бруньки можуть утворитися на експлантах, взятих із різноманітних органів (черешків листя, стебла, коренів, листків чи сім'ядоль). Частіше вони формуються на тканинах нуцелуса, проростках, отриманих із соматичних зародків, і дуже рідко — на тканинах листків. Утворення коренів унаслідок прямого морфогенезу на експлантах некореневого походження спостерігається не так часто: це відмічено тільки у видів Brassica, Petunia, Capsicum і Abelmoschus esculentus).

***Непрямий органогенез.*** Для індукції непрямого морфогенезу з калусних культур, тобто для утворення морфогенних меристем, які дають початок росту коренів або пагонів, потрібна пересадка калусних культур

на середовище для регенерації іншого складу, зі зміненим співвідношенням регуляторів росту. У деяких випадках, у разі тривалого вирощування без пересадок, спостерігається спонтанний органогенез. Зазначено, що культури з найбільшою здатністю до органогенезу отримані від молодих органів рослин з інтенсивним поділом клітин. Утворення органів із калусу відбувається також внаслідок попереднього формування меристематичних центрів, які дають початок адвентивним пагонам, кореням та ембріоїдам. Непрямий соматичний ембріогенез здійснюється у клітинах, в яких у процесі інтенсивного поділу в культурі відбулися дедиференціація та індукція детермінації ембріогенезу.

Морфогенез in vitro має три етапи, які характеризуються не лише зміною процедур у процесі культивування, а й різними вимогами до здовколишнього середовища. Перед введенням у культуру часто проводиться обробка і підготовка маточних рослин. Деякі автори у зв'язку з цим виділяють цей період в окремий етап, наприклад етап 0. У сучасних дослідженнях виокремлюють також етап IV, на якому рослини переносяться з умов in vitro в умови вирощування в ґрунті.

*Етап 0. Відбір і підготовка маточних рослин*

Перед початком МКР велику увагу слід приділити відбору маточних рослин, які мають бути типовими для цього виду чи сорту і без ознак захворювання. У цей період вживають заходи щодо зниження рівня інфікованості експлантів, визначення наявності системного вірусного чи бактеріального захворювання та його лікування.

*Етап І. Отримання стерильної культури*

На цьому етапі основне завдання – виділити стерильний експлант, перенести його у стерильних умовах на відповідне живильне середовище і отримати на експланті ріст тканин певного типу – калусу чи ізольованих меристем.

*Етап ІІ. Утворення морфогенних структур*

До них належать соматичні зародки, протокорми, пазушні або верхівкові бруньки і т. і., які у разі відділення від калусу на живильному середовищі можуть дати початок рослинам-регенерантам. Деякі з новоутворень, що формуються протягом етапу **ІІ,** наприклад пагони, можна використати як матеріал для подальших циклів розмноження, якщо під час пересадок їх кількість збільшується.

*Етап ІІІ. Підготовка до росту в природному середовищі – укорінення*

Рослинки, або пагони, що утворилися протягом етапу ІІ, дуже малі і

нездатні для росту в грунті або компості. Упродовж етапу III на пагонах мають утворитись корені. Для цього використовують спеціальні середовища для укорінення. У деяких лабораторіях для зниження вартості пагони переносять з умов in vitro в умови extra vitrum і укорінюють їх поза культуральними посудинами. У тому разі, коли при МКР використовують адвентивні або пазушні бруньки, етап III розділяють на два підетапи: етап IIIа, протягом якого ініціюють ріст бруньок або пагонів, утворених на етапі II, і етап IIIб – укорінення пагонів, отриманих на етапі IIIа в умовах як in vitro, так і extra vitrum.

*Етап IV. Перенесення рослин-регенерантів у природне середовище*

Протягом цього етапу рослини регенеранти готують до пересадки в грунт: виймають з посудин, в яких вони були на етапі III, ретельно відмивають корені від агару, переносять у стерилізовану суміш для укорінення, наприклад суміш торфу й компосту, і витримують декілька діб в умовах підвищеної вологості і зниженої інтенсивності освітлення або в туманоутворювальній установці. Поки не буде ретельно відпрацьована технологія перенесення регенерантів у ґрунт, може відбуватись значна їх втрата. У зв'язку з тим, що рослини-регенеранти в умовах in vitro ростуть за високої вологості і низької інтенсивності освітлення, кутикула їх листків містить менше воску продихи втрачають здатність до повного закриття в умовах меншої вологості, в результаті чого такі рослини швидше втрачають воду при перенесенні у природне середовище. Встановлено також, шо перехід до автотрофного живлення у цьому разі відбувається протягом декількох діб.

***Завдання***

1. Описати першу фазу органогенезу в культурі тканин.
2. Описати другу фазу органогенезу в культурі тканин.
3. Описати прямий органогенез.
4. Описати непрямий органогенез.
5. Описати етап «відбір і підготовка маточних рослин».
6. Описати етап «отримання стерильної культури».
7. Описати етап «утворення морфогенних структур».
8. Описати етап «підготовка до росту в природному середовищі».
9. Описати етап «перенесення рослин у природне середовище».

# ТЕМА 6: ФАКТОРИ ВПЛИВУ НА РЕГЕНЕРАЦІЮ РОСЛИН

***Мета:*** вивчення факторів впливу на регенерацію рослин

## *Теоретична частина*

Реалізація морфогенного потенціалу культивованих тканин залежить від багатьох факторів, серед яких можна виділити три групи: генотип материнської рослини, тип експланта та умови його культивування.

*Генотип рослин.* Найбільший вплив на регенерацію експлантів має генотип материнської рослини. Помічено, що види рослин, які добре розмножуються вегетативно (бегонія, паперомія, стрептокарпус, сенполія та ін.), мають високу регенераційну здатність у культурі in vitro. Це представники родин Solanaceae, Umbeliferae, Cruciferae, Compositae. Дуже важко регенерують рослини з родин Gramineae і Leguminosae. У межах одного виду певні генотипи можуть розмножуватися краще. Так, експланти сортів антуріуму Андре з рожевими та малиновими оцвітинами майже у 100 % випадків утворювали калус і регенерували рослини, а форми з червоними оцвітинами – лише у 30-40%. Серед генотипів антуріуму Андре лише 1/3 може його проліферувати, а серед антуріуму Шерцера 3/4 здатні утворювати калус з наступним морфогенезом. Значні відмінності спостерігали у культиварів бегонії, гладіолуса, нарцисів, лілії, гіацинта. Дуже часто на МКР впливають сортові відмінності рослин, що зумовлені різним вмістом ендогенних регуляторів росту в тканинах. Експланти по-різному реагують на склад живильного середовища і виявляють відмінності у проліферації калусу і морфогенезі рослин. Морфогенний потенціал дводомних рослин також відрізняється: жіночі екземпляри Actinidia chinensis утворюють більше пагонів на експлантах апексу стебла, ніж чоловічі.

*Фізіологічний стан материнської рослини.* Успіх МКР часто залежить від умов вирощування материнської рослини. Визначено, що найкращі експланти можна отримати від здорової сильної рослини, що росте на удобреному ґрунті за достатньої вологості. У багатьох рослин морфогенна здатність у культурі тканин обмежена періодом активного вегетаційного росту, збільшується під час бутонізації й цвітіння і знижується в період спокою. Тканини, вилучені весною, дають більшу кількість регенерованих рослин. Так, весняні експланти гербери мають більші морфогенні потенції, ніж осінні.

В основі динаміки морфогенного потенціалу, пов'язаного з порами року, лежать зміни фізіологічного стану рослин під час вегетації, накопичення ендогенних регуляторів росту в тканинах. Експланти лусок цибулини Lolium sp., видалені весною або влітку, проліферують калус на живильному середовиші без додавання ауксинів, а восени – лише за допомогою регуляторів росту.

***Тип експланта.*** Реалізація морфогенного потенціалу значною мірою залежить від якості експланта. Тканини різного походження від рослин багатьох таксономічних груп успішно вводять у культуру. Для МКР придатні усі меристематичні тканини, яким властива метаболічна активність. Ці тканини краще за інші приживлюються в культурі і зберігають ознаки клону. Вони містяться в апексах пагонів, термінальних і латеральних бруньках, по всій тканині молодих листків або піхвах і кінчиках, на черешках листків і квіток, лусках цибулин, сплячих бруньках пагонів і квітконосах, на бутонах і пелюстках квітки.

Тотипотентність властива усім рослинним клітинам, але її прояви обмежуються невеликою кількістю меристемоїдних, морфогенно компетентних клітин, які започатковують розвиток ембріоїдів, бруньок, пагонів, коренів.

Регенерація рослин у культурі відбувається за умови експериментального керування трансформацією немеристематичних клітин у меристемоїдні. Тому першорядним є виділення тканини з найбільшим морфогенним потенціалом.

Органогенез культивованих тканин залежить від розміру експланта: чим він менший, тим нижча його регенераційна здатність. Великі експланти з ділянками паренхіми, провідною тканиною і камбієм можуть спонтанно індукувати морфогенез незалежно від концентрації фітогормонів у живильному середовищі. Разом із тим помічено, що невеликі гомогенні ділянки епідермальних і субепідермальних тканин, вільні від корелятивного впливу інших тканин, можуть утворювати складні структури – бруньки, пагони, корені.

З метою знищення вірусної інфекції ізолюють апікальні верхівки завдовжки 0,1-0,2 мм без листкових примордіїв. Приживлюваність таких експлантів дуже низька (1-10%). Для масового МКР використовують апекси розміром 0,1-0,5 см з листковими примордіями і субапікальною тканиною, приживлюваність яких значно більше, і вони здатні регенерувати цілі рослини. Так, експланти верхівок пагонів яблуні з 4-6-

листковими примордіями розвиваються краще за апекси з 2 листками. Як правило, розмір експлантів із листкових пластинок становить 1 $см^2$, довжина листкових черешків – 3-5 мм. Прямий і непрямий морфогенез також залежать від розміру експланта. Так, кількість регенерованих цибулинок на експлантах лусок гіацинта зростає, якщо розміри збільшуються від 1 до 3 см. Формування коренів на калусі Populus також зумовлене його розміром: на більшому калусі, що утворився на великому експланті, проліферує більша кількість коренів. Проте у арабідопсиса невеликі експланти калусу (75 мг) формують пагони і листки, а інокулюми до 250 мг продовжують утворювати калус без морфогенезу. Успіх регенерації часто залежить від розміщення експланта на інтактній рослині. Апекси, видалені з термінальних бруньок, мають більший морфоргенний потенціал, ніж апекси латеральних бруньок. Помітний вплив на проліферацію клітин і морфогенез має полярність органа чи тканини на інтактній рослині або орієнтація експлантів на живильному середовищі.

Так, сегменти квітконоса гладіолуса утворюють калус і корені на базальній частині, а бруньки і пагони – на дистальній. Значні відмінності морфогенезу бруньок спостерігали у різних експлантів квітконоса лілії. Сегменти, взяті біля квітконоса (дистальний кінець), утворюють у 5 разів більше бруньок, ніж сусідні, особливо якщо їх розмістити дистальною частиною у середовище. Регенеративна здатність фрагментів листка, як правило, більша на проксимальній частині, ніж на дистальній. Це пояснюється тим, що його проксимальна частина містить більше меристематичних клітин. Експланти листків яблуні регенерують пагони лише на проксимальній частині. Численні протокорми укорінюються на проксимальній частині адаксіальної поверхні листка орхідей (Phalaenopsis і Vanda).

Виявлено, що морфогенна здатність поверхні листка генетично детермінована. Так, у рослин родини Liliaceae більшу регенеративну активність має адаксіальна поверхня лусок, у Amaryllidaceae – абаксіальна (нижня). Експланти, вилучені з базальної частини лусок цибулин, утворюють більше адвентивних пагонів і цибулинок, ніж із дистальної.

Іноді ріст і морфогенез експланта залежать від його розміщення на живильному середовищі. Сегменти молодих листків суниці регенерують більше адвентивних пагонів, коли їх адаксіальна поверхня контактує з середовищем. Експланти лусок Lilium longiflorum проліферують набагато

більше цибулинок, коли їх розміщують абаксіальною частиною на середовищі.

Відрізки квітконоса гладіолуса утворюють калус і корені з базального кінця, коли він занурений у середовище, але якщо експлант перевернути, морфогенез відбувається значно швидше.

Інколи горизонтальне розміщення відрізків пагонів сприяє кращій ініціації адвентивних пагонів, ніж вертикальне (у груші, яблуні та деяких деревних рослин).

Морфогенетичний потенціал ізольованих тканин значною мірою залежить від тривалості культивування. Помічено, що у багатьох випадках під час перших декількох пересадок морфогенез зростає. Подальше субкультивування знижує регенераційну здатність експлантів. Експерименти з калусом Convolvulus виявили, що після 3 пересадок деякі лінії втрачають здатність до морфогенезу, але її можна відновити додаванням кінетину до живильного середовища.

Тканинні і клітинні культури багатьох рослин зберігають регенераційну здатність тривалий час. Так, калус хризантеми, що містить меристематичні зони, не втратив морфогенну властивість протягом 3-5 років субкультивування, а калус томатів після 30 пасажів продовжував регенерувати рослини. Понад 3 роки калус Lilium був здатний до утворення коренів.

Первинний калус, що утворився безпосередньо з тканин експланта, зберігає генотип материнської рослини. Під час субкультивування в ньому можуть виникати аномалії: зміна плоїдності, хромосомні порушення, клітини-мутанти. Регенерація таких клітин призводить до появи екземплярів, що генетично відрізняються від материнської рослини. Кількість змінених рослин серед загальної маси регенерантів тим більша, чим довше субкультивували калус. Тому краще використовувати лише первинний калус, здатний до морфогенезу ідентичних рослин.

***Місткість культурального посуду.*** Помічено, що ріст і проліферація в культурі in vitro часто залежать від розміру культурального посуду. Це, очевидно, пояснюється різною концентрацією кисню, оксиду вуглецю та етилену у посудинах різної місткості. У малих посудинах, як правило, ріст ізольованої тканини пригнічується. Так, ріст пагонів сенполії відбувається краще в колбах місткістю 120 мл, ніж 60 мл. У багатьох деревних культур пагони також швидше проліферують у колбах на 200 мл.

Більшу кількість пагонів гербери отримано у посудинах місткістю 125 мл, ніж у пробірках 25 × 150 мм. Апекси актинідії краще проліферують у колбах на 125 мл, ніж на 50, 250 чи 500 мл. Очевидно, не можна давати певної рекомендації щодо місткості посуду для певного виду, це слід добирати експериментально. Проте відомо, що експланти більшості видів рослин краще ростуть у колбах на 250 мл.

***Температура.*** На ріст і регенерацію ізольованих тканин істотно впливають умови культивування експлантів: температура, освітлення, фотоперіод, відносна вологість повітря, склад живильного середовища.

Для більшості тканин температурний оптимум становить 24-25°С, але існують відмінності між деякими видами рослин. Очевидно, температурні умови, потрібні для вирощування материнської рослини, будуть оптимальними і при культивуванні ізольованих тканин. Для тканин теплолюбивих тропічних рослин температуру слід збільшити до 25-28°С.

Іноді у рослин у межах одного генотипу виявляють різні оптимуми температур. Так, під час дослідження морфогенної активності експлантів 14 різних гібридів троянди більшість сортів утворювала адвентивні пагони при 18°С, інші – при 12, а деякі – при 24°С. Формування цибулинок у Lilium auratum найефективніше відбувається за температури 20°С і поступово знижується у разі її зростання до 30°С.

Низькі значення температури (15-18°С) протягом 2 тижнів потрібні для індукції утворення пагонів у культурі черешків бегонії. Охолодження експлантів перед культивуванням тканин гладіолуса поліпшує їх регенераційну здатність. Для деяких видів рослин потрібне зниження температури для подолання періоду спокою. Культура тканин сосни поступово припиняє ріст, і його можна відновити зниженням температури культивування.

Для бруньок квітконосів фаленопсиса відмічено вплив температури на тип морфогенезу: при 28°С із бруньок регенерують вегетативні пагони, а при 20°С – генеративні.

Морфогенез експлантів часто залежить від температури вирощування материнської рослини. Регенераційна здатність листкових черешків у деяких видів бегонії зростає після витримування інтактних рослин при 15-18°С протягом 4 тижнів. Експланти Picea abies формують більше адвентивних бруньок після утримання при 10-16°С.

***Умови освітлення і фотоперіод.*** Як правило, ізольовані тканини вирощують за освітлення люмінісцентними лампами з урахуванням вимог

материнської рослини до інтенсивності освітлення і тривалості фотоперіоду.

Т. Murashige радить на етапах розмноження I і II культивувати тканини при 1000 5000 лк і фотоперіоді 14-16 год. Такі умови освітлення сприяють ініціації пагонів і коренів у більшості рослин. Низька інтенсивність освітлення спричинює зниження морфогенезу і вітрифікацію пагонів.

Так, культура пагонів Sinningia найкраще розвивається при 3000-10000 лк; зниження освітлення сприяє утворенню калусу. У експлантів Lolium multiflorum формується більше пагонів за освітлення 12 000 лк, ніж 9000 лк.

Збільшення освітлення експлантів Begonia hiemalis сприяло посиленому утворенню пагонів. Проте є рослини, що негативно реагують на інтенсивне освітлення. Так, пагони глоксинії краще проліферують і утворюють листки за освітлення 3200 лк, ніж 10700 лк. Максимальне утворення пагонів і коренів у культурі тканин аспарагуса відбувається при 1000 лк (фотоперіод 16 год); зниження інтенсивності освітлення пригнічує органогенез. Регенерація коренів у протокормів цимбідіума зростає за збільшення освітлення. У темряві або при 1250 лк протокорми утворюють лише бруньки, а пагони і корені формуються при 2200-2500 лк. Калусні тканини звичайно вирощують у темряві, оскільки культура клітин на середовищі з цукрозою не потребує фотосинтезу. Соматичний ембріогенез у культурі калусу здійснюється після перенесення на світло. Короткий період перебування у темряві іноді сприяє морфогенезу пагонів. Адвентивні бруньки на експлантах Picea pungens проліферують лише після того, як їх витримають у темряві протягом 8 діб, а потім перенесуть на світло (1000 лк, фотоперіод 16 год). Така закономірність спостерігається і у експлантів квітконосів фрезії. Утворення адвентивних бруньок значно зростає, якщо їх експланти спочатку культивувати у темряві, а потім на світлі. Для посилення регенерації пагонів експланти листків яблуні протягом 3 тижнів витримують у темряві. Морфогенний потенціал експлантів рододендрона зростає після культивування у темряві протягом 2 тижнів перед перенесенням на світло.

Інтенсивність і характер росту ізольованих тканин залежить також і від спектрального складу світла. Так, біле, червоне і синє світло інтенсивніше індукує утворення бруньок у тканині Heloniopris orientalis, ніж зелене. Червоне світло стимулює у тканині тютюну утворення

квіткових бруньок, а темнота – проліферацію коренів. Адвентивні бруньки в калусі тютюну індукує ультрафіолетове, синє та фіолетове світло. У експлантів салату і псевдотсуги червоне світло викликає утворення пагонів.

Тривалість освітлення впливає на морфогенез тканини і залежить від виду інтактної рослини. Так, для тканини Helianthus оптимальним є фотоперіод 12 год, що сприяє морфогенезу пагонів. У калусі герані максимальна кількість бруньок утворюється при фотоперіоді 16 год; зменшення або збільшення тривалості освітлення пригнічує морфогенез. У деяких сортів винограду проліферація пагонів і коренів відбувається інтенсивніше за короткого дня (фотоперіод 10 год); збільшення його тривалості спричинює некроз тканин. Є рослини, тканини яких не реагують на зміни фотоперіоду. Апікальні меристеми Pharbitis nil ростуть і утворюють пагони при фотоперіоді від 16 до 24 год, їх морфогенез не пригнічує постійне освітлення. Для більшості культур рекомендують фотоперіод у межах 14-16 год.

***Умови культивування рослин-регенерантів. Головні вимоги до навколишнього середовища.*** Перенесення рослин-регенерантів у субстрат є відповідальним етапом, що завершує процес МКР. Найсприятливіший час для пересадки пробірочних рослин – весна або початок літа. Не слід затримувати рослини у стерильній культурі, бо це негативно впливає на приживлюваність і подальший ріст регенерантів. Рослини, що мають 2-3 листки і добре розвинену кореневу систему, обережно виймають з колб довгим пінцетом або спеціальним гачком, корені відмивають від агару. Для отримання однорідного посадкового матеріалу слід сортувати рослини за розміром; великі, середні та невеликі рослини посадити окремо в пікірувальні ящики або плошки. Субстрат повинен мати велику вологоємність і повітропроникність. Як правило, для більшості рослин застосовують суміш торфу, піску і перліту (1:1:1). Для орхідних слід брати суміш сфагнового моху, листків бука або дуба, соснової кори (1:1:1).

Після звільнення від хвороб і вірусної інфекції для запобігання вторинному зараженню субстрати прогрівають при 90-100°С. Використовують суміш торфу з піском (3:1) або дерновим грунтом, перлітом (1:1:1).

Культивують рослини-регенеранти у спеціальній теплиці, де можна регулювати температуру (22-25°С) і вологість (65-80%).

Для кращих приживлюваності й росту доцільно розміщувати їх в

умовах підвищеної вологості, які забезпечують за допомогою туманоутворювальних приладів.

Добре укорінені рослини через 20-30 діб після пересадки слід підживити розчинами Кнудсона, Чеснокова, Ольсена залежно від виду рослин.

Надалі рослини-регенеранти вирощують згідно з розробленою для кожного виду технологією.

Комерційні структури з великим обсягом робіт по МКР рослин застосовують комп'ютерні програми вирощування. Хоча закладення програми забирає багато часу, але згодом стає необхідним і вигідним. Для цього потрібно, щоб усі посудини з культурами мали свій штрих-код.

***Завдання***

1. Описати генотип материнської рослини, як фактор впливу на регенерацію.
2. Який фізіологічний стан материнської рослини.
3. Описати тип експланта.
4. Яка місткість культурального посуду.
5. Які оптимальні температурні умови при культивуванні експлантів?
6. Які потрібні умови освітлення при культивуванні експлантів?
7. Яка тривалість освітлення при культивуванні експлантів для окремих культур (наприклад, для соняшнику, винограду)?
8. Описати умови культивування рослин-регенерантів.

# ТЕМА 7: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

***Мета:*** вивчення мікроклонального розмноження рослин та основні етапи їх оздоровлення

## *Теоретична частина*

Біотехнологія рослин найширше використовується у агротехніці для прискореного розмноження і оздоровлення цінних сортів сільськогосподарських культур. На основі цієї технології створена ціла індустрія мікроклонального розмноження рослин.

Мікроклональне розмноження – це безстатеве вегетативне розмноження в культурі *in vitro* , при якому отримують рослини генетично ідентичні вихідній батьківській формі, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. Цим методом можна розмножувати у короткі строки види, які важко розмножуються і рослини, які є в одному екземплярі, а також і стерильні генотипи. Особливої актуальності сьогодні набули дослідження по розробці методів мікроклонального розмноження рідкісних та зникаючих рослин. Багаточисельність, швидкість і високий коефіцієнт розмноження (1:1 000 000 ) дозволяє у 2–3 рази скоротити термін відбору і отримання нових рослин у селекційних дослідженнях.

Мікроклональне розмноження має цілий ряд переваг над традиційними методами розмноження рослин:

1) економія вихідного матеріалу;

2) отримання великого числа копій із мінімальної кількості рослинного матеріалу;

3) отримання генетично однорідного матеріалу;

4) можливість відбирати *in vitro* рослинний матеріал з бажаними ознаками;

5) можливість отримання безвірусного матеріалу;

6) можливість проводити розмноження рослин протягом цілого року, адже їх ріст і розвиток *in vitro* практично не залежать від сезону;

7) можливість отримувати у великих кількостях вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються у звичайних умовах;

8) економія площі;

9) можливість тривалого збереження пробірочних рослин при понижених температурах, що дає змогу створити банк цінних форм рослин.

Теорією і принципом розробки технології мікроклонального розмноження є положення про можливість індукції диференціації і органогенезу, виникнення біологічної форми із однієї рослинної клітини, її здатності утворювати цілу рослину. Клітина *in vivo* у складі тканини з певною диференціацією виконує вузьку специфічну функцію. Реалізація її тотипотентності *in vivo* послаблюється факторами і умовами, які мають місце на материнській рослині. Якщо ж клітина вилучається із рослини і поміщається у штучні контрольовані умови *in vitro*, то реалізується потенційна можливість відновлення рослини із клітини або групи клітин, тобто реалізується властива клітині тотипотентність. Прояв цієї властивості поки що виявлено у клітин, які називаються меристемоїдами.

Меристемоїди – це морфогенетично компетентні клітини, які відповідають на індуктори диференціації і склад середовищ формуванням пагонів, коренів, зародка. Морфологічно їх виявляють у калюсних культурах у компактних осередках клітин, що діляться, у вигляді дрібних, ізодіаметричних, тонкостінних клітин з великим ядром, густою цитоплазмою і практично без вакуолей. Саме з таких клітин складаються апікальні меристеми і клітини зародка. У тканинах, які отримали з цих органів найлегше індукувати органогенез. У зв’язку з цим регенерація із будь-яких клітин рослин можлива, якщо вдасться перевести ці клітини у меристемоїди, створивши відповідні умови.

Навіть у рослин з високим ступенем регенерації, наприклад у тютюну, клітин-меристемоїдів не так багато: у первинному калюсі на 1000 – 10000 клітин може бути один меристемоїд. Розподіл меристимоїдів по органах рослин нерівномірний, і різні види відрізняються за вмістом меристемоїдів у тканинах окремих органів. У зв’язку з цим першочерговим завданням є вибір частини рослини, яку можна використати як первинний експлантат. Найвищий ступінь регенерації виявлений у зародків, сім’ядолей, гіпокотилів, коренів, стебла, листка, бульб, суцвіття і пиляків.

Встановлено, що у багаторічних рослин, як і у однорічних, прояв тотипотентності клітин у тканинах і органах поточного року знижується на пізніших етапах. Це може свідчити про зниження у рослині концентрації меристемоїдів з віком або про поступове зниження їх компетентності. Так, регенерація рослин кукурудзи або кофе можлива із калюсу, який отримують із незрілих зародків, які виділені задовго до дозрівання насіння. Загальновідомо, що культури тканин, які отримали із молодих листків або стебел краще здатні до регенерації рослинок. Крім цього, розвиток

рослини супроводжується зниженням здатності тканин до ембріогенезу або органогенезу.

Кількість меристемоїдів можна збільшити їх відбором. Крім того, для подальшого розвитку меристемоїдів їх необхідно відділити від немеристемоїдних клітин, так як останні пригнічують ембріогенез у цих клітин, можливо, виділяючи інгібітори. Необхідність відбору меристемоїдів обумовлена і тим, що при тривалому культивуванні тканин зменшується здатність до регенерації.

Кількість меристемоїдів і реалізація тотипотентності у значній мірі залежать від умов, у які поміщають клітину перед або під час індукції регенерації. Серед них найважливішими є: освітлення, температура і склад середовища.

Сезонні зміни поведінки ізольованих тканин звичайно пов’язані із змінами фотоперіоду і температури. Відмічено, що вміст меристемоїдних клітин і найвищий ступінь регенерації спостерігаються в разі вирощування донорних рослин при оптимальних для даного виду фотоперіоді і температурі. Експлантати, відібрані від рослин, які росли при несприятливому фотоперіоді, утворюють мало або зовсім не утворюють регенерантів, навіть якщо фотоперіод при культивуванні буде оптимальним. У більшості лабораторій стандартом є 16–годинний фотоперіод, оптимальна інтенсивність освітлення 1000 Лк. Соматичний ембріогенез, як правило, відбувається в темряві – на світлі зародки передчасно проростають. Однак відомі випадки коли соматичний ембріогенез у калюсу *Nicotiana* стимулювало освітлення 10000 – 15000 Лк. Значення має і спектральний склад світла: утворення адвентивних пагонів у *Nicotiana tabacum* найкраще відбувається при освітленні калюсу ультрафіолетовою частиною спектра (371 нм), голубою (419 – 467 нм) або пурпурною (504 – 550 нм). У іншого виду *Lactuca sativa* утворення пагонів стимулювало освітлення червоним світлом (660 нм) і індукція знімалась при освітленні дальнім червоним (750 нм).

Для отримання великої кількості меристемоїдних клітин і прискорення органогенезу у різних видів рослин є температурні оптимуми. З метою індукції прискорення органогенезу застосовують обробку тканин листків або стебел субоптимальними температурами (15–18° С), що покращує регенерацію при подальшому культивуванні при 21–25° С. Для деяких рослин більш ефективною є короткочасна обробка нижчою температурою (4° С).

Важливу роль у регулюванні реалізації тотипотентності рослинною клітиною відіграють біологічно активні речовини фітогормональної дії, що входять до складу середовища, а саме, ІОК і цитокініни.

Отже, для успішної реалізації рослинною клітиною властивої їй тотипотентності необхідно враховувати такі моменти:

1) вибір первинного експлантата;

2) сезонність, вік первинного експлантата;

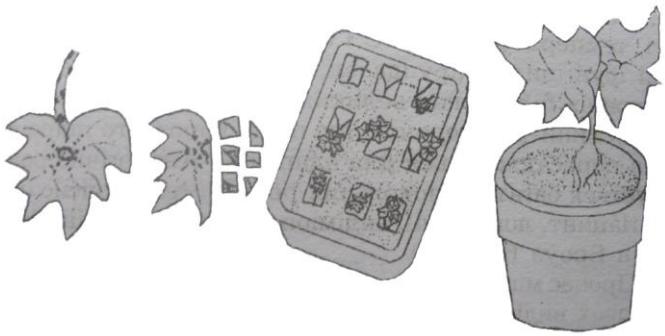
3) умови культивування експлантатів.

**Способи регенерації рослин**

Термін «регенерація» (від лат. regeneratio – відновлення) – в біології означає відновлення організмом втрачених або пошкоджених тканин (органів), а також відновлення цілого організму. У рослин висока регенераційна здатність притаманна практично всім клітинам.

Регенерацію рослин у культурі ін вітро можна здійснити такими шляхами:

1. Органогенез – утворення пагонів, коренів або рослин-регенерантів безпосередньо з експланту (апекс бруньки, листка, калусної тканини та ін.);



2. Культура зародків;

3. Соматичний ембріоїдогенез.

Класичним прикладом регенерації рослин шляхом прямого органогенезу є бегонія. Зрізують повністю сформований непошкоджений листок, перевертають його нижньою поверхнею догори і нарізають на 1–2 см квадрати (листові живці).

Листові живці розкладають зворотним боком листка або висаджують вертикально у субстрат (пісок – торф 1:1), який попередньо стерилізують. При високій вологості, температурі 18–21°С і фітосанітарному обприскуванні фунгіцидом (фундазол, каптан) приблизно через 5–6 тижнів біля зрізів великих жилок з’являються молоді рослини-регенеранти, які після короткого підрощування пересаджуються для адаптації. Аналогічно розмножується багато однодольних рослин: гелоніопсис, гіацинт, лошеналії, ендіміон, сансев’єра та ін. (М Милан Броуз П., 1992).

Поширеним методом мікроклонального розмноження є індукція органогенезу або соматичного ембріогенезу в недиференційованій калюсній тканині або суспензійній культурі клітин. Перехід до

морфогенезу контролюється співвідношенням фітогормонів у живильному середовищі. Модельною системою регенерації рослин внаслідок органогенезу є тютюн.

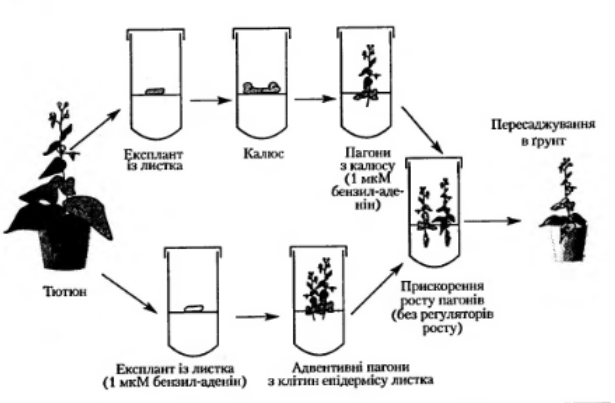



*Рис. 9.3.* Способи регенерації рослин на прикладі тютюну

Змінюючи концентрацію регуляторів росту в живильному середовищі, отримують пагони з калюсу або безпосередньо з експланта. Проте регенераційна здатність калюсу значною мірою залежить від генотипу вихідної рослини, віку, фізіологічного стану донорної рослини, походження експланта, тривалості та умов культивування. Ідеальним для мікроклонального розмноження є калюс із вмістом генетично стабільних диплоїдних меристемних клітин, аналогічних клітинам стеблового апекса, що постійно розмножуються і мають добре виражену здатність до утворення великої кількості регенерантів. За сприятливих умов калюс починає формувати меристемні осередки і започатковує або бруньки, або ембріоїди. Укорінений пагін із бруньок мікроживцюють, що значно підвищує коефіцієнт розмноження. Укорінення пагонів — обов'язкова умова регенерації цілої рослини.

Якщо утворення первинного (початкового), а згодом і пасажованого (субкультивованого) калюсу — завдання менш складне, то повторна диференціація адвентивних бруньок і ембріоїдів із калюсу потребує значних зусиль. Причина полягає в тому, що не всі тканини й органи рослин індукують придатний до регенерації рослин калюс. Насамперед це пов'язано з генетичними та фізіологічними змінами, що закономірно виникають в клітинах у процесі онтогенезу рослин, індукції дедиференціації та під час вирощування клітин в умовах in vitro. Молоді ембріональні тканини, такі як зародки, суцвіття, є найпридатнішими експлантами для вторинного утворення адвентивних пагонів. Позитивні результати пов'язані з емпіричним добором оптимальних співвідношень концентрації ауксинів і цитокінінів. Через генетичну нестабільність ця система рідко використовується для мікроклонального розмноження. Проте вона має певне значення для клітинного мутагенезу, добору на селективних середовищах, а також отримання сомаклональних варіантів.

До непрямого морфогенезу належить соматичний ембріогенез.

Утворення соматичних ембріоїдів безпосередньо з тканин експланта в умовах in vitro значною мірою подібне до формування зиготичних (статевих) зародків. Ця система є дуже перспективною для деяких видів рослин завдяки високому коефіцієнту розмноження. Наприклад, в одній колбі Ерленмейєра об'ємом 200 мл з 60 мл рідкого живильного середовища за 10—12 діб можна одержати 5—10 тис. ембріоїдів. Така висока потенційна здатність диференціювання соматичних зародків використовується як ефективний біотехнологічний засіб клонування деяких видів сільськогосподарських рослин.

Здатність до утворення соматичних зародків в умовах in vitro використовується для одержання штучного насіння методом формування капсул із новоствореними in vitro ембріоїдами.

Зародкоподібні структури — ембріоїди, на відміну від бруньок, одночасно розвивають апекси стебла і кореня. Перетворення калюсних клітин на ембріональні з подальшим формуванням із них ембріоїдів регулюється фітогормонами. Якщо для перетворення неспеціалізованих клітин калюсу на ембріогенні потрібні ауксини, то для утворення з них ембріоїдів фітогормони не потрібні, тому концентрацію ауксину знижують або його зовсім вилучають із середовища. Проте є види рослин, у яких індукція соматичного ембріогенезу здійснюється цитокінінами і гіберелінами.

Прикладом практичного використання ембріоїдів для розмноження рослин є так зване штучне насіння, так називають ембріоїди однакової стадії розвитку, вкриті полімерною оболонкою. Проте на практиці синхронізувати розвиток ембріоїдів складно. Для одержання однорідних за розміром і щільністю ембріоїдів, що виникли в суспензійній культурі, їх фільтрують крізь сита з певним діаметром пор або розділяють за градієнта щільності сахарози.

Нині розроблені методи масового одержання ембріоїдів однакової, строго визначеної стадії розвитку в суспензійних культурах моркви, люцерни, пшениці, рису, селери та ін. Однак для того щоб вони слугували насінням, їх треба вкрити оболонкою, здатною захистити від несприятливих впливів і зберегти життєздатність тривалий час. Крім того, оболонка має утримувати воду і забезпечувати стерильність всередині капсули на початку проростання ембріоїда. Доцільно в капсулу додавати поживні речовини для початкового розвитку соматичного ембріоїда, наприклад вуглеводи і мінеральні солі.

Слід зазначити, що рослини-регенеранти, отримані з меристеми (яка забезпечує генетичну ідентичність батьківським формам), принципово відрізняються від рослин, регенерованих із спеціалізованих і калюсних клітин. Для останніх характерна гетерогенність внаслідок можливих мутацій геному. Спонтанні мутації звичайно виникають в окремих клітинах меристемної тканини, наступні їх поділи призводять до утворення химер. Калюсна тканина, на відміну від меристемної, схильна до мутагенезу, і в утворених з неї рослинах часто спостерігаються генетичні зміни. Мутантні пагони in vitro можуть залишитися не визначеними, а зміни таких ознак, як форма листків, колір квіток, якість плодів, урожайність, інші кількісні ознаки, виявляються тільки після того, як пробіркові рослини висаджені в ґрунт. Наприклад, рослини аспарагусу, розмножені шляхом індукції розвитку пазушних меристем, не мають генетичних відхилень, тоді як рослини, регенеровані з калюсу, містять до 70% поліплоїдів. Тому у разі розмноження рослин методом непрямого морфогенезу використовують первинний калюс, отриманий з експлантів наймолодших, найменше диференційованих тканин різних органів.

Отже, найнадійнішим для одержання генетично однорідних пагонів вважається розмноження пазушними бруньками. Верхівки пагонів, апекси звичайно формують нові пагони з чітким апікальним домінуванням. Проте методи культивування пагонів із пазушних меристем дуже повільні і трудомісткі, потребують постійного відділення пагонів і їхнього укорінення. Ембріоїдогенез із калюсу і суспензійних культур має великі потенційні можливості швидкого вегетативного розмноження, робота з ембріоїдами зручніша, ніж із пагонами, а «штучне насіння» використовується в практиці сільськогосподарського виробництва.

**Фактори, що впливають на процес мікроклонального розмноження**

Найважливішим моментом є вибір материнської рослини й експланта, а також стерилізація вихідного матеріалу.

*Вибір материнської рослини.* Бажано, щоб вихідні рослини не були ушкоджені грибними, бактеріальними і вірусними хворобами. Цибулини, кореневища і бульби перед введенням у культуру in vitro попередньо обробляють виткими або низькими температурами протягом різного часу — від кількох годин до кількох місяців

*Вибір експланта.* Для забезпечення максимальної генетичної стабільності клонованого матеріалу і з метою уникнення появи

аномальних рослин як вихідний експлант використовують молоді, слабкодиференційовані тканини. Для цього найпридатніші кінчики стебел, бічні (пазушні) бруньки, зародки й інші меристемні тканини. Можна використовувати молоді листки, черешки, суцвіття, луску, денце цибулин. Проте в цьому разі потрібен цитологічний і морфологічний контроль регенерантів.

*Стерилізація вихідного матеріалу.* Для знезаражування вихідних експлантів використовують загальноприйняті методики. Проте часто внутрішнє зараження вихідних експлантів буває набагато сильнішим, ніж поверхневе, тому експланти попередньо обробляються фунгіцидами й антибіотиками проти грибної і бактеріальної інфекцій. Добрі результати дає обробка рослинного матеріалу бензоатом натрію. Більш того, потрібен ретельний фітосанітарний догляд за вихідними рослинами. Залежно від виду рослин використовують як тверді, так і рідкі живильні середовища, горизонтальне або вертикальне розташування експланта на живильному середовищі, також слід встановлювати оптимальне співвідношення обсягу експлантів і кількості живильного середовища, умови оптимального освітлення і газообміну експлантів. Методика мікроклонального розмноження докладно розроблена для багатьох видів рослин.

**Поєднання методу верхівочних меристем із термотерапією**

Окремі фізичні і хімічні фактори мають стимулюючу або пригнічуючу дію на віруси, а також на рослини, у яких вони репродукуються. До цих факторів належать температура, різні види випромінювання, постійне маннітне поле, pH середовища, деякі хімічні речовини.

Термотерапія рослин – один із ефективних методів профілактики і лікування вірусних захворювань. Піонером застосування термотерапії для лікування рослин вважають П. Кобуса, який у 1889 році використав гарячу воду проти вірусного захворювання цукрової тростини. Новий етап у розвитку термотерапії почався у 1935 р., коли американець Л. Кункель застосував гаряче повітря для лікування персика від жовтухи, дрібноплодності і розеточності.

Метод термотерапії меристем має свої особливості: якщо в умовах високих природних температур (30–50°C) вірус не інактивується повністю, то можливо одержати безвірусний матеріал з тих органів, які утворились при цій температурі. Застосування методу особливо ефективне при отриманні безвірусних рослин, які вегетативно розмножуються (картоплі,

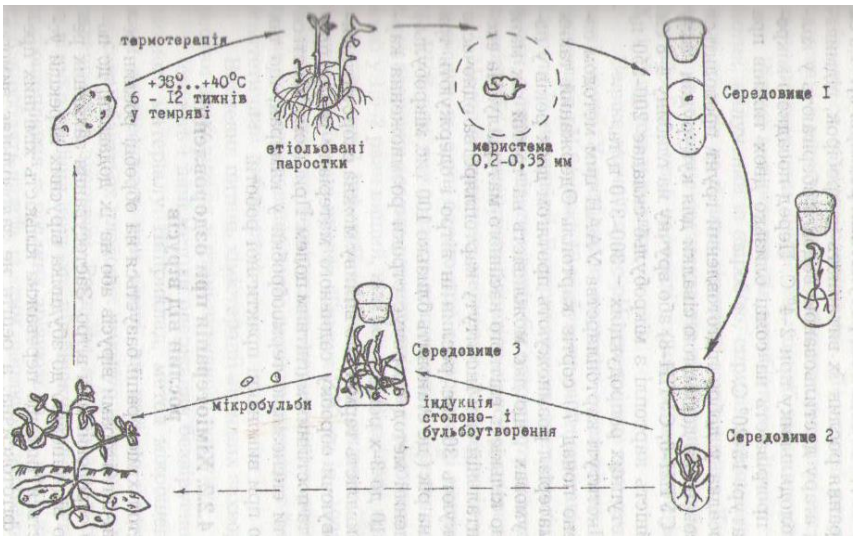
яблуні, кісточкових, винограду, хмелю, суниці, малини, квітів та ін.).

Широке впровадження в сільськогосподарську практику безвірусного садивного матеріалу картоплі стало можливим саме завдяки поєднанню методів верхівочних меристем і термотерапії. Спільною співпрацею вчених Росії, України і Бєларусі (Трофимец Л.Н., Бойко В.В., Остапенко Д.П., Резник В.С., Адамова А.И. та ін., 1988) розроблені основні елементи цієї технології, яка склається з таких етапів:

1. Термічна обробка матеріалу (бульб або укорінених верхівок).

2. Виділення верхівочних меристем і регенерація з них рослин.

3. Індукція столоно- і бульбоутворення. Одержання мікробульб картоплі ін вітро.




Для термотерапії відбирають вільні від зовнішніх інфекцій бульби, які ретельно миють. Бульби прогрівають у стерильному піску в спеціальних приміщеннях без освітлення, з вологістю повітря 75% і при температурі 37–38°С протягом 6–12 тижнів. Для різних сортів режими прогрівання можуть відрізнятися. Наприклад, для стійких до підвищених температур сортів картоплі бульби прогрівають при 40°С по 2–3 години на добу протягом 8 тижнів (рештки доби – при 16–20°С). Меристеми розміром 0,2–0,35 мм виділяють під бінокулярним мікроскопом з етіольованих паростків.

Для термообробки можна використовувати також укорінені верхівки, які зрізають з рослин картоплі і занурюють у розчин гетероауксину (50 мг/л). Термообробку проводять у спеціальних камерах або кімнатах при освітленні; температура повітря 35–37°С, ґрунту – близько 30°С; довжина світлового періоду – 16 год. Рослини поливають водою, яку нагрівають до 30°С. У таких умовах рослини вирощують протягом 4–6 тижнів, після чого з них виділяють пазухові бруньки і проводять всі етапи мікроклонального розмноження. Термообробку краще проводити восени або зимою, щоб встигнути закінчити її до початку вегетації.

Одержані рослини мікроживцюють і використовують для індукції

столоно- і бульбоутворення ін вітро. Ця процедура передбачає посадку мікроживців з невеличкими листочками на модифіковане середовище Мурасіге-Скуга (підвищена концентрація сахарози 4–10%). Ріст рослини відбувається протягом трьох тижнів при 9–10-годинному фотоперіоді для ранніх сортів картоплі і 6-8-годинному – для пізніх сортів. Після цього рослини на два тижні переводять на 16-годинний фотоперіод і висаджують у теплицю.

Застосування цього методу дозволяє за 3–4 місяці одержати 2–3 тис. рослин, придатних для висадки у грунт тобто близько 20 тис. мікробульб за 9–10 місяців з однієї рослини. Це має велике значення для елітного насінництва.

Після досягнення мікробульбами розмірів 0,7–1,8 см і відмирання рослин їх витягають із пробірок, відмивають від агару дистильованою водою і зберігають у колбах в холодильнику при 2–4° С. Перед посадкою мікробульби прогрівають на сонці близько двох тижнів при температурі 15–20°С.

Посадка у добре підготовлений ґрунт проводиться механізовано за допомогою сівалки для кукурудзи (типу СПЧ-6, СУПН-6, СУПН-8) або вручну на глибину 4–8 см. Урожайність картоплі з мікробульб складає 200–250 ц/га; у наступних репродукціях – 300–370 ц/га.

В Інституті картоплярства УААН цим методом оздоровлено понад 70 сортів картоплі. Одержаний таким чином матеріал розмножують протягом двох років у польових умовах, що дає можливість на третій рік мати достатню кількість елітного насінного матеріалу. На експериментальній базі Інституту картоплярства одночасно розмножують 30 тис. рослин ін вітро і одержують три врожаї на рік (це становить близько 100 тис. мікробульб). Розроблений метод скорочує строки розмноження картоплі з 10 до 3-х років.

Тривалість термічного впливу можна скоротити, використовуючи обробку садивного матеріалу гамма-променями та постійним магнітним полем. При цьому вдається зменшити експозицію термообробки у камерах, що так важливо при виконанні практичної роботи.

Проте застосування термотерапії у деяких випадках призводить до відставання у рості і деформації органів меристемних рослин, посилення латентної вірусної інфекції. Тому для підвищення ефективності виходу оздоровлених меристемних рослин використовують хіміотерапію.

*Хіміотерапія при оздоровленні рослин від вірусів*

Метод хіміотерапії базується на обробці рослин речовинами-інгібіторами вірусів або на їх додаванні до поживного середовища ін вітро. Застосування захисних речовин по відношенню до збудника вірусних інфекцій ускладнюється тим, що переважна кількість хімічних препаратів фітотоксична, а решта не задовольняє вимогам контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів.

Вчені вишукують антивірусні препарати, які виробляються самими рослинами. Позитивні результати одержані в цьому напрямку при використанні екстрактів лаванди, ромашки лікарської, шавлії та інших рослин.

Вивчення питань хіміотерапії вірусних захворювань рослин знаходиться у стані активного пошуку.

Існують і інші методи одержання безвірусного рослинного матеріалу. Наприклад, метод мікрощеплення, метод застосовують при умові, що насіння цитрусових, персика і багатьох плодових культур не передає віруси і залишається здоровим. Рослини, які виросли у пробірці ін вітро з насіння, готують під бінокулярною лупою для мікрощеплення – рослину зрізують, а на кінці залишка стебла роблять надріз, із яким щеплюють необхідний меристематичний експлант.

**Діагностика рослин на наявність вірусів**

Найважливіша перевага мікророзмноження – одержання величезної кількості рослин – може перетворитись у дуже небезпечний недолік, якщо матеріал не буде перевірений на чистосортність і відсутність вірусів. Особливо велике економічне значення при масовому виробництві садивного матеріалу має діагностика вірусів на всіх етапах оздоровлення.

Ідентифікація за морфологічними ознаками зустрічає ряд труднощів, бо зовнішні ознаки вірусних захворювань іноді бувають схожі з неінфекційними фізіологічними аномаліями у рослин, що виникають внаслідок незбалансованого живлення або надмірної кількості мінеральних добрив тощо. Крім того, вірус може знаходитись у рослині в прихованому (латентному) стані і зовнішні ознаки не виявляються.

Фізичні і біологічні особливості вірусів потребують специфічних методів їх діагностики. Сучасний стан досліджень передбачає використання таких методів діагностики на наявність у них вірусів:

– метод електронної мікроскопії;

– індикаторний (біологічний) метод;

– метод імунодіагностики (імуноферментний аналіз).

**Біологічний метод діагностики**

Біологічний метод діагностики вірусів оснований на використанні рослин-індикаторів. Це рослини, які чітк специфічно реагують на ураження вірусом. Індикаторних рослин багато, інколи по декілька для одного і того вірусу. Найбільш ефективні рослини-індикатори: лобода гігантська, лобода рисова, ТЮТЮН турецький, квасоля звичайна, шпинат новозеландський, дурман та ін. Лобода рисова відіграє у фітовірусології роль не меншу, ніж кишкова паличка E.coli при вивченні бактеріофагів, а мавпа – в онкологічних захворюваннях. Ця рослина чутлива до 36 видів вірусів. Навіть вірус жовтухи (гепатиту) людини може уразити лободу з утворенням некрозів на її листках. Це може бути своєрідною діагностикою захворювання.

Рослини-індикатори вирощують ізольовано, в теплицях на стерильному грунті. Їх спочатку висівають у горшечки, які попередньо знезаражують 5% марганцево-кислим калієм. Встановлено, що рослини-індикатори чутливіші при температурі 20–25°С і освітленості 8–10 тис. люкс. Такі рослини стають ще чутливішими, якщо їх витримати перед цим 36–48 год у темряві.

Для зараження слід використовувати молоді рослини (фаза 1–2 листка). Рослини-індикатори (6 і більше) заражують механічно – шляхом натирання їх листків соком дослідних рослин за допомогою шпателя. У плодових тест на наявність вірусів проводять на індикаторних рослинах шляхом подвійної окуліровки очками, у ягідних (суниця, малина, смородина) – методом щеплення зближенням або черешком листка.

**Практичне значення методу мікроклонального розмноження**

Метод мікроклонального розмноження посідає важливе місце у прискореному клонуванні плодових, ягідних, декоративних видів рослин і деревних порід. Вперше цей метод успішно застосував французький дослідник Ж. Морель у 1960 р. для розмноження орхідеї (Cymbidium). З одного вихідного експланта йому вдалося протягом року одержати близько 4 млн нових рослин, вільних від вірусної інфекції.

Позитивні результати одержано у разі використання цього методу для вегетативно розмножуваних рослин. Для деяких видів (особливо декоративних) метод клонального мікророзмноження in vitro ефективний з комерційного погляду. Для інших видів рослин він застосовується з метою створення елітного і суперелітного матеріалу. Практично кожен вид рослини може бути розмножений в умовах in vitro. Слід зазначити, що все

ж таки основною проблемою за широкого використання методу мікроклонального розмноження для деяких видів рослин залишається висока вартість отриманих клонів.

Метод мікроклонального розмноження має значення для оздоровлення вихідного рослинного матеріалу. Загальновідомо, що боротьба з вірусними хворобами багатьох сільськогосподарських культур — одна із найактуальніших проблем рослинництва в усьому світі, тому що з виробництва можуть зникати цінні сорти рослин. Особливо гострою є ця проблема для вегетативно розмножуваних багаторічних культур.

У 1952 р. французькі дослідники Морель і Мартен вперше одержали вільний від вірусних інфекцій садивний матеріал жоржини методом меристемних культур. На відміну від грибних і бактеріальних хвороб, що можуть бути усунуті методом хіміотерапії, меристемні культури є надійним методом оздоровлення від вірусів рослин, що вегетативно розмножуються. Він ґрунтується на тому, що у інфікованих рослин меристеми розміром від 0,1 до 0,3 мм є вільними від вірусів.

Крім методу культури меристем одержати здоровий садивний матеріал можна і шляхом регенерації рослин із калюсних, суспензійних і протопластних культур, в яких віруси, як правило, не розмножуються. Проте в цьому разі не можна забезпечити генетичну стабільність отриманого матеріалу.

Однією з важливих умов одержання безвірусного садивного матеріалу є наявність надійних методів тестування вірусів. У минулому використовували щеплення, електронно-мікроскопічні дослідження листків і соку чутливих до вірусів рослин-хазяїнів, а також різноманітні тести. Пізніше були розроблені точніші методи: ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) та імунна електронна мікроскопія. Проте найчутливішими методами, що дають змогу діагностувати не лише вірусні, а й віроїдні патогени, є методи моноклональних антитіл і ДНК-зондів. В Україні дослідження з розробки методів тестування вірозів, а також методів оцінювання оздоровлених від вірусних інфекцій меристемних культур проводяться в Національному аграрному університеті та Нікітському ботанічному саду.

Введення в практику надійних, швидких і дешевих методів тестування забезпечує виробництво здорового садивного матеріалу, а також його підтримання в процесі розмноження. Поєднання мікророзмноження з методами діагностики є необхідною ланкою

одержання якісної продукції.

Обговорюючи практичне значення методу мікроклонального розмноження, варто підкреслити його широкі можливості стосовно прискорення селекційного процесу, тривалого підтримання і зберігання цінних генотипів, а також розширення можливостей мутагенезу, розхимерювання тканин і добору цінних мутантних форм в умовах in vitro. Використання мутаційних змін — значно поширений і визнаний метод селекції рослин, що вегетативно розмножуються. Тому використання мікроклонального розмноження методом прямого органогенезу з цілих експлантів може виявитися надійнішим методом реалізації деяких бажаних генетичних змін у рослин, ніж традиційні.

Химерність, що виникає після обробки насіння, бруньок мутагенами, є основним бар'єром у разі виявлення і використання мутагенних змін у рослинах. У цьому випадку клональне мікророзмноження рослин in vitro розглядається як найдоцільніший засіб розхимерювання соматичних тканин, а також як засіб переходу з однієї форми химерності в іншу або зберігання химерності залежно від генетичної ознаки.

Виходячи з фенотипового прояву і локалізації змінених тканин у рослині, химери розділяють на три групи: мериклональні, периклональні і секторіальні.

Часто у практичній діяльності селекціонер стикається з проблемою підтримання і швидкого розмноження одержаних цінних генотипів. Якщо це пов'язано з певними біологічними і генетичними бар'єрами, то використання таких генотипів у селекції практично неможливе. У цьому відношенні мікроклональне розмноження використовується для вирішення низки селекційних завдань, пов'язаних з такими проблемами:

– у багатьох видів рослин (наприклад, капусти, моркви, буряків, томатів тощо) комерційне значення мають лише гібриди 1-го покоління ($F_1$); виробництво гібридного насіння, а також підтримування вихідних батьківських форм, представлених самозапилюваними лініями (часто самонесумісними), є надзвичайно трудомістким; застосуванням методу мікроклонального розмноження вирішують ці проблеми;

– одержання гібридів $F_1$ сільськогосподарських культур часто ґрунтується на використанні цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС); підтримання генотипів з цією ознакою пов'язане з тривалим процесом зворотних схрещувань (беккросуванням); у деяких випадках потрібно мати лінії-відновники ЦЧС, що також пов'язано із серією

схрещувань і послідовного добору чоловічостерильних форм серед гібридних комбінацій.

Якщо немає генетичних маркерів, то добір генотипів із ЦЧС проводять на рослинах у період їх цвітіння. Такий добір особливо тривалий у рослин із ЦЧС, зумовленою ядерними чинниками. У деяких видів цибулі, цукрових буряків такі стерильні форми можна підтримувати методами мікроклонального розмноження in vitro. Цей метод рекомендований для виробництва, наприклад, гібридного насіння томатів. Якщо чоловіча стерильність відсутня, то виробництво гібридного насіння таких видів рослин дорожчає. Розмноження гібридних рослин методом одержання мікроклонів в умовах in vitro є економічно вигіднішим порівняно з отриманням гібридів шляхом ручного запилення. Передбачається, що в деяких овочевих культур, що вирощуються з розсади, ціна рослин, отриманих методом клонального розмноження, не перевищуватиме ціни на звичайну розсаду. У протилежному випадку потрібно створити нові машини або реконструювати існуючі види рослин, для яких вирощування з розсади не є типовим; удосконалювати й автоматизувати методи мікроклонального розмноження, що дають змогу вирощувати дешеву розсаду методом in vitro. В цілому, економічний аналіз свідчить про перевагу цього методу перед класичним методом виробництва гібридного насіння.

***Завдання***

1. Які переваги мікроклонального розмноження порівняно з традиційним?
2. Які фактори впливають на процес мікроклонального розмноження?
3. Яке практичне значення методу мікроклонального розмноження?
4. Що таке меристемоїди та які їх морфологічні ознаки?
5. Описати способи регенерації рослин на прикладі тютюну.
6. Описати регенерацію рослин шляхом прямого органогенезу.
7. Описати схему меристемного методу одержання безвірусного матеріалу картоплі.
8. Що таке термотерапія та які її переваги і недоліки під час культивування меристем?
9. Що таке хіміотерапія та які її недоліки при оздоровленні рослин від вірусів?
10. Що таке діагностика рослин на наявність вірусів?
11. Що таке біологічний метод діагностики?

# ТЕМА 8: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

***Мета:*** вивчення мікроклонального розмноження злакових культур

## *Теоретична частина*

У зв'язку з тим що більшість злаків і кормових трав легко розмножуються насінням, отримання культури тканин in vitro злаків, індукцію в них органогенезу і регенерацію зелених рослин використовують лише як основу для генної інженерії і створення трансгенних рослин, прискорення утворення нових сортів за рахунок гаплоїдів і гомозиготних ліній подвійних гаплоїдів при культивуванні пиляків і мікроспор. Останнім часом досягнуті великі успіхи в розробці методів отримання калусних або суспензійних культур злаків, здатних до регенерації і ембріогенезу. Такий прогрес став можливим завдяки використанню експлантів, що містять меристематичні зони (кінчики кореня, примордії пагонів, основи молодих листків, зародки, суцвіття) та нових середовищ, розроблених на основі середовищ MS та Chu N6.

Лише молоді, новоутворені листки або базальні частини листків злакових, які активно ростуть, можуть формувати калус в умовах in vitro. У процесі отримання калусних культур із тканин злакових встановлено, що найкраще утворюється калус із щитка, клітини якого здатні до проліферації in vitro, або з тканин мезокотиля. У різних видів злакових оптимальна орієнтація щитка відносно поверхні живильного середовища може бути різною.

Для отримання ембріогенних калусів злакових використовують середовища, в основу яких покладено середовища MS, Green, Carman (досить часто з подвоєною концентрацією солей), а також Chu N6.

Для стимуляції утворення ембріогенного калусу злакових середовище MS часто доповнюють гідролізатом казеїну (100-200 мг/л), казамінокислотами (500 мг/л) і/або глютаміном (500 мг/л).

Найкращий ріст калусу із зародків ячменю, жита і вівса спостерігали у разі контакту щитка із середовищем, а із зародків кукурудзи – коли щиток був орієнтований назовні.

Відповідно до сучасних уявлень основний спосіб регенерації у Gramineae – це соматичний ембріогенез і утворення таких морфогенетичних структур, як адвентивні пагони, що в багатьох випадках

беруть початок із соматичних проембріо. Появу зелених листкоподібних структур, із яких іноді утворюються пагони, зв'язують із розростанням щитка соматичних зародків, що передчасно проростають і дають початок багатьом точкам росту пагонів, які можна укорінювати.

Для ембріогенезу спочатку потрібно отримати ембріогенний калус. Перед індукцією морфогенезу на калусах злакових можна спостерігати зелені ділянки. Дисперсне їх розміщення серед недиференційованої тканини пояснюють швидшою проліферацією дедиференційованих клітин, які знаходяться поруч із зеленими ділянками. Останні вважають центрами синтезу регуляторів росту, завдяки чому створюються їх градієнт і індукція соматичних зародків.

Як згадувалось раніше, найпоширенішим способом отримання ембріогенного калусу злаків є використання незрілих зародків. Найчастіше калус утворюється із щитка, іноді з епібласта. З експлантів одного походження можуть утворитися калуси з різним ембріогенним потенціалом. Ознаки ембріогенного калусу у різних видів злакових різні. Для його індукції (стадія I) використовують середовище з ауксином, найчастіше з 0,2-1,0 мг/л 2,4-Д або одночасно 2,4-Д і ІОК (1,8 мг/л) чи НОК (1 мг/л). Для деяких видів замість 2,4-Д додають піклорам або дікамбу.

Експланти незрілих зародків іноді замість утворення калусу передчасно проростають. Для попередження цього явища у середовище вносять 0,1-0,5 мг/л АБК. Соматичний ембріогенез іноді вже спостерігають на середовищі стадії 1, але, як правило, для утворення соматичних зародків ембріогенний калус переносять на середовище стадії II. В останньому зменшують концентрацію ауксинів (часто замінюють 2,4-Д на "більш легко діючу" ІОК) і додають цитокініни (0,5-1,0 мг/л БАП, 0,2-5,0 – кінетину, 1 мг/л 2-iP чи зеатину). Є відомості, що внесення в середовище для індукції калусу нітрату срібла (100-200 мкмоль) збільшує вихід рослин-регенерантів із ембріогенного калусу кукурудзи.

У деяких випадках, наприклад при індукції утворення соматичних зародків з калусу, отриманого з незрілих зиготичних зародків кукурудзи, у середовище стадії II не вносять регулятори росту.

Для цього процесу має значення створення оптимального водного потенціалу середовища й осмотичного тиску. Останній (для стадії II) створюється за рахунок підвищеного вмісту цукрози (50-60 г/л), або цукрози (20 г/л), манітолу (30 г/л) і 50 г/л поліетиленгліколю з

молекулярною масою 8000.

***Регенерація рослин із калусних тканин кукурудзи***

Здатність соматичних клітин кукурудзи до проліферації in vitro, калусоутворення, органогенезу і регенерації рослин є основою нових підходів до прискорення селекційного процесу і застосування методів генної інженерії для поліпшення цієї культури. Як первинні експланти найчастіше використовують недозрілі зародки. В умовах культури in vitro утворюється калус, інтенсивність росту і регенераційна здатність якого залежать від генотипу. Деякі автори описують утворення різних типів калусів, що відрізняються як зовнішнім виглядом, так і здатністю до регенерації. Так, Т.Н. Чеченєва спостерігала формування калусів трьох типів: I – компактний, щільний, білий калус з ділянками зеленуватого кольору, здатний до органогенезу; II – пухкий, світло-жовтий з позеленілими ділянками, в якому формуються ембріоїди; III – безкольоровий калус, позбавлений регенераційного потенціалу. Регенерація рослин з калусів I та II типів відбувається внаслідок морфогенезу пагонів та соматичного ембріогенезу. Встановлено, що існує генетичний контроль регенераційної здатності у кукурудзи.

Найчастіше використовують недозрілі зародки рослин кукурудзи розміром 1,0-1,5 мм і віком 12-14 діб після запилення. Для культивування ізольованих зародків використовують середовище MS з додаванням 1,0-1,2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л аспарагіну і 30 г/л цукрози. Культивування проводять у пробірках (по два зародки на пробірку) з 10 мл середовища при 23±1°С і фотоперіоді 16 год.

Калусні культури культивували до регенерації 60-90 діб, а в окремих випадках – до 9 міс. Перенесення калусної тканини на таке ж середовище без 2,4-Д і аспарагіну, але з додаванням 0,1 мг/л НОК і зменшеним вмістом цукрози (20 г/л) стимулювало в умовах освітлення утворення рослин-регенерантів і формування коренів. Рослини з досить розвиненою кореневою системою і листочками пересаджували в посудини з ґрунтовою сумішшю і декілька діб витримували у вологій камері при 22-24°С, освітленні 2000-2500 лк і фотоперіоді 16 год. Через 2-3 тижні рослини висаджували у вегетаційні посудини і дорощували до зрілого стану в теплиці.

Здебільшого для регенерації з калусу кукурудзи немає потреби в наявності у середовищі цитокінінів, але за певних умов їх застосування ефективне. В інших випадках пропонують після культивування протягом

2-3 пасажів на середовищі з 2,4-Д переносити калуси на регенераційне середовище без нього, але з додаванням БАП (3,5 і 5,0 мг/л). Калуси на середовищі з БАП витримують в умовах освітлення упродовж 7-8 діб, після чого переносять на середовище без БАП і 2,4-Д і до кінця пасажу спостерігають утворення рослин-регенерантів.

***Суспензійна культура пшениці як джерело соматичних зародків***

В останнє десятиліття інтенсивно розробляють методи отримання ембріогенних суспензійних культур злакових і кормових трав, вирощених з ембріогенних калусів.

Регенерацію нормальних рослин пшениці із суспензійних культур спостерігали багато дослідників. Метод, розроблений A. Ahuja, полягає в тому, що спочатку отримували калус із основи листків асептично вирощених проростків пшениці на середовищі MS з 2 мг/л 2,4-Д, який потім пересаджували на це ж середовище з нижчим вмістом ауксинів (0,05 мг/л НОК) та цитокінінів (0,5 мг/л БАП). Калуси, що швидко росли на цьому середовищі, переносили в рідке середовище MS. Середовише змінювали кожні 3 тижні, поки не утворювалась однорідна суспензія клітин, яку підтримували субкультивуванням кожні 2 тижні (суспензію ділили на 3 рівні частини і додавали свіже середовище до початкового об’єму). Через 4 міс клітини переносили на тверде середовище MS з 0,05 мг/л НОК та 0,5 мг/л БАП. При культивуванні в умовах освітлення (700 лк) спостерігали утворення зелених рослин-регенерантів. Автори зазначають, що мала місце поява альбіносних і строкатих рослин.

Ембріогенну суспензійну культуру використовують у дослідженнях з метою застосування селекції клітин, стійких до стресових факторів навколишнього середовища і фітопатогенів. Однак при культивуванні клітин у вигляді суспензії швидко накопичуються цитологічні і каріологічні порушення, які спричинюють втрату здатності до морфогенезу і регенерації, появу альбіносних рослин тощо. Культури тканин злакових через декілька місяців можуть втратити здатність до морфогенезу.

W. Wang і H. Nguen запропонували свій метод отримання і культивування ембріогенної суспензії Triticum aestivum, яка зберігає здатність до регенерації протягом декількох років. Калуси формувались із незрілих зародків пшениці (сорт Мустанг) на середовищі MS з 1 мг/л 2,4-Д. Молоді калуси розрізали на дрібні шматочки (0,2 мм) і переносили в рідке середовище такого ж складу (2 г калусу на 10 мл середовища). Після

культивування протягом 3-4 тижнів кожні 2 тижні додавали 5-10 мл свіжого середовища. Вільноплавні клітини відкидали. Агреговані фракції переносили в середовище зі зменшеною концентрацією ауксину (0,25 мг/л 2,4-Д) або культивували упродовж 3 міс без додавання свіжого середовища. Суспензію проціджували, відбирали і відкидали клітинні агрегати з корінцями. Агрегати без корінців, що могли бути компетентними до утворення пагонів протягом 2 міс, субкультивували кожні 3-4 тижні додаванням свіжого середовища MS з 0,25 мг/л 2,4-Д, замінюючи 2/3 суспензії цим середовищем. Коли в суспензії починався активний поділ клітин, період субкультивування зменшувався до 10-14 діб. Під час висіву цієї суспензії клітин на середовище MS, що містить 0,1-0,25 2,4-Д, отримували калуси, які переносили на таке ж середовище з 0,1 мг/л 2,4-Д для їх росту, а потім на середовище MS, розбавлене вдвічі і без гормонів, – для укорінення пагонів.

***Органогенез у культурі in vitro пиляків і мікроспор***

*Культура in vitro пиляків пшениці.* Створення гаплоїдів і гомозиготних подвоєних (doubled) гаплоїдних ліній через культуру in vitro пиляків або мікроспор може значно прискорювати виведення нових сортів. Культуру пиляків використовують при селекції таких основних культур, як пшениця, ячмінь, рис, ріпак і картопля.

Гаплоїдні й дигаплоїдні рослини використовуть також у фундаментальних генетичних дослідженнях, оскільки в них експресія рецесивних генів має фенотипний прояв. Вони можуть бути матеріалом для картування геному, генетичного аналізу кількісних ознак, вивчення взаємодії генів. Використання гаплоїдів має переваги при геномному аналізі, дослідженні еволюції геномів та багатьох інших теоретичних питань сучасної генетики.

Однак рутинному використанню методу культури пиляків перешкоджає чітка залежність індукції ембіроїдів і регенерації зелених рослин від генотипу. У багатьох генотипів вихід гаплоїдних рослин занадто низький для використання в практичних цілях, тому для створення нових сортів вплив генотипу на ембріогенез і регенерацію потрібно зменшити внаслідок удосконалення методу. Основним фактором, що визначає успіх застосування культури пиляків для отримання гаплоїдів у пшениці, є середовище для індукції ембріоїдів. Існує декілька модифікацій стандартних середовищ для підвищення частоти індукції ембіроїдів і регенерації зелених рослин.

Не дивлячись на інтенсивне (екстенсивне) дослідження і накопичення даних щодо андрогенезу у пшениці, використання подвійних гаплоїдів у селекції пшениці дуже обмежене і для їх отримання застосовують інші методи, наприклад схрещування пшениці з кукурудзою. Причиною недостатнього використання андрогенезу є низький рівень регенерації, який не може забезпечити потреби практичної селекції. Низький рівень регенерації, в свою чергу, є, можливо, результатом недостатньо розробленого методу культури тканин або особливостей генотипу. Створюється враження, що для отримання достатньої кількості подвійних гаплоїдів через андрогенез потрібно оптимізувати умови культивування для кожного окремого генотипу.

Для індукції андрогенетичної відповіді в культурі пиляків пшениці використовують цілу низку середовищ для індукції, таких як Chu N6, W14, Chu 90, а також середовища з компонентами невизначеного складу, наприклад середовища з екстрактом картоплі P2 і P4.

Встановлено, що середовище W14 забезпечує утворення великої кількості ембріоподібних структур у культурі пиляків ярової та озимої пшениці. M. Puolimatka і L. Pauk використовували середовище W14 з додаванням 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кінетину та 100 г/л цукрози (pH 6,0). За даними цих авторів, середовище W14 може утворювати багато подвійних гаплоїдів у широкого спектра генотипів пшениці. Встановлено, що на вихід ембріоподібних структур і кількість зелених регенерантів впливає тривалість періоду індукції. Кількість ембріоподібних структур, здатних до регенерації, та зелених регенерантів була найвищою за тривалості періоду індукції 6-7 тижнів. Середовище W14 містить сульфат натрію і не містить нітрату амонію, чим істотно відрізняється від середовищ Chu N6 та Chu 90.

B. Orshinsky вивчав вплив трьох різних середовищ на індукцію ембріоїдів, регенерацію рослин і частоту спонтанних і індукованих подвоєнь хромосом на прикладі 10 сортів ярової пшениці. Вихідне середовище для культури пиляків N6 модифікували зменшенням у 2 рази концентрації основних компонентів і використанням глюкози замість цукрози як джерела вуглецю. Друге середовище – MN6 – це модифіковане середовище N6 з мальтозою. Основний компонент третього середовища P4, описаного H. Zhou та співавт., – екстракт картоплі.

Пагони відбирали в період розвитку мікроспор середньої або пізньої одноядерної стадії, стерилізували 70%-м етанолом і у стерильних умовах вилучали колос. Пиляки фарбували ацето- карміном і розглядали під

мікроскопом для перевірки стадії розвитку мікроспори перед культивуванням, а потім переносили в пластмасові чашки Петрі (10 × 35 мм), які містили 2 мл середовища. Усього відбирали 45-60 пиляків на колос і по 15-20 пиляків на чашку, культивували 7-8 тижнів. З 3-4-го тижня після початку культивування чашки перевіряли через кожні декілька діб, шоб встановити утворення ембріоїдів. Пружні, добре розвинуті ембріоїди діаметром 2-3 мм переносили в пластикові чашки Петрі розміром 20 × 100 мм з 25 мл агаризованого середовища для регенерації. Ембріоїди витримували в умовах тьмяного флуоресцентного освітлення (16 год світла/8 год темряви на добу) при постійній температурі 25 °С. Ембріоїди утворювались через 3-4 тижні після посадки пиляків.

Аналіз отриманих оптимальних результатів засвідчує, що культивування пиляків у середовищі N6 з мальтозою зумовлює найвищу частоту індукції ембріоїдів у деяких сортів, а середовище Chu 90 є найбільш ефективним для всіх сортів.

Автори відмічають, що ембріоїди, які утворюються найраніше, є компактними і найкраще розвиненими. їх якість погіршується в більш пізні строки індукції: вони дрібні і погано розвинені. Трохи більше ніж 10% ембріоїдів, що утворилися на середовищах N6 і Р4, регенерують зелені пагони. Є відомості, що вихід подвійних гаплоїдів пшениці в культурі пиляків можна збільшити за допомогою колхіцину.

*Культура мікроспор пшениці.* Останнім часом культура ізольованих мікроспор набуває все більшого значення для індукції гаплоїдних рослин пшениці. Порівняно з культурою пиляків і індукцією гаплоїдів in vivo, культура мікроспор має декілька цінних переваг. Насамперед треба відмітити, що при використанні культури ізольованих мікроспор можна спостерігати під мікроскопом процес їх андрогенного утворення, починаючи з самих ранніх стадій розвитку, індукцію зародків і диференціацію. Оскільки культура ізольованих мікроспор дає можливість прямого доступу до зародків, що розвиваються, вони можуть бути об’єктами для переносу генів. Мікроспори або молоді зародки також можна використовувати в дослідах з клітинної селекції. Аналіз і оптимізацію факторів, які є критичними для індукції андрогенних зародків і раннього їх розвитку, можна робити тільки при культивуванні мікроспор. У деяких видів кількість зародків на пиляк при використанні культури ізольованих мікроспор вище, ніж при культивуванні пиляків.

Для отримання ембріогенезу з мікроспор відбирають колоски з

донорних рослин, вирощенних у теплиці (фотоперіод 16 год, температура вдень 19, вночі 14°С) і піддають їх дії холоду (3-14 діб, 4°С, темрява). Після поверхневої стерилізації 70%-м етанолом із центральної частини колоса відділяють лусочки. Пиляки з мікроспорами в пізній одноядерній чи ранній двоядерній стадії видаляють і витримують у 3 мл середовища для промивання. Мікроспори вивільняють у середовище після продавлювання пиляків стерильним предметним склом. Суспензію мікроспор ще більше розбавляють додаванням 10 мл середовища для промивання, фільтрують крізь сито в 100 мк меш і центрифугують 3 хв при 65g. Осад обережно ресуспензують у 2 мл індукційного середовища і переносять у чашки Петрі (35 × 10 мм). У кожній чашці міститься приблизно $8 \times 10^4$ мікроспор, виділених із 80 пиляків. Культури інкубують у темряві при 27°С без покачувань. Сформовані зародки переносять на тверде середовище MS для регенерації з 0,3% Фітогелю, де при 27°С і 16-годинному освітленні відбувається регенерація гаплоїдних або спонтанно подвійних гаплоїдних рослин.

Хоча при культурі ізольованих мікроспор частота утворення ембріоїдів у 20 разів більша, ніж при культурі пиляків, вихід зелених рослин-регенерантів на 100 зародків не підвищується однаковою мірою. Відмічено, що найбільший їх вихід має місце, коли зародки переносять на регенераційне середовище через 25 діб після виділення мікроспор. Якщо розмір зародків перевищує 4 мм$^2$, утворюється в 2 рази більше зелених рослин, якщо менше 1 мм$^2$ – можна отримати тільки декілька рослин-регенерантів. Витримування культури зародків на середовищі для індукції до 45 діб викликає різке зниження ефективності регенерації. Від розміру зародків залежить також частота утво рення альбіносних рослин. У дослідах C. Kunz найбільша ефективність регенерації спостерігалась тоді, коли зародки, що утворились із мікроспор, переносили на регенераційне середовище відразу після 25 діб культивування на середовищі для індукції. Крім того, із зародків, розмір яких перевищує 4 мм$^2$, помітно більше утворюється здорових рослин-регенерантів і менше – альбіносних, ніж із зародків, менших за розмірами. Хоча при культурі ізольованих мікроспор частота утворення ембріоїдів у 20 разів більша, ніж при культурі пиляків, вихід зелених рослин-регенерантів на 100 зародків не підвищується однаковою мірою. Відмічено, що найбільший їх вихід має місце, коли зародки переносять на регенераційне середовище через 25 діб після виділення мікроспор. Якщо розмір зародків перевищує 4 мм$^2$, утворюється

в 2 рази більше зелених рослин, якщо менше 1 мм$^2$ – можна отримати тільки декілька рослин- регенерантів. Витримування культури зародків на середовищі для індукції до 45 діб викликає різке зниження ефективності регенерації. Від розміру зародків залежить також частота утво рення альбіносних рослин. У дослідах C. Kunz найбільша ефективність регенерації спостерігалась тоді, коли зародки, що утворились із мікроспор, переносили на регенераційне середовище відразу після 25 діб культивування на середовищі для індукції. Крім того, із зародків, розмір яких перевищує 4 мм$^2$, помітно більше утворюється здорових рослин-регенерантів і менше – альбіносних, ніж із зародків, менших за розмірами.

Для отримання мікроспор використовують метод високочастотного перемішування або розтирання (mixing or blending), а також метод роздавлювання пиляків накривним склом. За допомогою останнього можна отримати гомогенну популяцію мікроспор без домішок, що дає змогу обійтися без центрифугування в градієнті щільності.

***Культура пиляків жита.*** У практиці застосування технології отримання подвійних гаплоїдів жита (Secale cereale L.) існують труднощі, пов'язані зі слабким утворенням калусу і ембріоїдів, низькою часткою ембріоїдів, які дають початок рослинам, і великою – альбіносних рослин серед рослин-регенерантів. Порівняно кращі результати отримують при використанні ліній жита, які мають у своєму родоводі S. Vavilonii, однак низка небажаних ознак, таких як самозапилювання, робить ці лінії непридатними до використання у селекції жита.

Останнім часом вдалося відібрати деякі лінії жита, які дають досить високий рівень регенерації зелених рослин при використанні методу культури пиляків. S. Immonen і H. Anttila вивчили вплив складу середовища і густоти посадки пиляків на 1 см$^2$ чашки Петрі на регенерацію зелених рослин у культурі пиляків жита.

Насіння різних сортів жита висівали в горщики діаметром 14 см із сумішшю торфу з землею (3 насінини на горщик) і підживлювали 1%-м розчином Superex (11% N, 4% P і 25% K). Озиме жито сіяли в жовтні, яровизація відбувалася в холодній теплиці протягом зими, після чого ріст здійснювався за температурного режиму 20°C вдень і 15°C вночі, фотоперіоду 16 год. при денному світлі з досвічуванням флуоресцентними лампами, щоб загальна інтенсивність світла досягала 350 мкм / (м$^2$ × с). Ярові сорти висівали в березні і вирощували в подібних контрольованих умовах теплиці. Колоски відбирали в період, коли мікроспори були в

середній або пізній одноядерній фазі. Пагони зрізали і відділяли усі листки, за винятком флатового. Пагони упаковували в пластикові мішки і витримували 2 тижні при 4°С, поставивши стебла у воду. Перед виділенням пиляків визначали фазу розвитку мікроспор, готуючи давлені препарати пиляків в ацетокарміні. Колоски стерилізували збовтуванням протягом 20 хв у 12%-му розчині гіпохлориду натрію з 0,5% твін 80. pH середовища доводили до 5,8 перед стерилізацією в автоклаві (15 хв при 121°С)

Культивували в стерильних чашках Петрі діаметром 5,4 см. Для індукції використовували середовище Ванг і Ху, 190-2 з додаванням вітамінів і заліза за Мурасіге-Скугом, 9 мкмоль/л 2,4-Д, 2,3 мкмоль кінетину, 9% мальтози і 3% Фітогелю (комерційний замінник агару). Культури витримували при 25°С у темряві 8-10 тижнів. Ембріогенні калуси переносили на середовище 190-2 з додаванням вітамінів за Мурасіге-Скугом, 0,27 мкмоль/л НОК і 2,2 мкмоль БАП для регенерації рослин.

Культури після пересадки витримували при 21°С і фотоперіоді 16 год/8 год (день/ніч) протягом 5 тижнів, після чого зелені рослини висаджували в горщики із сумішшю торфу і землі.

*Культура пиляків кукурудзи.* В основі селекційної роботи з кукурудзою лежить використання інбредних (чистих) ліній, створення яких триває 6-7 років. Для прискорення цього процесу використовують гаплоїди, які у кукурудзи можуть з’являтися спонтанно, та гаплоїдні рослини, вирощені з гаплоїдних пилкових зерен через культуру пиляків.

Перші успіхи при використанні пиляків кукурудзи отримали китайські вчені, однак тільки в останні роки ефективність дослідження ембріоїдів андроген ного походження in vitro значно зросла. Нижче наводимо метод культури пиляків і отримання рослин-регенерантів, розроблений Т.Н. Сатаровою, в основу якого покладено використання середовища Дженовезе YP.

Донорні рослини кукурудзи для отримання пиляків вирощували в умовах ґрунтової теплиці в січні-березні за температури повітря 22-27°С і фотоперіоду 16 год. Рослини зрізали до виходу волоті з розтрубу листків. Холодову передобробку матеріалу здійснювали при 8°С протягом 14 діб у холодильнику. Впливу холоду піддавали або волоті, загорнені в мокрі паперові рушники і поліетиленові пакети, або висаджені на живильне середовище пиляки – у цьому випадку ефективність холодової обробки

була вищою. Стадію розвитку пилку визначали в день посадки пиляків на живильне середовище для кожної зрізаної волоті окремо. Після передобробки холодом на центральному стрижні волоті вибирали ділянки, що містили пиляки з пилковими зернами на відповідній стадії розвитку, і тільки пиляки висаджували на живильне середовище.

Для культивування відбирали пиляки на стадії вакуолізованої мікроспори або молодого двоклітинного пилкового зерна (відразу ж після закінчення диференціювального мітозу, до початку переміщення ядра вегетативної клітини).

Стерилізацію вибраних ділянок волотей проводили насиченим розчином хлорного вапна з додаванням декількох крапель детергенту твій 80 протягом 7 хв або 0,1%-м розчином сулеми (10 хв), після чого промивали в 5 порціях стерильної дистильованої води.

Основним середовищем для індукції ембріогенного калусу було середовище Дженовезе YP. Пиляки по 50-70 штук висаджували в культуральні посудини діаметром 40 мм і завдовжки 100 мм або у стерильні пластикові чашки Петрі діаметром 40 мм. Утворений через 6 тижнів ембріогенний калус пересаджували на середовище для диференціації YPd, що містило 7,7 мг/л гліцину, 500,0 – гідролізату казеїну, 1,0 – ІОК, 1,0 – кінетину, 146 мг/л глютаміну, 30 г/л цукрози, 2,5 – активованого вугілля, 7 г/л агару “Difco”. Після початку росту колеоптилів і корінця проростки пересаджували на середовище YPr для розвитку кореневої системи і пагону.

Культивування пиляків, ембріогенного калусу і рослин-регенерантів проводили при 27°С і фотоперіоді 16 год.

Рослини-регенеранти обробляли 0,05%-м розчином колхіцину і висаджували в грунт або суміш ґрунту і піску (1:1).

***Завдання***

1. Який орган злакових культур може формувати калус в умовах in vitro?

2. Коли відбувається найкращий ріст калусу із зародків ячменю, жита і вівса? Яке середовище для цього потрібно використовувати?

3. Який основний спосіб регенерації у злакових культур? Описати його.

4. Скільки є типів калусів?

5. Описати регенерацію рослин із калусних тканин кукурудзи.

6. Описати регенерацію рослин пшениці із суспензійних культур.

7. Де використовують ембріогенну суспензійну культуру?

8. Описати метод отримання і культивування ембріогенної суспензії пшениці, який запропонували W. Wanf і H. Nguen.

9. Описати культуру in vitro пиляків пшениці.

10. Описати культуру мікроспор пшениці.

11. Описати культуру in vitro пиляків жита.

12. Описати культуру in vitro пиляків кукурудзи.

# ТЕМА 9: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТЕХНІЧНИХ КУЛЬТУР

***Мета:*** вивчення мікроклонального розмноження технічних культур

## *Теоретична частина*

Метод культури ізольованих тканин, органів, клітин розроблено для цілої низки технічних культур. Застосовують його головним чином для вирішення селекційно-генетичних проблем, створення нових гібридів, прискорення селекційного процесу, оздоровлення окремих генотипів та отримання трансгенних рослин. Використовують загальновживану технологію МКР.

Найбільших успіхів досягнуто з культурою тканин тютюну, що є унікальною і розповсюдженою моделлю для багатьох фізіологічних, біохімічних і цитологічних досліджень. Перше повідомлення про клональне розмноження Nicotiana tabacum з апікальних меристем з'явилось ще у 1968 р. З метою звільнення від вірусної інфекції культивували апікальні верхівки (0,4-0,6 мм), що складались із меристематичного купола і примордіальних листків. На рідкому середовищі LS з 8 мг/л ІОК і 2,56 мг/л кінетину протягом 3-4 тижнів проліферував калус і формувались пагони. Калус утворювався й на сегментах пагонів і листків тютюну з подальшою регенерацією рослин. На видах роду Nicotiana проведено досліди віддаленої і соматичної гібридизації.

Певних успіхів досягли при культивуванні різних тканин соняшника (Helianthus annus L.): сегментів листків, гіпокотиля, апексів, пагонів. На середовищі MS з 2,4-Д і БАП (по 0,2 мг/л) усі типи експлантів із різною швидкістю проліферують калусну тканину, здатну до морфогенезу пагонів. Експланти паренхіми стебла (завтовшки 2,5 мм) культивували на модифікованому середовищі Уайта з 1 мг/л ІОК при температурі 30°С і освітленні 1 клк. За 8 тижнів проліферував калус, з якого формувались численні пагони. Укорінення відбувалось на середовищі MS або Гамборга без регуляторів росту. Соматичний ембріогенез можна індукувати на недозрілих зиготичних ембріонах на середовищі з 1 мг/л 2,4-Д або 3,3 мг/л дікамби і 90 г/л цукрози при культивуванні експлантів у темряві. Подальше культивування на середовищі MS з 30 г/л цукрози при освітленні 1500 лк (16 год) сприяє утворенню пагонів.

Для створення цінних форм гречки, стійких до хвороб і стресових чинників, розроблено метод отримання міжвидових гібридів гречки звичайної і диких видів гречки татарської за допомогою ембріокультури. Визначено оптимальний термін ізолювання недозрілих зародків, отриманих після запилення. Розроблено схему поетапного подолання бар'єрів міжвидової несумісності у гречки, що дає змогу вирощувати міжвидові гібриди з цінними ознаками. Створено трансгенні рослини гречки, стійкі до гербіциду фосфінотриацину. Запропонована методика отримання трансгенних рослин уможливить вирощування цінних для селекції сортів унаслідок інтродукції генів, які кодують важливі ознаки.

Перші досліди з культурою тканин льону було розпочато понад 25 років тому, але ще й досі нема чіткої методики його клонального розмноження. Певні труднощі становить значна варіабельність морфогенетичної реакції експлантів різних сортів льону, залежність від генотипу, складу живильного середовища, вуглеводів, фітогормонів, дії екзогенних факторів

Вивчення регенераційної здатності 12 сортів льону-довгунцю, районованних в Україні, виявило значні відмінності морфогенетичного потенціалу. Експланти усіх сортів були здатні до проліферації калусу, але надалі одні сорти утворювали корені, інші – індукували пагони. Отримати рослини-регенеранти деяких сортів льону досить складно. Найбільш морфогенними були сорти Белинка, Светоч, Могилевский 2, Л-1120; їх можна використовувати у подальшій селекційній роботі.

У культуру вводять сегменти гіпокотиля сіянців льону. Насіння стерилізують у 70%-му етанолі 1 хв, потім двічі – у 5%-му розчині гіпохлориту натрію по 3 хв і 3 рази промивають стерильною дистильованою водою. Пророщують на середовищі MS (повної або 1/2 концентрації) без гормонів, з 3% цукрози і 0,8% агару. Використовують сегменти гіпокотиля (2-3 мм) 7-добових проростків.

Культивують на середовищі MS з 0,4 мг/л 2,4-Д і 1,6 мг/л зеатину. За даними інших авторів, для олійних сортів льону найбільш морфогенними були середовища з додаванням 5 мг/л 2,4-Д (для сорту Szecledi 30) і 0,25 мг/л ТДЗ (для сорту Alex). Утворювались ембріоноподібні структури з подальшим соматичним ембріогенезом. Експланти гіпокотиля, котиледона і апекси пагонів льону на середовищі MS з 10 ммоль БАП проліферували калус ,із численними бруньками і пагонами. Ризогенез відбувався на середовищі В5 (1/2 концентрації) з 1 ммоль ІОК.

Останнім часом увагу дослідників привертає можливість отримання нових сортів льону за допомогою методів генетичної трансформації. Розробляються методи створення трансгенних форм льону, стійких до дії важких металів, гербіцидів та хвороб. Проте методика отримання великої кількості трансгенних рослин потребує под альших досліджень.

Стевія – ендемічна культура Парагваю, листки якої містять дитерпенові глікозиди, що у 300 разів солодші за цукор. Введення у виробництво нової для України рослини з метою отримання низькокалорійного замінника цукру — стевіозиду – насамперед залежить від розробки раціональних способів її розмноження.

Співробітники Інституту цукрових буряків УААН тривалий час досліджували методи МКР стевії. Для регенерації і розмноження використовували різні органи і тканини (меристеми, бруньки, сегменти стебла, листки), але для масового розмноження в культурі in vitro найбільш придатними є апікальні і латеральні меристеми, сегменти листка і стебла.

Введення в первинну культуру експлант в стевії утруднюється сильною контамінацією вихідного матеріалу, яка залежить від фази розвитку рослини. Найкращим терміном для добору експлантів є середина вегетації. Пазушні верхі'вкові бруньки добре переносять стерилізацію. Стерилізують пагони 0,04%-м розчином сулеми 30 хв, промивають у 3-4 порціях стерильної води

Вичленовують апікальні і латеральні бруньки (0,5 см) або відрізки стебла 1,0-1,5 см з пазушними бруньками. Культивують на середовищі Гамборга з 0,05-0,5 мг/л НОК, 100,0 – мезоінозиту, 0,3 – тіаміну і піридоксину, 0,5 мг/л нікотинаміду, 45 г/л цукрози, pH 5,8. Для прискорення регенерації додають 0,05-0,2 мг/л БАП.

Витримують експланти при температурі 26-28°С, освітленні 3-5 клк, фотоперіоді 14 год, відносній вологості 70%. За 5-7 діб з експлантів пазушних бруньок розвивались пагони, утворювались корені. За 2 тижні формувались рослини-реге неранти, придатні до пересадки у субстрат. Отримані рослини можна живцювати, що значно збільшує коефіцієнт їх розмноження.

Експланти листків і стебла на середовищах з НОК і БАП утворюють калус, з якого регенерують бруньки, пагони. У культуру in vitro можна вводити насіння стгвії, яке має дуже низьку схожість. Його стерилізують у 0,04%-му розчині сулеми (30 хв), відмивають стерильною водою і прооощують на модифікованому середовищі Гамборга. Через 7-8 діб

з’являються проростки, які можна використовувати для пюдальшого клонування.

Верхню частину рослин субкультивують на свіжому живильному середовищі, а нижню частину з двома партами листків і коренями дорощують. Помічено, що тривале субкультивування не впливає на морфогенетичну активність експлантів.

Селекційний процес цукрового буряку дуже тривалий (15-16 років), тому розробка методу МКР має велике значення для генетико-селекційної роботи з цією важливою культурою.

Численні дослідження довели високу морфогенну активність ізольованих тканин і органів цукрового буряку. У культуру можна вводити експланти сіянців (гіпоко- тиль, котиледон, листки), живці, квіткові бутони, апекси пагонів. На регенераційну здатність експлантів впливають походження і вік вихідної тканини, генотип материнської рослини, склад живильного середовища і концентрація регуляторів росту. Розмноження рослин може відбуватися внаслідок активізації пазушних меристем, утворення адвентивних пагонів з клітин експланта й отримання регенерантів з калусної тканини, що індукується на експлантах. Певні труднощі виникають при введенні різних тканин в первинну культуру через глибоку контамінацію мікроорганізмами. Різні автори пропонують свої режими стерилізації. Для насіння і коренеплодів використовують 1%-ну бромну воду, 0,2-0,5%-й нітрат срібла, 0,1-0,2%-ну сулему при експозиції 2-20 хв. Можна також використовувати 9,5%-й NaOCl протягом 15 хв для стерилізації насіння. При введенні в культуру дворічних рослин застосовують тривалішу стерилізацію: 0,1 %-й розчин діациду протягом 2 год забезпечує до 96% здорових експлантів. Зелені генеративні пагони стерилізують 0,1%-м розчином діациду протягом 8-10 хв.

Експланти культивують при температурі 20±2°С, відносній вологості 65-70%, освітленні від 1,2 до 8,0 клк і фотоперіоді 16 год. Найчастіше використовують живильні середовища Гамборга і MS.

Для отримання калусу температуру збільшують до 30°С і культивують експланти в темряві. На молодих листкових пластинках калус формується швидше, ніж на старих, активність калусогенезу живців нижча за листки. Апікальні меристеми пагонів дорослих рослин (1-2 мм) і сіянців культивують на середовищі MS (повної або 1/2 концентрації) з додаванням 0,08-0,12-0,25 мг/л БАП. Адвентивні бруньки і пагони, що утворюються, можна субкультивувати на середовищі з 0,5 мг/л БАП і 0,01 мг/л

гіберелової кислоти до утворення потрібної кількості рослин. Деякі генотипи цукрового буряку формують пагони без пересадки на інше середовище. Генеративні бруньки квітконосів вичле- новують перед цвітінням і культивують на середовищі Гамборга-Евелега з БАП і НОК.

Розроблено метод прискореного МКР цукрового буряку, що дає змогу отримувати за рік до $8\times10^4$ рослин-регенерантів від одного експланта. На модифікованому середовищі MS з вітамінами за Уайтом, аскорбіновою (5-25 мг/л) і глутаміновою (5 мг/л) кислотами, бета-аланіном (3 мг/л) і БАП (0,2 мг/л) культивували генеративні бруньки та експланти сіянців декількох одно- і багатонасінних тетраплоїдних гібридів. Високу регенераційну здатність мають експланти листків, черешків і пагонів. Протягом 2 тижнів формуються численні бруньки і адвентивні пагони. Багаторазове субкультивування експлантів дає змогу отримати велику кількість регенерантів. Частини гіпокотиля, котиледона, сегменти черешків листка на модифікованому середовищі Гамборга з вітамінами за Уайтом виявляють високу морфогенетичну активність. Додавання 0,1 мг/л НОК, 0,2 мг/л БАП сприяє проліферації калусу, утворенню бруньок і регенерації рослин. Органогенна здатність експлантів збільшується при внесенні 0,25 мг/л аскорбінової кислот.

Морфогенна активність експлантів значною мірою залежить від генотипу і сорту материнської рослини. Найбільшу кількість регенерантів отримано від тетраплоїдних форм, менше – від триплоїдних і найменшу – від диплоїдних. Сорти буряків цукристого спрямування мають більшу регенераційну здатність, ніж урожайні. На середовищі MS з 1-2 мг/л ІМК, 10,0-25,0 – аскорбінової кислоти, 0,05 – БАП, 0,5-5,0 мг/л гіберелової кислоти формується до 45-60 пагонів на експлант (сорти Янаш, Алтушківська однонасінна, Рамонська) і до 20-30 – у сорту Верхняцька. Змінюючи концентрацію регуляторів росту, можна індукувати проліферацію калусу і органогенез пагонів, формування численних бруньок і коренів. Внесення 0,1-0,5 мг/л 2,4-Д і БАП сприяє утворенню калусу, який після пересадки на середовища з 0,1 мг/л кінетину і 15 мг/л аскорбінової кислоти регенерує бруньки і пагони.

Можна збільшити кількість пазушних бруньок додаванням 0,1 мг/л ІМК, 0,05 – БАП, 2,5 – гіберелової кислоти і 15 мг/л аскорбінової кислоти. Індукторами ризогенезу є аденін (0,5 мг/л), ІМК (2 мг/л) і аскорбінова кислота (10 мг/л). На середовищах з цими компонентами активно формується коренева система.

Заключним етапом МКР є пересадка рослин-регенерантів у ґрунт. Попереднє загартування й акліматизація сприяє кращій приживлюваності регенерантів. Добре укорінені рослини висаджують у суміш вермикуліту і перліту або у ґрунт і утримують у кліматичній камері при освітленні 5-6 клк і вологості 90%. Через 3-4 тижні рослини можна переносити в поле. Слід уникати травмування стрижневого кореня при пересадці, бо коренеплоди змінюють форму. У регенерантів цукрового буряку не виявлено морфологічних відхилень, зберігається специфіка вуглеводного обміну материнської рослини, не змінюється якісний склад білків. Генетична стабільність мікроклонів спостерігається навіть після численних пасажів, що дає змогу зберігати генофонд цукрового буряку. Рослини можна депонувати кілька років за понижених температур без втрати життєдіяльності. Маточні коренеплоди рослин-регенерантів можна використовувати для створення високоякісних насінників

Досліджено регенераційну здатність деяких сортів кормового буряку. В культуру вводили експланти живця з листком від рослин, що культивували in vitro. Регенерацію пагонів індукували на середовищах MS (без фітогормонів) і РВ двома шляхами – безпосередньо з клітин експланта і формуванням ембріоїдних структур і мікророзеток.

В усіх досліджуваних генотипах було індуковано пряму регенерацію. Утворення розеток з калусу істотно залежало від генотипу вихідної рослини. Найбільшу морфогенну активність мав сорт Панфільська. При культивуванні одиничних пагонів утворювались численні розетки, які потім вирощували на модифікованих середовищах ДС.

Регенераційна здатність експлантів кормового буряку значно нижча, ніж цукрового.

***Завдання***

1. Описати метод культивування тютюну.
2. Описати метод культивування соняшника.
3. Описати метод культивування гречки.
4. Описати метод культивування льону.
5. Описати метод культивування стевії.
6. Описати метод прискореного МКР цукрового буряку.

# ТЕМА 10: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ КАРТОПЛІ

***Мета:*** вивчення мікроклонального розмноження картоплі

## *Теоретична частина*

Впровадження у сільське господарство України методів біотехнології рослин може забезпечити гарантоване виробництво сільськогосподарської продукції і сприяти побудові сучасної економіки. Біотехнологія має унікальні можливості практичного використання: це і МКР рослин, і клітинна селекція, що уможливлює цілеспрямований відбір мутантних форм із потрібними ознаками, і оздоровлення рослин.

У багатьох країнах світу біотехнології надається першорядне значення. Її сучасному стрімкому розвитку сприяє розвиток молекулярної біології і генетики, що дає змогу використати величезні потенціальні можливості рослинних організмів. Крім того, існує гостра потреба в нових технологіях, які б ліквідували нестачу харчових продуктів.

В Україні теоретичні і методичні дослідження у галузі біотехнології сільськогосподарських рослин проводять у кількох напрямах: МКР, оздоровлення рослин, клітинна селекція, прискорення селекційного процесу. Багато наукових розробок уже вийшли за межі лабораторій і впроваджені у промислове виробництво. Досягнуто певних успіхів у клонуванні цукрового буряку, картоплі, стевії, ведуться пошукові роботи зі злаковими і бобовими культурами.

Застосування біотехнології у сільськогосподарському рослинництві дасть змогу отримати нові високоврожайні сорти, стійкі до хвороб і несприятливих ґрунтових і кліматичних умов.

Метод культури ізольованих тканин і клітин, розроблений для багатьох видів декоративних рослин, успішно застосовують при вирощуванні овочевих культур. Уже введено в культуру in vitro понад 30 видів овочевих рослин. Для деяких видів технологія МКР поставлена на промислову основу (картопля), з іншими рослинами (томати, капуста, морква, цибуля) проводять селекційно-генетичні дослідження.

Метод культури тканин для звільнення картоплі від вірусної інфекції застосовують вже близько 50 років. У 1952 р. французькі вчені Ж. Морель і С. Мартін оздоровили один сорт картоплі, використавши апікальну меристему паростків бульб. До середини 1970-х років технологія звільнення картоплі від вірусів була розроблена і удосконалена в багатьох

країнах світу. Для підвищення ефективності методу застосовували термотерапію, хіміотерапію, обробку холодом. Останнє десятиліття характеризується подальшим розвитком досліджень у галузі біотехнології картоплярства та їх широким впровадженням у генетико-селекційний процес для створення високоякісних сортів, стійких до негативної дії зовнішнього середовища (засолення, гербіцидів, хвороб, шкідників тощо).

Інститут картоплярства УААН – один з перших колективів, що розробив і застосував методи МКР і клітинної селекції у картоплярстві і отримав практичні результати зі створення рослин- регенерантів картоплі. Розроблено низку технологій для отримання нових форм і поліпшення існуючих сортів картоплі. Методом клітинної інженерії створено фітофторостійкий середньопізній сорт картоплі Ольвія, який характеризується добрими смаковими якостями.

Технологія оздоровлення сортів картоплі є складовою частиною системи первинного насінництва і складається з декількох етапів:

- підготовка бульб для видалення меристем, перевірка їх інфікованості методом імуноферментного аналізу, пророщування в темряві 1-2 місяці при 35-37°С;

- вичленування меристем і культивування їх на живильному середовищі в умовах регульованої температури, освітлення та вологості;

- пересадка проростків (3-5 мм) на середовище з ауксином для прискорення росту та укорінення, живцювання пагонів; перевірка зараженості регенерантів;

- пересадка рослин у теплиці для утворення бульб і повторна перевірка інфікованості.

Для вичленування меристем використовують паростки (2-3 см) бульб після термотерапії. Іх відділяють і стерилізують у 0,1%-му діациді протягом 5 хв, потім промивають у 2 порціях стерильної дистильованої води. Вирізають меристематичний купол з 2 примордіальними листками (0,1-0,2 мм); можна також вичленовувати меристеми пазушних бруньок (0,1-0,3 мм).

Культивують на середовищі MS з 0,5 мг/л кінетину, аденіну, і 1 мг/л гіберелової кислоти або на середовищі, розробленому в лабораторії Інституту картоплярства, з пониженим вмістом сполук азоту, мг: $MH_4MO_3$ – 1250, $KNO_3$ – 1100, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_20$ – 440, $KH_2P0_4$ – 970, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 770, мікроелементами за Мурашіге-Скугом, з додаванням 25 мг/л кінетину, 1,0 – ІОК, 3,0 – аскорбінової кислоти, 0,25 мг/л аденіну. За 30-45 діб

утворюються рослини з 5-6 листками. Кожні 10-15 діб рослини пересаджують на свіже живильне середовище.

Для збільшення кількості регенерантів рослини живцюють на частини з листком і пазушною брунькою. Цей спосіб дає змогу отримати за 2-3 міс 3-5 тис. рослин. Укорінюють пагони на середовищі з 1 мг/л ІОК, без гіберелової кислоти.

Пробірочні рослини можна використати для отримання калусної культури. Для цього листки і сегменти стебла культивують на середовищі MS з 2 мг/л пантотенату кальцію і 0,25-0,5 мг/л БАП або 1-2 мг/л 2,4-Д і 0,2 – БАП. Виявлено, що інтенсивність калусоутворення і його морфогенна здатність залежать від генотипу рослини, пори року, експланта та гормонального складу живильного середовища. Так, для багатьох сортів картоплі калус швидше утворюється на експлантах стеблах, ніж на листках. Для індукції калусу на листках треба додати до середовища 3 мг/л 2,4-Д і 1 мг/л БАП. Для кожного сорту склад живильного середовища підбирають емпірично. На оптимальному середовищі первинний калус утворюється за 3-5 тижнів, його субкультивують кожні 4 тижні. Із калусної тканини стебла пагони проліферують уже через 2-4, з тканини листка – через 3-10 пасажів.

Вік пересадженого калусу суттєво впливає на морфогенні процеси різних сортів картоплі. Найбільше рослин-регенерантів отримано від 5-10-ї субкультури калусу, після 13-24-ї пересадки морфогенна активність знижується (залежно від сорту). Здатність калусної тканини до морфогенезу має сезонний характер: найінтенсивніше регенеранти проліферують у березні-квітні і листопаді-грудні. Рослини, отримані з перших 5 пасажів, як правило, були за фенотипом ідентичні вихідному сорту.

Останнім часом, широкого застосування набув метод отримання мікробульб у рослин-регенерантів. Дослідження Інституту картоплярства УААН показали, що здатність до утворення мікробульб залежить від сорту картоплі. Сорти, що інтенсивно утворюють бульби в полі, швидше регенерують мікробульби в культурі in vitro. Для цього пробірки з мікроживцями витримують протягом 12-15 діб при фотоперіоді 16 год з подальшим культивуванням за короткого дня і помірного освітлення. Використовують середовище з 4-6% цукрози для сортів, що схильні до утворення бульб, і 6-8% – для сортів, у яких утруднено бульбоутворення.

За даними інших авторів, індукція формування мікробульб

відбувається в темряві при 18-22°С на середовищі MS з 5 мг/л БАП, 500 мг/л хлорхолінхлориду, 8% цукрози. Маса мікробульб 50-140 мг, діаметр 3-7 мм. Вони зберігають життєздатність протягом 6 міс за утримання в піску при 4°С.

Мікробульби також можна отримати культивуванням пагонів на середовищі з 10 мг/л БАП і 8% цукрози при температурі 22°С, освітленні 100 лк і фотоперіоді 16 год. Протягом 2 міс до 47% рослин формували по 1-3 мікробульби розміром 2-11 мм. Регенеранти переносять у субстрат (пісок, торф, мінеральні добрива) і витримують у теплиці до пересадки в ґрунт.

Досліджено регенераційну здатність кореневих експлантів 8 сортів та 5 гаплоїдних ліній картоплі. У дослідах використовували корені асептичних рослин і «бородаті» корені, трансформовані культурою Agrobacterium rhizogines. Відрізки коренів розміщували на середовищі MS з 10 г/л цукрози, 1,5 мг/л БАП, 10,0 – гіберелової кислоти і 0,05 мг/л ІОК. Експланти культивували при інтенсивному освітленні (4-5 клк).

За 2 тижні утворювався щільний зелений калус, з якого проліферували пагони; їх укорінювали на середовищі MS без фітогормонів. Два сорти (Лорх і Темп) і дві моногаплоїдні лінії відзначались високим морфогенним потенціалом.

***Завдання***

1. Які вчені вперше застосували метод культури тканин для звільнення картоплі від вірусів?
2. Які методи МКР розробив Інститут картоплярства НААНУ?
3. Зазначити етапи оздоровлення сортів картоплі.
4. Описати етап вичленування меристем картоплі.
5. Описати склад середовища для культивування картоплі.
6. Як отримують калусну культуру картоплі?
7. За яких умов відбувається формування мікробульб картоплі?

# ТЕМА 11: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ЗЕРНОБОБОВИХ КУЛЬТУР

***Мета:*** вивчення мікроклонального розмноження зернобобових культур

## *Теоретична частина*

***Бобові (Leguminosae).*** Клональне розмноження бобових застосовують головним чином для полегшення гібридизації, генної трансформації або збільшення генетичної мінливості. Культура меристематичних апексів сприяє звільненню материнських рослин від вірусів.

Тривалі дослідження дали змогу досягти успіху у МКР деяких видів бобових. Регенерація рослин відбувається переважно через калусну культуру. Особливо важко ініціювати органогенез у зернобобових. Розроблено спеціальні живильні середовища, які містять (порівняно з середовищем MS) менше азотистих сполук, а більше фосфатів і сульфатів. Середовище B5 розроблено для суспензійної культури сої: калус сої краще росте, коли концентрація іонів $NH_4^+$ у середовищі MS знижена на 1/3. Зараз у культуру введено близько 20 видів зернових і трав'янистих бобових рослин.

***Боби (Vicia faba).*** Отримали культуру калусу на експлантах недозрілих ембріонів і верхівок асептично вирощуваних сіянців на середовищі з 4,5 ммоль 2,4-Д. Регенерація ембріоїдів і адвентивних бруньок відбувалась на тому ж середовищі з ауксинами і цитокіинами. Найкращим виявилось середовище MSB з 0,1 ммоль НОК і 5 ммоль зеатину. Укорінення пагонів відбувалось на цьому ж середовищі без регуляторів росту.

***Горох (Pisum sativum).*** Клональне розмноження гороху можливе через морфогенний калус і прямий органогенез. У культуру вводять головним чином експланти із сіянців.

Меристематичні верхівки стебла на середовищі B5 з 0,1 мг/л БАП і 0,2 мг/л НОК проліферують пагони, які укорінюють на середовищі B5 з 0,2 мг/л НОК. Ця техніка дає змогу звільнити рослини від деяких вірусів, що передаються з насінням. Апекси пагона і латеральні бруньки сіянців утворювали численні пагони на середовищі MS з 4,5 мг/л БАП, 0,2 мг/л НОК і вітамінами за Гамборгом. Рослини укорінюють на тому ж

середовищі з 0,93 мг/л НОК.

Експланти епікотиля і бруньки сіянця здатні утворювати морфогенний калус на середовищі MS з 2 мг/л НОК і 0,5 мг/л НОК або на середовищі Ziv з 2,8 мг/л НОК (або 0,5-2,0 мг/л 2,4-Д) і 1 мг/л БАП. Регенерація пагонів відбувається при перенесенні калусу на середовище з 0,25 мг/л ІМК і 1 мг/л БАП. Регенеративний калус утворюється при інкубації апексів пагона сіянця на середовищах В5 (20 г/л цукрози) або MS (30 г/л цукрози) з 2 мг/л НОК і 0,05-1,1 мг/л БАП. Помічено, що на середовищі В5 проліферують міцніші і більші пагони.

Прямий органогенез пагонів на експлантах недозрілих ембріонів, бруньок і сегментах епікотиля отримано на середовищі MS з 1 мг/л НОК, 3 мг/л БАП і 7% кокосового молока. Адвентивні пагони регенерували на експлантах 3-добових листків на середовищі MS з вітамінами за Гамборгом і додаванням 0,2 мг/л НОК і 2,2 мг/л БАП або по 2 мг/л ІОК і кінетину.

Подібний результат отримали і з 15-добовими листками: утворюється мінімальний калус, який на тому ж середовищі з 2,2 мг/л БАП і 1,9 мг/л НОК, 2 мг/л ІМК або 1,8 мг/л ІОК проліферує пагони. Експланти культивують на світлі, бо в темряві формуються лише корені.

Дослідження морфогенетичної здатності 26 генотипів гороху виявило різницю у інтенсивності і швидкості утворення калусу. Підтверджено вплив генотипу на органогенез і соматичний ембріогенез. Виявлено зразки гороху з високим морфогенетичним потенціалом in vitro.

***Соя (Glycine max).*** У багатьох країнах соя займає великі площі і використовується як джерело протеїну і олії. Рослини добре самозапилюються, але часто гібриди не дають життєздатного насіння.

Тривалий час досліди з МКР сої не давали успіху. Важко було отримати рослини з калусу при соматичному ембріогенезі. Виявилось, що калус і суспензійна культура бобових добре росте лише за низької концентрації солей амонію (середовище В5). У суспензійній культурі сої на цих середовищах з’являються ембріоїдоподібні структури. У експлантів сіянців можна індукувати калус, але важко отримати паростки.

Подальші дослідження показали, що соматичний ембріогенез можна ініціювати у цілої низки генотипів, якщо вводити в культуру експланти недозрілих соматичних ембріонів, особливо котиледони.

Для культивування найчастіше використовують середовища MS, В5 з 10-30 мг/л НОК або 2,5-10,0 мг/л 2,4-Д. Крім того, концентрація 2,4-Д

може бути різною: 4,9, 2,5, 40,0 або 1-2 мг/л.

Немає чіткої рекомендації щодо концентрації цукрози у живильному середовищі. Одні автори додають до середовища L2 з 0,6 мг/л 2,4-Д 20 г/л цукрози або 15 г/л глюкози, інші використовують середовище MS з 5 г/л активованого вугілля і 96 г/л цукрози, ще інші культивують ембріоїди на середовищі Шенка і Хільдебрандта з 9,6 г/л цукрози. Можна також вирощувати експланти котиледона на рідкому середовищі MS з 0,12 мг/л ІМК і 0,16 мг/л АБК у ротаторі (60 об/хв). Пізніше ембріоїди переносять на середовище без регуляторів росту, де вони розвиваються.

Пряму проліферацію пагона на експланті гіпокотиля G. tomentilla і G. canenscens отримано на середовищі MS з БАП і НОК. Пагони відділяють і укорінюють.

Для того щоб запобігти утворенню калусу, сегменти стебла розміщували на базальному середовищі без регуляторів росту на 20 діб, а потім переносили на те ж середовище з 5 мг/л ІМК і 1,1 мг/л БАП для індукції пагонів. Експланти вузла сіянців культивували на середовищі В5 з 5,6 мг/л БАП, а потім на цьому ж середовищі з 5 мг/л ІМК і 1-11 мг/л БАП, унаслідок чого утворювались бруньки і пагони. Надалі пагони переносили на середовище з 0,2 мг/л БАП, в якому продовжувалась їх проліферація.

***Арахіс (Arachis hypogaea).*** Технологія культури тканин арахісу допомагає виростити деякі цікаві гібриди, які важко отримати гібридизацією.

Морфогенний калус досить легко утворюється з різних експлантів на середовищі MS, але найкращими експлантами є молоді листочки (2-5 мм). Оптимальна регенерація бруньок відбувається при додаванні по 1 мг/л НОК і БАП. На сегментах листка 8-13 мм регенерація незначна і зовсім відсутня на повністю розкритих листках. Пагони утворюються і ростуть на середовищі з 0,01 мг/л НОК і 1 мг/л БАП, а укорінюються без регуляторів росту. Експланти можна брати як з молодих сіянців, так і з дорослих рослин. Морфогенний калус формується на сегментах коренів, котиледонів, взятих із сухого насіння. Рослини-регенеранти отримують з експлантів котиледонів несумісних міжвидових гібридів. Насіння стерилізують і розкладають на живильне середовище. Під час проростання утворюються групи адвентивних і пазушних пагонів, які можна відділяти і субкультивувати на тому ж середовищі. Численні паростки проліферують з калусу, що утворюється при культивуванні верхівок пагонів арахісу.

***Конюшина (Trifolium spp.).*** Клональне розмноження конюшини

використовують переважно для звільнення маточних рослин від вірусної і грибкової інфекції, а також з метою створення корисних генетичних варіантів для селекції.

Прямий органогенез отримано при культивуванні меристематичних верхівок пагонів T. repens і T. Pretense. Культивують експланти на середовищі Міллера з 0,2 мг/л ІОК і 2-іР або на середовищі MS з 0,2 мг/л БАП і 3% цукрози за низької температури (2-6°С) у темряві або за освітлення 300 лк. Проліферують адвентивні бруньки і пагони, звільнені від вірусної інфекції.

Морфогенез конюшини залежить від генотипу рослини, і ініціювати його регенерацію дуже важко.

За даними N. Maclean і K. Nowak, з 642 генотипів T. pratense лише 3 були здатні регенерувати рослини з калусу гіпокотиля. Дослідження морфогенної здатності експлантів 4 генотипів T. pratense показали, що сегменти гіпокотиля, сім'ядольного листка, живця рослин, які виросли в асептичних умовах, здатні до морфогенезу. На середовищах B5, MS, LS усі експланти утворювали калус. На середовищі LS з піклорамом (0,06 мг/л) і БАП (0,1 мг/л) відбувався морфогенез пагонів. Утворення ембріоїдів проходило на середовищі LS з 0,01 мг/л 2,4-Д і 2 мг/л аденіну. Розвитку ембріоїдів і утворенню регенерантів сприяло додавання піклораму (0,02 мг/л) і БАП (0,2 мг/л). Укорінення відбувалось на середовищі з 0,2 мг/л НОК. Приживлюваність рослин-регенерантів становила 90%. Деякі рослини утворили життєздатне насіння.

***Люцерна (Medicago sativa).*** Техніку МКР люцерни вивчають, вдосконалюють і використовують головним чином як альтернативний метод при селекційній роботі.

Калус, здатний до регенерації рослин, отримано з різних органів: недозрілої зав'язі, бруньки, зародка або частин сіянця. Органогенез відбувається проліферацією адвентивних пагонів або соматичних ембріоїдів. Інколи на одному шматочку калусу відбуваються обидва види морфогенезу. Проростки, шо з'являються на калусі люцерни, проходять через ембріогенез.

Соматичні ембріоїди формуються на калусі на середовищі SH з низькою (50 ммоль) концентрацією іонів амонію, проліну або аланіну. Проліферації рослин з ембріоїдів сприяє додавання до середовища мальтози або глюкози (замість цукрози).

На середовищі B5 з 0,2 мг/л НОК і 2-іР верхівки люцерни

регенерували пагони. Культури витримували 15-18 міс при 2-4°С і 300 лк, фотоперіод 8 год. Морфогенна активність експлантів люцерни значною мірою залежить від генотипу материнської рослини.

***Завдання***

1. Описати метод культивування бобів.
2. Описати МКР гороху за допомогою прямого органогенезу.
3. Описати МКР гороху через морфогенний калус.
4. Описати метод отримання рослин-регенерантів сої.
5. Описати метод отримання рослин-регенерантів арахісу.
6. Описати метод отримання рослин-регенерантів конюшини.
7. Описати метод отримання рослин-регенерантів люцерни.

# ТЕМА 12: КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ

***Мета:*** освоїти основні прийоми, що використовуються для проведення клітинної селекції, а також вимоги до вихідного матеріалу.

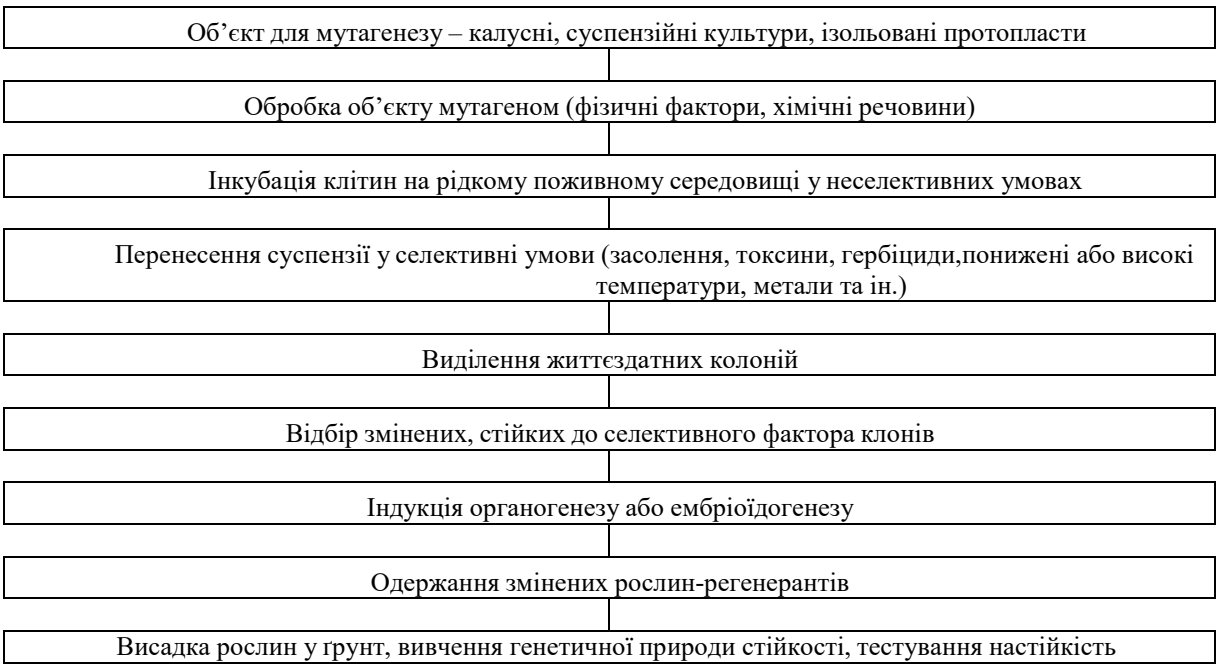
## *Теоретична частина*

*Клітинна селекція* – один із важливих напрямків в біотехнології рослин. Відбір клітинних ліній і рослин з цінними спадковими ознаками відбувається на рівні клітин, що культивуються *in vitro* в селективних умовах.

Основною перевагою клітинної селекції є можливість маніпулювати з мільйонами клітин, проводити направлену селекцію в чашках Петрі і регенерацію рослин. Отримання рослин із відібраних у селективних умовах клітин можливе завдяки унікальній властивості рослинних клітин – тотипотентності.

Користуючись способами селекції мікроорганізмів, в умовах ін вітро на селективних середовищах відбирають клітини з мутантними генотипами, а потім одержують з них рослини, що стійкі до конкретного селективного фактора. Такий шлях селекції дозволяє відносно швидко одержувати нові форми рослин.

Основна схема одержання мутантних форм шляхом селекції на клітинному рівні може бути зображена так:




Для проведення клітинної селекції використовують такі прийоми:

✓ пряма (позитивна) селекція, при якій виживає певний мутантний тип клітин;

✓ непряма (негативна) селекція, яка базується на вибірковій загибелі клітин дикого типу, які діляться, і виживанні метаболічно неактивних клітин, але потребує додаткової ідентифікації у них мутаційних змін;

✓ ступінчата, або поступова селекція, при якій концентрацію токсичної речовини підвищують поступово. Як правило селекцію починають з концентрації, яка викликає загибель 50% клітин;

✓ тотальна селекція, при якій індивідуально тестуються усі клітинні клони;

✓ візуальна селекція і неселективний відбір, коли варіантна лінія може бути ідентифікована серед всієї популяції клітин візуально або при використанні біохімічних методів (тонкошарова або рідинна хроматографія, радіоімунний аналіз, мікроспектрофотометрія та інші).

Із перерахованих вище прийомів клітинної селекції найчастіше для відбору різних мутантів використовують пряму селекцію. Цей метод використовують для виділення мутантів стійкості, наприклад до гербіцидів, антибіотиків, токсинів, важких металів тощо.

При селекції цих мутантів у кожному випадку необхідно визначати селективні концентрації токсичних речовин. У більшості випадків вміст токсичних речовин не повинен бути значно вищим того, що інгібує ріст тканин. У цілому схему прямої селекції через ізольовані протопласти можна представити так:

1. виділення протопластів;
2. обробка мутагеном (не обов’язкова);
3. культивування в неселективних умовах (3 – 5 поділів ≈ 10 – 14 днів);
4. культивування на селективних середовищах;
5. культивування на регенераційних середовищах (краще з селективнимагентом);
6. регенерація рослин і їх розмноження (тести на стійкість, біохімічнийаналіз);
7. висадка рослин у ґрунт;
8. тестування на стійкість насіння.

Для проведення робіт по клітинній селекції в умовах *in vitro* як вихідний матеріал можуть бути використані калюсні і суспензійні

культури, ізольовані протопласти, органи: пилок, насіння, зародки, листки, меристеми, сегменти стебла, пагони.

Вибір об'єкта залежить від міри розробленості методик і технологій стосовно різних видів рослин, а також від кінцевих цілей дослідження.

Калюсна тканина – це найбільш доступний матеріал, який часто використовують для селекції *in vitro*. Використовують, як правило, свіжовиділену тканину або ту, що культивується, але не втратила регенераційну здатність. Саме через культуру калюсної тканини вперше виділені лінії тютюну стійкі до стрептоміцину, токсинстійкі мутанти кукурудзи.

Однак при роботі з калюсними тканинами є ряд суттєвих недоліків:

– відносно повільний ріст тканини;

– нерівноцінний для всіх тканин ефект мутагенів, а також селективних речовин;

– ідентифікація окремих стійких клітин може ускладнюватися їх маскуванням не мутантними клітинами;

– ріст стійких клітин може пригнічуватися мертвими клітинами;

– поряд зі стійкими можуть виживати чутливі клітини, які контактують з мутантними;

– культивованим тканинам характерна генетична нестабільність і втрата регенераційної здатності.

Проте не зважаючи на ці недоліки використання калюсних тканин, для багатьох видів рослин ефективні технології та способи культивування одиночних клітин ще не розроблені, і даний вихідний матеріал для селекції мутантів in vitro залишається найбільш придатним.

Велику кількість робіт по культивуванню калюсу, з метою отримання нового селекційного матеріалу, проведено на пшениці, ячмені, рисі, сорго, картоплі, томатах, люцерні і дуже рідко на деревних. Уже досягнуто перші позитивні результати по отриманню рослин пшениці, рису, картоплі, стійких до NaCl або Na2SO4. Шляхом додавання в живильне середовище токсичних аналогів амінокислот отримані клітини, а з них рослини моркви, які синтезують у 20 разів більше метіоніну, в 30 разів – триптофану, в 5 разів – лізину. Отже, використання калюсної культури в селекційних цілях відкриває величезні можливості у створенні нових форм рослин, які несуть цінні ознаки, необхідні для людини.

Основними вимогами, що ставляться до модельних об'єктів у клітинній селекції, є швидкий ріст в культурі ін вітро, збереження

регенераційної здатності, невелика кількість хромосом, наявність високоефективної методики виділення і культивування протопластів / клітин, існування справжніх гаплоїдів, короткий життєвий цикл рослин.

Необхідно відмітити, що оцінити внесок клітинної селекції в процес сомаклонної мінливості досить важко. Для цього бажано методично чітко відокремлювати дві складові єдиного процесу формоутворення – сомаклональну варіабельність і селективний відбір.

Культура зародків і гаплоїдні клітини.

Метод ін вітро дозволяє одержувати гаплоїди із чоловічого або жіночого гаметофіту такими способами:

1 – культура пиляків і мікроспор (андрогенез)

2 – культура незапліднених насінних зачатків (гіногенез)

3 – партеногенез після запліднення гаплоіндуктором (гаплопродюсером): використання віддаленої гібридизації з наступним вирощуванням зародка в культурі ін вітро.

Найбільш широко для одержання подвоєних гаплоїдів використовують метод гаплопродюсера та культуру пиляків і мікроспор.

Існує два методи одержання гаплоїдів шляхом андрогенезу ін вітро:

1– метод культури пиляків (пилок знаходиться всередині соматичних тканин пиляка)

2– метод культури пилку (мікроспор), при якому всі соматичні клітини відокремлюються.

Пиляки виділяють із бутонів і переносять на поживне середовище.

Бутони, колоски збирають з пиляками на стадії самого початку цвітіння (передцвітіння). Обов’язкова холодна обробка матеріалу (+4°С…+7°, від декількох годин – до декількох тижнів) при високій вологості повітря. Маніпуляції і режими підбираються експериментально для конкретної культури. Стрес-обробка температурним шоком призводить до індукції і одержання гаплоїдних пилкових ембріоїдів при наступних культивуваннях.

Культура пиляків передбачає два можливих шляхи утворення гаплоїдних рослин. Перший – утворення шляхом ембріоїдогенезу в пилкових зернах.

При цьому всередині пиляків з-поміж окремих пилкових зерен виникають ембріоїди. Вони в своєму розвитку проходять три стадії (глобула, серцевидна, торпедовидна) і утворюють гаплоїдні рослини. Саме цим методом індійські дослідники С.Гуха і С.Махонварі у 1964 році

одержали ембріоїди, а потім і гаплоїдні рослини з пиляків рослин Datura (дурман). Другий шлях пов'язаний з утворенням калусних клітин пиляка в результаті морфогенезу.

Метод одержання рослин-регенерантів з культури пиляків ячменю:

1. Донорські рослини культурного ячменю вирощують в контрольованихумовах фіотрону: +12°…+14°С, 16/8 (день / ніч).

2. Зрізають колосся у період, коли мікроспори знаходяться у середній абопізній стадії розвитку.

3. Колосся обробляють температурою +3°…+5°С протягом 3-4 днів.

4. Відокремлюють прості колоски від ості і стерилізують протягом 1 хв 70° спритом, потім 5-8 хв 10% розчином перекису водню і обполіскують стерильною дистильованою водою.

5. Культивують пиляки у темряві при температурі 22-24°С на середовищі з мінеральною основою $N_6$ (2,4-Д – 2 мг/л, кінетин – 0,5 мг/л, вітамін $B_1$ –1 мг/л, вітамін $B_6$ і нікотинова кислота – по 0,5 мг/л, гліцин – 2 мг/л; аланін, глютамін і пролін – по 100 мг/л; сахароза – 6%; 20% картопляний екстракт; 0,55% агар-агар; pH-5,8). Культивують у пробірках закритих ватно-марлевими пробками.

6. Новоутворені ембріоїди або калус розміром 5 мм переносять на середовище МС з пониженим вмістом сахарози (2-3%); ІОК і кінетину – по 0,2 мг/л. Культивують в умовах освітлення. У випадку неембріогенного калусу – культивування проводять на середовищі з мінеральною основою $N_6$ або МС (БАП – 3 мг/л, НОК – 0,5-1 мг/л).

7. Здійснюють стимуляцію ризогенезу шляхом додавання у середовище длярегенерації ІОК – 2 мг/л.

8. Рослини-регенеранти з добре розвинутою кореневою системою пересаджують у посудини з грунтом і вирощують в умовах штучного клімату при температурі +12°…+14°С до фази кущіння, а потім при +22°…+25°С до повної стиглості.

Метод гаплопродюсера широко використовують у генетико-селекційних дослідженнях, що забезпечує вихід гаплоїдів від 2,7 до 25% (залежно від генотипуі умов вирощування материнських рослин).

Суть його в тому, що для одержання гаплоїдних злаків (особливо ячменю) використовують так званий «бульбозний» метод: гібрид, у якого потрібно отримати гаплоїди, схрещують з ячменем цибулинним Hordeum bulbosum. Міжвидове запилення і запліднення відбуваються без порушення; але в зародку, починаючи з третього дня його розвитку,

спостерігається поступова елімінація хромосом Hordeum bulbosum, і у віці 11 діб вже 93,7% клітин зародка мають гаплоїдне число хромосом, яке дорівнює 7. Гаплоїди, що утворюються, є випадковою вибіркою гамет, що утворюються гібридами $F_1$, або іншими гетерозиготними генотипами, які схрещуються з Hordeum bulbosum.

Через те, що ендосперм таких гібридів не розвивається далі ранніх стадій, то для запобігання загибелі зародка виникає необхідність культивувати його на поживному середовищі ін вітро.

При використанні як гаплопродюсера Hordeum bulbosum одержані гаплоїди ярих і озимих форм ячменю, а також двох видів пшениці – Triticum aestivalis і Triticum ventricosum.

***Спонтанні та індуковані мутанти***

Як правило, для отримання мутантів використовують мутагени.

Мутагени можуть бути фізичними та хімічними. Серед хімічних мутагенів найчастіше використовуються етилметансульфонат (ЕМС), етилнітрозосечовина (НЕС) і нітрозометилсечовина (НМС) – всі викликають хромосомні перебудови. Як фізичні мутагени найчастіше використовують іонізуюче (рентгенівське та γ - промені) і УФ випромінення.

У багатьох випадках для отримання мутантів *in vitro* не обов'язково діяти наклітини мутагенами. Флік у 1983 р. підрахував, що із 124 мутантів, виділених через культуру тканин, 70 відібрані без попередньої мутагенної обробки. Частота виникнення різних спонтанних мутацій у рослинних клітин може варіювати від $10^{-5}$ до $10^{-8}$. Поява окремих фенотипних змін може бути вищою, якщо це обумовлено мутацією більш ніж одного гена.

Отриманню спонтанних мутантів надається перевага при селекції сільськогосподарських культур, коли небажані побічні мутації.

Частоту спонтанних і індукованих мутацій визначають як відношення числамутантних клонів до кількості клонів, що вижили.

Одним із джерел спонтанних мутацій може бути сомаклональна мінливість, або сомаклональна варіабельність. Механізми цього явища ще цілком не з'ясовані.

Поява сомаклонів, що мають генетичні відмінності від материнської рослини, обумовлена існуванням сомаклональної мінливості. Це явище було відкрите на початку 80-х років і вважається одним із перспективних напрямків індукції мінливості в культурі ін вітро.

Основними причинами виникнення сомаклональних варіантів перш

за все є гетерогенність соматичних клітин вихідного матеріалу, генетична мінливість, яка індукується умовами культивування, а також генотип і вихідний експлантат.

У соматичних тканинах рослин нерідко присутні клітини з різною кількістю хромосом. Особливо часто це спостерігається у рослин, що розмножуються вегетативним шляхом – у картоплі. А культура тканин і клітин створює умови для прояву цієї гетерогенності. Причина гетерогенності – відхилення, аномальні мітози, які часто є результатом зміни умов вирощування, особливо при їх погіршенні (зниження або підвищення температури, засолення ґрунтів, великі дози мінеральних добрив). Цитологічні дослідження свідчать, що варіабельність, яка індукується умовами культивування *in vitro* пов'язана з генетичними змінами, в першу чергу зі зміною кількості і структури хромосом. Показано, що при введенні клітин в культуру їх каріотип зазнає змін і через 1 – 2 покоління у суспензійній або калюсній культурі є клітини з іншою генетичною конституцією. Збереження стабільності кількості хромосом у клітинній культурі є дуже рідким виключенням і досягається в результаті ретельного підбору оптимальних умов культивування. Однак і в таких дослідах, показано, що у клітинній популяції є небагато клітин з іншим числом хромосом.

Для доказу того, що зміна кількості хромосом у клітинах, що культивуються обумовлена не лише гетерогенністю вихідної рослинної тканини, а і умовами культивування використовують клонування окремих клітин. Клон отриманий із однієї клітини при культивуванні *in vitro* набуває генетичної гетерогенності. Частіше ніж зміна кількості хромосом у клітинах, що культивуються відбуваються аберації (перебудови) хромосом. У суспензійній культурі *Haplopappus gracilis* процент аберацій хромосом в анафазах через 61 день культивування становив 32 %. Були виявлені фрагменти хромосом, дицентровані хромосоми.

Тривалість культивування клітин *in vitro* теж сприяє підвищенню генетичного різноманіття сомаклонів.

Високий ступінь різноманіття сомаклональних варіантів залежить від вихідного генотипу, природи і стадії розвитку експлантата. Наприклад, у різних злаків ступінь мінливості серед сомаклонів може значно відрізнятися: у пшениці (2n=6x=42) із 192 досліджених рослин-регенерантів 29% були анеуплоїдами, у вівса (2n=6x=42) виявлені цитогенетичні зміни з такою ж частотою, а для кукурудзи частота

виникнення анеуплоїдних рослин не перевищувала 2-3%. Утворення поліплоїдних і анеуплоїдних рослин спостерігається і у інших родів, наприклад, у картоплі. До речі частота появи нових варіантів у диких видів значнонижча, ніж у дигаплоїдних ліній культурної картоплі.

Тип вихідного експлантата також впливає на появу сомаклональних варіантів, які відрізняються кількісними і якісними ознаками. Для картоплі, наприклад, аномальні рослини отримані в 12% випадків при використанні первинним експлантатом мезофілу листка, а в разі використання пелюсток або осі суцвіть частота формування рослин з фенотипними відхиленнями від норми становила 50%.

Сомаклональні варіанти мають практичне використання в сільськогосподарському виробництві. Наприклад, отримані сомаклони картоплі сорту Зарево, які відрізняються високою урожайністю, підвищеною стійкістю до хвороб, вищим вмістом у бульбах білка і крохмалю. Для рослин тютюну через калюсну культуру отримані сомаклони, стійкі до вірусу тютюнової мозаїки, а для цукрового очерету отримано новий сорт, який характеризується високою урожайністю і підвищеною стійкістю до хвороб, зокрема до хвороби Фіджі.

За допомогою методів клітинної селекції отримано мутанти стійкі до антибіотиків, до амінокислот та їх аналогів, до гербіцидів, до стресових факторів та до хвороб. Проведення селекції на клітинному рівні дозволяє створювати нові форми рослин у 2-4 рази швидше, ніж традиційні способи селекції. Сьогодні метод культури тканин широко використовують в селекції не тільки кормових і технічних культур, але і декоративних і лікарських рослин.

***Завдання***

1. Яка схема одержання мутантних форм шляхом селекції на клітинному рівні?
2. Назвіть прийоми, які використовують для проведення клітинної селекції?
3. Які типи культур використовують як вихідний матеріал для проведенняклітинної селекції?
4. Які вимоги ставляться до модельних об’єктів у клітинній селекції?
5. Які існують методи одержання гаплоїдів шляхом андрогенезу?
6. Описати метод одержання рослин-регенерантів з культури пиляків ячменю.
7. Суть методу гаплопродюсера?
8. Які хімічні та фізичні мутагени використовують для отримання мутантів?
9. Що таке сомаклональна мінливість та її практичне значення?

# ТЕМА 13: КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ПРОТОПЛАСТІВ

***Мета:*** освоїти механічний та ферментативний методи виділення протопластів, а також оптимальні умови їх культивування.

## *Теоретична частина*

Культура ізольованих протопластів це один із найсучасніших методів, який використовується у генетиці, фізіології, вірусології і молекулярній біології для отримання соматичних гібридів між віддаленими у систематичному відношенні видами або у разі статевої несумісності, для отримання нових форм рослин шляхом введення у клітину чужорідного геному або його частини.

Відсутність оболонки полегшує надходження у клітину різних фізіологічно активних речовин і дозволяє спостерігати за первинною реакцією клітини на вплив цих речовин, досліджувати метаболізм у контрольованих умовах. Так як в ізольованих протопластах одразу починається регенерація клітинної оболонки, то вони є дуже зручним об’єктом для вивчення формування целюлозних мікрофібрил.

Протопласти вищих рослин можна отримувати механічним і/або ферментативним методом.

Вперше протопласти були виділені Клеркером у 1892 році при вивченні плазмолізу із тканин листка водяної рослини тіліріз (*Stratiotes aloides*). Він спочатку плазмолізував рослинні тканини, а потім видаляв клітинну стінку. Таким методом можна виділити протопласти із епідерми цибулі (в 0,1 М розчині сахарози). Якщо після плазмолізу розрізати лезом смужку епідерми, то протопласти будуть виходити в середовище, яке містить осмотичний стабілізатор. Такий метод виділення протопластів називаються механічним, або фізичним.

Незважаючи на модифікації і вдосконалення механічний метод і сьогодні має певні обмеження:

1) цим методом можна виділити тільки невелику кількість протопластів;

2) використовуються тільки ті тканини, в яких відбувається інтенсивний плазмоліз, тобто ті які мають вакуолізовані клітини паренхімного типу;

3) метод тривалий і трудомісткий, а тому зараз використовується дуже рідко.

Сьогодні широко застосовується ферментативний, або хімічний метод виділення ізольованих протопластів. У цьому випадку для руйнування клітинної стінки використовуються суміші ферментів. До перших робіт по ферментативному виділенню протопластів можна віднести досліди, в яких протопласти клітин гриба були ізольовані в результаті обробки клітинних стінок шлунковим соком слимака *Helix pomatia* (1919).

Вперше протопласти із клітин вищих рослин ензиматичним методом виділив Кокінг у 1960 році. Він виділив протопласти із корінців проростків томатів, обробляючи їх гідролітичним ферментом (целюлазою) із культуральної рідини пліснявих грибів *Myrothecium verrucaria*.

Ферментативний спосіб має великі переваги, бо він дає можливість отримувати значні кількості непошкоджених протопластів із будь-якого органа чи тканини, і порівняно швидкий.

На сьогодні протопласти отримують із однодольних і дводольних рослин, використовуючи листки, пагони, колеоптилі, бульби, плоди, пилок, калюсні культури.

Для виділення протопластів, як правило, використовують молоді рослини. Перевага надається рослинам, які виросли у стерильних умовах *in vitro*. У дослідженнях ряду авторів (Хромова и др., 1984; Chaoxi et al., 1987; M.C. Tan et al., 1987) показано, що на життєздатність ізольованих протопластів, та їхню здатність до регенерації клітинної стінки, до поділів, утворення мікроколоній впливає фізіологічний стан вихідного матеріалу, який визначається умовами культивування. Крім того, від фізіологічного стану вихідного матеріалу залежала здатність тканини до мацерації. Найкращі результати були отримані при вирощуванні рослин на середовищі зі зменшеним вмістом сахарози (0,5 %) і затемненні рослин перед виділенням протопластів. Або при вирощуванні вихідних рослин при низькій інтенсивності світла (1500 – 2000 Лк) і короткому фотоперіоді (6 г). Дослідники пояснюють збільшення кількості життєздатних протопластів тим, що при слабкому освітленні або на середовищі з низьким вмістом сахарози різко знижується інтенсивність фотосинтезу, в результаті чого зменшується вміст вільних цукрів і клітини синтезують тоншу клітинну стінку, яка містить менше пектину. Щодо значення або впливу вирощування вихідного матеріалу при низьких плюсових температурах на вихід ізольованих протопластів, то дані протилежні: M.C. Tan (1987) відмічає збільшення кількості ізольованих протопластів за

таких умов, тоді як Хромова із співр. (1984) зазначають, що зниження температури в період культивування вихідних рослин не приводило до підвищення ефективності процесу отримання життєздатних протопластів, що активно діляться.

При виділенні протопластів із культури тканин (калюс або клітинна суспензія) необхідно враховувати:

1) вік вихідної тканини у циклі вирощування: краще використовувати тканину, що перебуває на стадії раннього експоненціального росту, коли у популяції значна кількість клітин, які здатні почати поділ;

2) особливості росту тканини – для виділення протопластів краще використовувати пухку, недиференційовану тканину, яка утворює невеликі агрегати клітин при культивуванні у рідкому середовищі.

Важливе значення для успішного виділення життєздатних, нативних протопластів має підбір осмотичного стабілізатора. З наявністю клітинної стінки у рослинної клітини пов'язана регуляція її водообміну. Як відомо, сисну силу формують не лише осмотичні властивості клітини, але і тургорний тиск. Зі збільшенням кількості води у клітині зростає тургорний тиск і, відповідно, зменшується її сисна сила. Процес надходження води у клітину припиняється повністю, коли тургорний тиск стає рівним осмотичному тиску. Таким чином, структурна організація клітини, яка включає протопласт і клітинну стінку, формує саморегуляторний механізм водообміну.

Тому для ізольованих протопластів, позбавлених клітинної стінки особливе, дуже важливе значення мають осмотичні властивості середовища виділення і культивування. Як осмотичні стабілізатори використовують цукри – глюкозу, сахарозу, маніт, сорбіт, ксилозу і іноді іонні осмотики – розчини солей $CaCl_2$, KCl, $Na_2HPO_4$. Маніт використовують частіше, ніж сорбіт так як він має слабку проникну здатність у клітини, проникнення у клітини сорбіту супроводжується і проникненням ферментів. Використовують суміш маніту і сорбіту. Використання у ферментних системах розчинів глюкози і сахарози створює умови близькі до умов культивування, хоча ці цукри активно проникають через мембрану. У тих випадках, коли використання цукрів не дає хороших результатів, як осмотичні стабілізатори використовують розчини солей. Хоча відомо, що солі мають більшу проникну здатність, ніж цукри, і знижують активність деяких гідролітичних ферментів.

Розчини макро- і мікросолей часто беруть за основу до якої додають інші фізіологічно активні речовини. Це пом'якшує процес виділення протопластів. Особливо коли він тривалий, і наближає його до умов культивування тканини у суспензії. Неправильний вибір осмотичного агента може привести до розриву плазмалеми або спричинити спонтанне злиття протопластів і утворення багатоядерних клітин. Оптимальним для виділення протопластів є 0,3 – 0,8 М розчини.

Для ферментативного руйнування клітинної стінки використовують препарати трьох типів – целюлази, геміцелюлази і пектинази, які отримують із культур різних грибів (*Myrothecium verrucaria, Trichoderma viride, Aspergillus* та інші), а також травного соку слимака *Helix pomatia*. Найчастіше використовують целюлазні препарати "*Onozuka*", "*Driselase*" і препарати пектинази– "*Macerozyme*", "*Pectinase*" або "*Pectinol*". Дія цих ферментів направлена на руйнування основних компонентів клітинної стінки. У рослин це целюлоза, геміцелюлоза і пектинові речовини. Целюлозні молекули, які зібрані у мікрофібрили, формують пухкий, але міцний структурний остов. Він занурений у аморфний матрикс, який складається із геміцелюлоз, пектинових речовин і білків.

У первинній клітинній стінці на долю целюлози припадає до 30% від сухої маси і стільки ж на пектинові речовини, 40% становлять геміцелюлози. Ці співвідношення можуть варіювати у клітинах різних типів тканини залежно від функціональних особливостей, віку, наявності вторинних потовщень. Тому комбінації ферментних препаратів і їх співвідношення специфічні для кожного типу клітин. Так для отримання протопластів із тканини плодів, які як правило мають високий вміст пектину, особливо підходить пектиназа. Тоді як, при виділенні протопластів із мезофілу листка слід використовувати суміш пектинази і целюлази – ферменту, що руйнує целюлозні компоненти клітинної стінки.

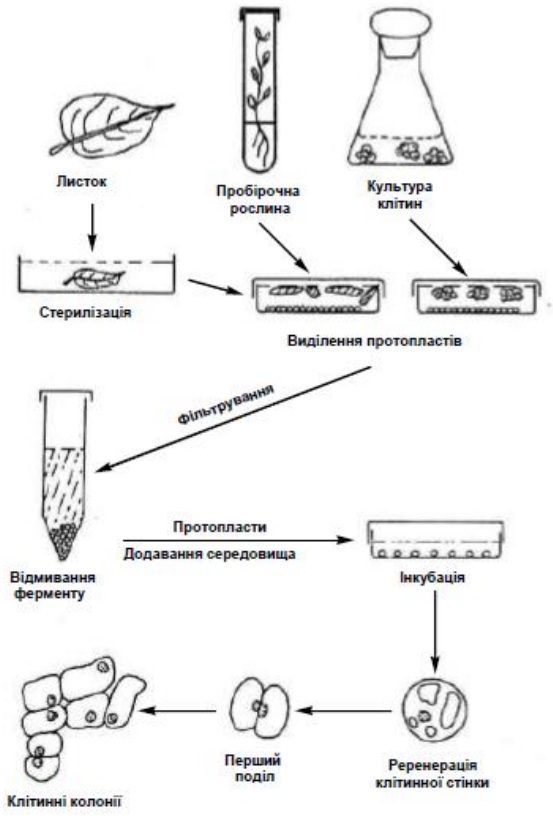
Оптимальні умови для виділення протопластів дуже індивідуальні для різних тканин, а тому у кожному випадку необхідно підбирати склад суміші ферментів, їх концентрації і співвідношення, а також тривалість обробки. Виділені протопласти повинні контактувати з ферментом мінімальний час, а потім їх треба ретельно відмити.

Час виділення протопластів залежить від концентрації ферменту. При великих концентраціях тривалість інкубації становить 1 – 4 год, при невисоких – 12 – 20 год, оптимальні умови pH 5 – 6, температура 23 – 26 °С. Іноді необхідне слабке покачування протягом інкубації з ферментом.

**Виділення і очистка ізольованих протопластів картоплі**

Як вихідний матеріал для виділення протопластів, як правило, використовують інтактні листки або калюсні і суспензійні культури. Виділення протопластів проводять за методом фільтрації–центрифугування.

**Виділення протопластів із мезофілу листка**




Для виділення мезофільних протопластів використовують рослини певного віку, наприклад, при отриманні протопластів із листків тютюну беруть 50 – 60 добові рослини, із листків бобів – 14 – 18 добові. Ферментні розчини готуються безпосередньо перед використанням і стерилізуються через бактеріальний фільтр (1 % *Cellulysin* – целюлаза, 0,5 % *Macerozyme* – пектиназа).

1. Листки нарізають тонкими смужками (менше 1 мм) і кладуть на поверхню ферментного розчину. Ферментацію проводять у чашках Петрі або у колбочках об’ємом 50 мл. Оптимальну температуру і час інкубації необхідно підбирати для кожного конкретного випадку.

2. Тотальний препарат протопластів після інкубації у ферментному розчині фільтрують через нейлонову сітку (розмір пор – 50 – 100 мкм), щоб позбутися шматочків тканини і елементів провідної системи.

3. На поверхню ферментного розчину акуратно нашаровують сольове середовище W-5, до складу якого входять NaCl, $CaCl_2$, KCl і глюкоза.

4. Суспензію протопластів центрифугують при 100g 2 – 3 хв.

5. Протопласти, які флотували на межі ферментного розчину і середовища W-5, акуратно відбирають пастерівською піпеткою і переносять у центрифужну пробірку, у яку до 1 мл суспензії протопластів додають 8 – 10 мл сольового середовища W-5 і центрифугують при 80 – 100 g 3 хв.

6. Осад протопластів двічі відмивають у середовищі W-5 центрифугуванням.

**Виділення протопластів із культури клітин**

Оскільки клітини у суспензійній культурі мають потовщену клітинну стінку, що ускладнює її гідроліз ферментами і тому зменшується вихід протопластів, то для підвищення цього показника (виходу ізольованих протопластів) рекомендують пересаджувати клітинну суспензію на свіже живильне середовище кожні 2 – 3 доби.

Для виділення протопластів із суспензії її спочатку фільтрують, а потім клітини суспендують у ферментному розчині або змішують суспензію із ферментом у співвідношенні 1:1. Ферментна суміш: 1,5% *Onozuka* (целюлаза), 0,5% *Macerozyme* (пектиназа) і 0,2% *Cellulysin*.

Суспензію рекомендують інкубувати на шейкері. Температуру і час необхідно підбирати індивідуально для кожного об’єкта.

Подальші операції аналогічні тим, які проводять при виділенні мезофільних протопластів.

**Культивування ізольованих протопластів**

Способи культивування ізольованих протопластів відповідають тим, що використовують для вирощування клітин. Протопласти культивують у рідкому і агаровому середовищах.

Одним із прийомів культивування ізольованих протопластів у рідкому середовищі є метод рідких крапель. У цьому разі суспензію протопластів у вигляді крапель поміщають на рідке середовище в чашках Петрі. Метод забезпечує хороший газообмін. Однак при культивуванні цим способом ізольовані протопласти агрегуються у центрі кожної краплини, накопичуючись вони утворюють значні кількості фенольних та інших токсичних сполук, що заважає нормальному культивуванню протопластів.

Другий спосіб культивування ізольованих протопластів – агарова культура або метод плейтінга. У цьому випадку певний об’єм суспензії протопластів у рідкому живильному середовищі наливають у чашки Петрі, додають рівний об’єм того ж самого середовища, яке містить 1% агару. Температура не вища $45^0$С. Чашки Петрі заклеюють парафілмом і культивують перевернутими при температурі близько $28^0$С.

Протопласти фіксовані в одному положенні і фізично відокремлені один від одного. Основна перевага, цього способу культивування це можливість спостерігати для кожного конкретного протопласта всю послідовність розвитку – формування клітинної стінки, поділ клітин, ріст і

розвиток рослини. Недолік полягає у можливому пошкодженні протопластів коли вони змішуються з агар-агаром.

Таблиця

**Склад (мг/л) середовищ для культивування протопластів**

| Компоненти середовища | Гамборга та Евелега | Мурасиге і Скуга | Нагате і Такебе | Шенка і Хільдебрандта |
|---|---|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | | 1650 | 825 | |
| $KNO_3$ | 2500 | 1900 | 950 | 2500 |
| $CaCl_2–2H_2O$ | 150 | 440 | 220 | 200 |
| $MgSO_4–7H_2O$ | 500 | 370 | 1233 | 500 |
| $NaH_2PO_4$ | 150 | | | 300 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 134 | | | |
| $KH_2PO_4$ | | 170 | 680 | |
| $FeSO_4–7H_2O$ | 27,25 | 27,85 | 27,8 | 27,85 |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 37,25 | 37,25 | 37,3 | 37,3 |
| $H_3BO_3$ | 3 | 6,2 | 6,2 | 5 |
| $ZnSO_4–7H_2O$ | 2 | 8,6 | 8,6 | 1 |
| $CuSO_4–5H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,2 |
| $CoCl_2–6H_2O$ | 0,025 | 0,025 | 0,03 | 0,1 |
| KI | 0,75 | 0,83 | 0,83 | 1 |
| $Na_2MoO_4–2H_2O$ | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,1 |
| $MnSO_4–H_2O$ | 10 | 22,3 | 22,3 | 10 |
| Інозит | 100 | 100 | 100 | 100 |
| РР | 1 | | | 5 |
| $B_1$ | 10 | 1 | 1 | 5 |
| $B_6$ | 1 | 1 | | 0,5 |
| Са-пантотенат | 1 | 1 | | 5 |
| Кінетин | | 5 | | 0,1 |
| НОК | | 1 | 3 | |
| 2,4-Д | 2 | | | 1 |
| Сахароза | 20000 | 30000 | 10000 | 30000 |
| Маніт | | | 0,7 М | |
| pH | 5,5 | 5,5 | 5,8 | 5,6 |

Різновидністю агарової культури є сумісні культури. Цей спосіб використовується для ефективного культивування деяких протопластів. Протопласти, які відрізняються швидким ростом, змішують з протопластами, які важко культивувати. Вважають, що успішне культивування обумовлене речовинами, які виділяють протопласти, що швидко ростуть.

***Умови культивування протопластів***

Середовище. Основна вимога до середовищ полягає у тому, щоб у процесі культивування не відбувалося руйнування ізольованих протопластів, бо до утворення клітинної стінки протопласти – це дуже ніжні структури, і щоб воно було оптимальним для утворення клітинами колоній.

Як правило, середовище має складатися з осмотичного стабілізатора, неорганічних сполук, джерел вуглецю, вітамінів, джерел органічного азоту і фітогормонів. Як осмотичний стабілізатор можна використовувати маніт, сорбіт та їхні комбінації. Склад мінеральних солей відповідає складу мінеральних солей в середовищах для культивування клітин рослин. Можна міняти співвідношення амонійного та нітратного азоту залежно від потреб клітин, збільшувати концентрацію $CaCl_2$ для стабілізації клітинної стінки, що формується.

Як джерело вуглецю використовують глюкозу, сахарозу, їх суміш. Сахароза не завжди може бути придатним компонентом середовища для протопластів. У деяких випадках додають рибозу, ксилозу, фруктозу, манозу та інші цукри.

До складу вітамінів при культивуванні ізольованих протопластів мають входити тіамін HCl ($B_1$), піридоксин HCl ($B_6$) і нікотинова кислота (РР). При невеликій щільності висіву необхідно додавати й інші вітаміни.

Як джерела азоту до середовища додають амінокислоти, найчастіше використовують гідролізат казеїну, який є сумішшю амінокислот і додають його в тому разі, коли в середовищі недостатній вміст неорганічного азоту, а його концентрацію вже не можна збільшити.

Ауксини і цитокініни необхідні для клітинного ділення і подальшого розвитку рослинних клітин. Як правило використовують 2,4-Д, НОК, кінетин, БАП, зеатин. Оптимальні концентрації фітогормонів підбирають у кожному конкретному випадку.

Важливого значення при культивуванні ізольованих протопластів набувають і інші умови. Так, pH середовища має становити від 5,4 до 5,8.

Температура, при якій культивують ізольовані протопласти варіює в значній мірі залежно від виду. Так, для протопластів одного представника злаків – росички (*Digitaria sanguinalis*) оптимальною є температура 30 °С, а для пшениці 22 °С. Більшість ізольованих протопластів культивується при температурі 24 – 26°С.

Що стосується інтенсивності світла, то у більшості випадків дослідники прийшли до висновку, що світло високої інтенсивності згубно впливає на ізольовані протопласти. Але оптимальні значення освітленості варіюють у широких межах. Так, люцерна утворює колонії у абсолютній темряві (100 – 700 Лк), а для протопластів *Nemesia strumosa* (немезія – норичникові) оптимальний ріст спостерігали при освітленості 80 000 Лк.

Суттєвим фактором культивування є щільність висіву протопластів. При дуже низькій щільності протопласти часто не діляться. З іншого боку, при дуже високій щільності труднощі виникають на пізніших стадіях, коли на ріст можуть впливати продукти обміну, що виділяються. Оптимальна щільність протопластів у культурі $10^4$ – $10^6$ пр/мл. Дещо компенсувати високу щільність висіву протопластів можна додавши до живильного середовища активоване вугілля.

У процесі культивування ізольовані протопласти регенерують нову клітинну стінку і перетворюються у звичайну клітину, яка культивується *in vitro*. Саме ця обставина робить ізольовані протопласти зручною моделлю для вивчення формування целюлозних мікрофібрил. Дрібні протопласти, отримані із меристематичної тканини, починають формувати стінку приблизно через 1,5 години після початку культивування і через добу клітинна стінка повністю покриває протопласти. Протопласти із дорослих листків мають більші розміри і регенерують стінку значно повільніше: через 4 години з'являються перші осередки новоутворення стінки, а через добу стінка ще не утворює суцільний покрив.

Спостереження за регенерацією клітинної стінки у протопластів скімії показали, що у цей період спостерігається сильне збільшення ендоплазматичного ретикулума. Припускають, що у шорстких ділянках ендоплазматичного ретикулума утворюються ферменти, які беруть участь у синтезі попередників целюлози.

У ході регенерації целюлозних компонентів клітинної стінки, можна виділити два періоди:

I$^{й}$ період – синтез іде дуже повільно і приводить до утворення незначної кількості целюлози;

II$^{й}$ період – починається приблизно через 8 діб після культивування, і характеризується різким збільшенням (у 5 разів) швидкості синтезу целюлози.

Заново синтезована клітинна стінка не містить пектинові речовини.

Як правило, ізольовані протопласти більшості видів рослин через добу утворюють клітинну стінку, а через 2 – 3 доби відбувається перший поділ. Другий поділ відбувається на 7 – 8 добу, потім утворюється 8-клітинні колонії і на 21 – 30 добу культивування формуються багатоклітинні колонії.

При перенесенні їх на агарове середовище утворюється калюс, із якого можна отримати цілу рослину. Регенерація рослин відбувається або через ембріогенез, або через утворення калюсу з подальшою індукцією морфогенезу.

**Злиття ізольованих протопластів**

Ізольовані протопласти за той час поки вони не утворили клітинну стінку, можуть зливатися між собою. Злиття протопластів може бути спонтанним. Це явище, причиною якого може бути збереження плазмодесм між сусідніми клітинами, відбувається дуже рідко. Тривала інкубація або зависока концентрація ферментної суміші різко зменшують спонтанне злиття. А тому для стимуляції злиття протопластів запропоновано ряд методів.

Перше повідомлення про злиття ізольованих протопластів зроблене Кюстер у 1909 році. Для індукції злиття протопластів він випробував кілька речовин і прийшов до висновку, що найефективнішим є нітрат кальцію, хоча частота злиття протопластів була низькою.

Протягом останніх 20 років, в якості індукторів злиття ізольованих протопластів випробували: $NaNo_3$, штучну морську воду, лізоцим, желатину, високе pH – висока концентрація $Ca^{++}$, антитіла, рослинний лектин конвалін, ПЕГ, полівініловий спирт, позитивно заряджені синтетичні фосфоліпіди та інші речовини.

На даний час найпоширенішою є методика, коли для індукції злиття протопластів використовують розчини з високим pH (9 – 11) і концентрацією іонів $Ca^{++}$ (100 – 300 мМ). При цьому протопласти попередньо аглютинують за допомогою розчину ПЕГ. Використовуючи цю методику можливо стимулювати до злиття 10 – 50 % протопластів.

Зімерман з співробітниками у 1981 році розробили фізичний метод злиття протопластів, у якому як індуктор злиття використовують імпульси електричного струму. Протопласти поміщають в камеру, де створюється неоднорідне, змінне електричне поле. За цих умов на електродах формуються агрегати, які складаються з 2 – 3 протопластів, або між електродами формуються “ланцюжки” із 5 – 6 протопластів (це явище

відомо як діелектрофорез). До цієї системи додатково додається одиничний імпульс, який викликає злиття протопластів в агрегаті. Всі фізичні параметри підбираються індивідуально. Злиття відбувається при питомій електропровідності середовища нижчій $10^{-4}$ См/см. Цю умову задовольняє 0,5 М розчин маніту, який відноситься до неелектролітів: його питома електропровідність $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ См/см.

Злиття, що індукується електричним струмом, має таке пояснення: імпульс короткої тривалості викликає руйнування мембран протопластів, що стикуються. Навколо “дірки” можливий обмін ліпідними молекулами, утворення ліпідних містків, що призводить до злиття мембран. Це енергетично більш вигідний стан, ніж існування двох пошкоджених мембран.

Ефективність електрозлиття залежить від віку рослини, походження протопластів, їх розмірів, довжини “ланцюжка”, щільності суспензії протопластів, тривалості дії поодинокого імпульсу.

Для автоматизації процедури електрозлиття ізольованих протопластів розроблено і вже застосовується ряд установок. Наприклад, Electro Cell Manipulator 200 (США), або установка, створена НВО “Корна” (Росія). Ці установки складаються з генератора напруги, генератора поодиноких імпульсів, підсилювача потужності, кювет з платиновими електродами.

Отже, у всіх методах злиття протопластів на першому етапі відбувається їх агрегація.

Аналіз експериментальних матеріалів, що стосується структури і властивостей мембран при впливі індукторів злиття, показує, що в умовах високого pH, під дією високих концентрацій $Ca^{2+}$ у рослинних протопластів відбувається збільшення плинності мембран. ПЕГ не викликає збільшення плинності мембран, а сприяє агрегації протопластів.

Розробка способів індукції злиття протопластів разом з розвитком техніки культивування клітин *in vitro*, що дає можливість отримання ізольованих протопластів, їх культивування, утворення калюсу, а в подальшому цілої рослини, сформували новий і перспективний метод гібридизації рослин – парасексуальну, або соматичну гібридизацію.

Соматична гібридизація – гібридизація рослин в обхід статевого схрещування, при якій як батьківські клітини використовують ізольовані протопласти соматичних клітин або клітини, що культивуються *in vitro*.

Цей метод дозволяє схрещувати філогенетично віддалені види рослин, які неможливо схрестити звичайним статевим шляхом, отримувати асиметричні гібриди. На відміну від статевого схрещування, де відбувається одностороннє виключення протоплазми, при соматичній гібридизації в утвореному гібриді обидва партнери мають відносно рівний цитоплазматичний статус. Злиття протопластів сприяє об'єднанню двох різних цитоплазм. У більшості випадків злиття ізольованих протопластів призводить до утворення або гібрида, або цибрида (цитоплазматичного гібрида).

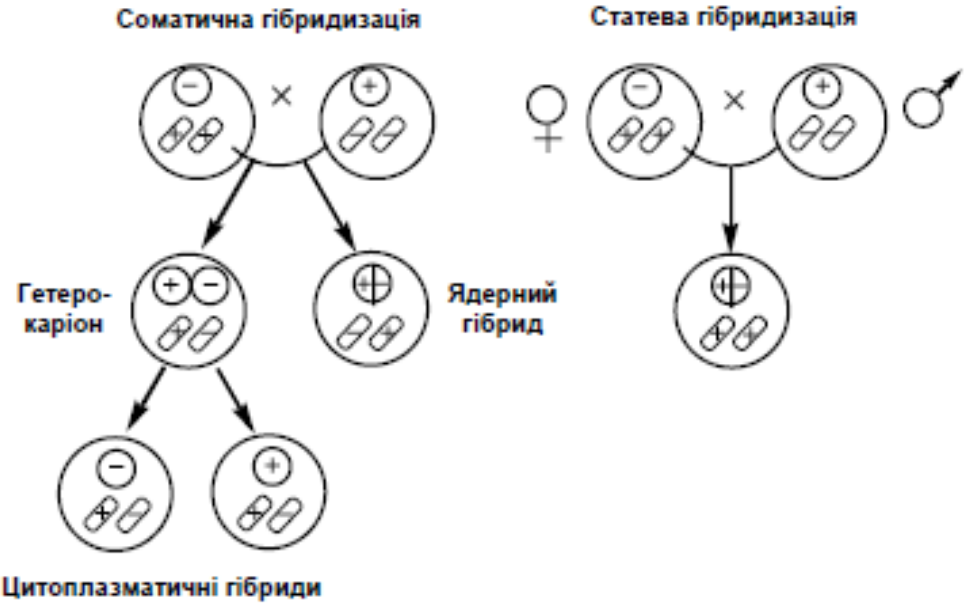



**Рис. Схеми успадкування батьківських ядерних (кружок) і позаядерних (овал) детермінант при соматичній і статевій гібридизаціях**

Цибридна клітина містить цитоплазму обох партнерів, а ядро – одного. Утворення рослин з гібридною цитоплазмою і органелами обох партнерів, але з ядром лише одного виду можливе у тому разі, якщо після злиття протопластів не відбувається з'єднання ядер і одне ядро дегенерує. Утворення цибридів можливе і в тому випадку, коли один із протопластів позбавлений ядра або воно інактивоване шляхом опромінення.

Цибридизація дозволяє ввести цитоплазматичні гени, які несуть ознаки ЦЧС (цитоплазматичної чоловічої стерильності), стійкості до деяких гербіцидів і патогенів.

Перший нестатевий міжвидовий гібрид вищих рослин отриманий в 1972 р. шляхом злиття ізольованих протопластів двох видів тютюну: *Nicotiana glauca і N. Langsdorfii.* Одним із найцікавіших соматичних

гібридів є *pomato* – гібрид картоплі й томату, одержаний у 1978 р. І хоча цей гібрид поки що стерильний, а діаметр його плодів не перевищує 3 мм, саме його існування привертає увагу до методу прогресивних селекціонерів.

На сьогодні методами соматичної гібридизації отримані внутрішньовидові (дурману, петунії та ін.), міжвидові (петунії, моркви, дурману, картоплі), міжродові (томати + картопля; арабідопсис + турнепс; дурман + красавка) та міжродинні гібриди (горох + тютюн; цибуля + тютюн). Однак у багатьох випадках гібридні рослини, отримані таким способом, в певній мірі, ненормальні. Наприклад соматичний гібрид між арабідопсисом і турнепсом, який є рослиною- монстром. Аномалії, що виникають, є результатом хромосомної незбалансованості.

Особливий інтерес становлять міжцарственні гібриди, які отримані від злиття протопластів рослинних і тваринних клітин. Описані гібриди між протопластами моркви і людини, тютюну і людини та інші.

**Селекцію соматичних гібридів** здійснюють кількома методами.

При механічній ізоляції використовують морфологічно різні типи батьківських протопластів, після злиття продукти з'єднаних протопластів виявляють візуально під мікроскопом, ізолюють мікропіпеткою і культивують окремо. Наприклад при злитті протопластів тютюну і моркви як селективні маркери використовували зелені хлоропласти тютюну і червоно-оранжеві хромопласти моркви.

Другим методом, який дозволяє проводити відбір соматичних гібридів, є фізіологічна комплементація – спільна взаємодоповнююча дія різних генів. Протопласти двох видів тютюну *N. glauca* і *N. langsdorfii* утворювали клітинні стінки, але не могли ділитися і утворювати калюс на середовищі Нагата і Такебе. В той же час протопласти гібриду ділилися і утворювали калюс. Ще однією особливістю гібридного калюсу була здатність рости на середовищі без гормонів, що дало можливість створити цей метод селекції.

Існують також інші методи відбору соматичних гібридів. Наприклад: селекція за стійкістю до антибіотиків, гербіцидів, аналогів амінокислот і т.д.

Використання ізольованих протопластів не обмежується можливістю отримання соматичних гібридів. Ізольовані протопласти широко використовують у клітинній селекції та генетичній трансформації.

**Завдання**

1. Описати механічний метод виділення протопластів.
2. Описати ферментативний метод виділення протопластів.
3. Чому у середовища для виділення та культивування ізольованих протопластів обов'язково додавати осмотичний стабілізатор?
4. Які речовини використовують при виділенні ізольованих протопластів як осмотичні стабілізатори?
5. Які ферменти використовують для виділення ізольованих протопластів?
6. Що обумовлює вибір складу ферментної суміші?
7. За яким методом проводять виділення ізольованих протопластів із листка? Охарактеризуйте його.
8. Як відбувається виділення протопластів із культури клітин?
9. Як щільність висіву ізольованих протопластів впливає на їхню життєздатність?
10. Які соматичні гібриди були одержані методом злиття ізольованих протопластів?

# ТЕМА 14-15: МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ: ВУГЛЕВОДИ ТА БІЛКИ

***Мета:*** вивчити вуглеводи та білки, їх структуру, властивості і функції.

## *Теоретична частина*

### Структура та функції вуглеводів

***Органічні речовини.*** **Органічними** називають сполуки, в основі яких лежить ланцюг, який утворений ковалентно зв'язаними атомами Карбону і може мати різну просторову структуру. Такі сполуки утворюються завдяки здатності атомів Карбону формувати між собою одинарні, подвійні й потрійні зв'язки.

Скелет органічних сполук може бути лінійним, розгалуженим, циклічним і комбінованим, тобто включати всі три попередні варіанти (рис 1).

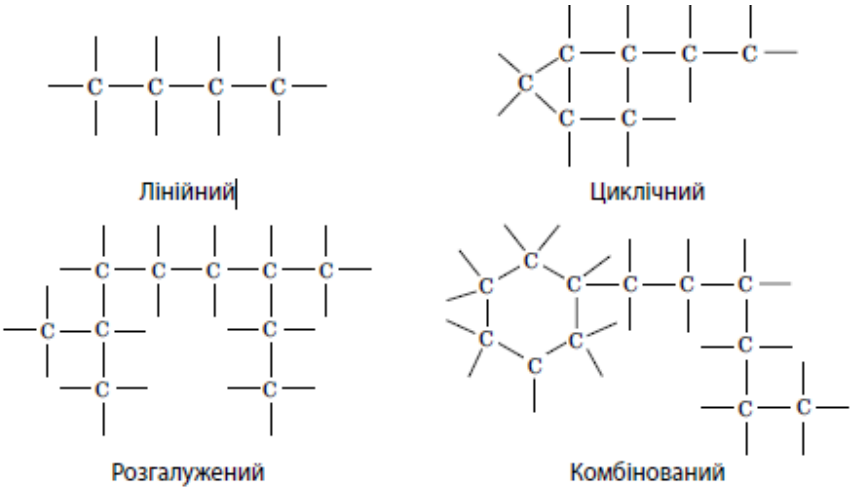



**Рис. 1. Карбонові скелети**

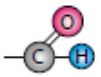
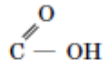
Завдяки неймовірній різноманітності можливих варіантів карбонового скелета органічні сполуки теж є дуже різноманітними.

Різноманітність органічних сполук забезпечується також різними функціональними групами, що входять до їх складу. Саме функціональні групи (табл. 1) надають органічним сполукам характерних особливостей, визначаючи їхній «характер».

Значення органічних речовин для живих організмів важко переоцінити, оскільки саме вони забезпечують перебіг усіх процесів життєдіяльності.

Таблиця 1

**Основні функціональні групи**

| Функціональна група | Структурна формула |
|---|---|
| Гідроксильна | — OH |
| Карбонільна:<br>Альдегідна |  |
| Кетонна | |
| Карбоксильна |  |
| Аміногрупа | |

**Вуглеводи** — це органічні речовини, до складу яких входять Карбон, Оксиген і Гідроген.

Назва вуглеводів походить від слів «вуглець» і «вода». Причиною цього є те, що перші з відомих науці вуглеводів описувалися формулою C*x*(H2O)*y*. Вуглеводи називають також **цукрами**. Ця назва походить від давньоіндійського слова «саркара» (буквально: «гравій, галька, пісок, цукровий пісок»). Так в Індії називали солодкі кристали, які добували із соку тростини.

За хімічною характеристикою вуглеводи — це органічні речовини, що містять кетонну або альдегідну групу та декілька (тобто більше ніж одну) гідроксильних груп.

Вуглеводи, що містять альдегідну групу, називаються **альдозами**, а вуглеводи, що містять кетонну групу, – **кетозами** (рис. 2.).

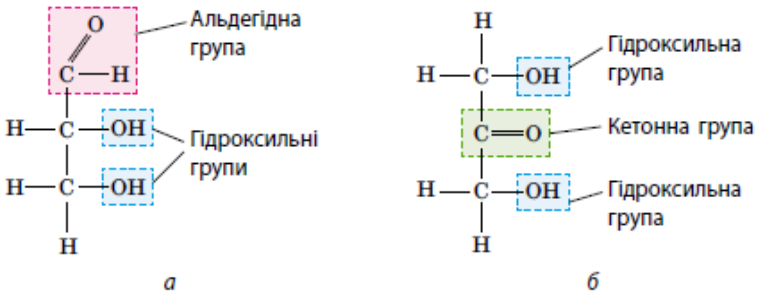



**Рис. 2. Приклад альдози – гліцеральдегід (а); кетози – (б)**

На рис. 2 зображено вуглеводи, у ланцюгу яких є лише три атоми Карбону. Є у вуглеводів і довші ланцюги, наприклад фруктоза і глюкоза (рис. 3).

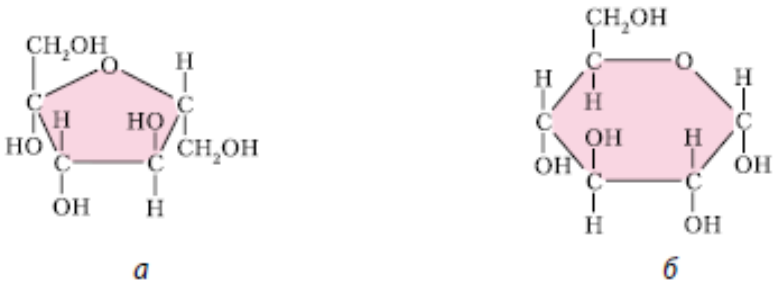



**Рис. 3. У молекулі фруктози (а) пять атомів Карбону, глюкози (б) – шість атомів Карбону**

Залежно від кількості атомів Карбону, що входять до молекули вуглеводу, розрізняють **тріози**, що містять три атоми Карбону, **тетрози** – чотири атоми, **пентози** – п’ять, **гексози** – шість атомів і так далі, відповідно до назв числівників грецькою мовою. Глюкоза за кількістю атомів Карбону є гексозою, а рибоза — пентозою.

***Моносахариди.*** Усі перелічені вище вуглеводи називають **моносахаридами**, оскільки вони складаються з однієї структурної одиниці (від грец. *monos* — один).

Якщо в молекулі моносахариду атомів Карбону більше від трьох, така молекула може утворювати циклічну форму, оскільки її частини реагують одна з одною. У живих організмах моносахариди частіше зустрічаються саме в циклічній формі (рис. 3).

Моносахариди називають також простими цукрами, оскільки вони складаються з однієї молекули. **Прості цукри** являють собою тверді безбарвні кристалічні речовини, добре розчинні у воді. Майже всі вони мають приємний солодкий смак. Наприклад, солодкий смак фруктів, ягід, меду залежить від вмісту в них глюкози та фруктози.

До моносахаридів належать також галактоза, рибоза, дезоксирибоза.

Моносахариди можуть виконувати енергетичну та структурну функції. **Глюкоза** — первинне джерело енергії для клітин. Вона входить до структури майже всіх клітин, тканин та органів.

**Фруктоза** у великій кількості у вільному вигляді міститься у плодах, тому її часто називають плодовим цукром. Особливо багато фруктози в меді, цукровому буряку, фруктах.

**Галактоза** відрізняється від глюкози тільки розташуванням гідроксильної групи та Гідрогену в четвертого карбонового атома. Вона може перетворюватися на глюкозу в печінці й інших органах. **Рибоза** та **дезоксирибоза** входять до складу нуклеїнових кислот — великих молекул, що беруть участь у процесах передавання, реалізації та зберігання спадкової інформації у клітині.

***Дисахариди.*** Молекули моносахаридів можуть з'єднуватися одна з одною з виділенням води. У результаті утворюються **олігосахариди** (від грец. *oligos* — нечисленний), до яких належать дисахариди, трисахариди, тетрасахариди та **полісахариди** (від грец. *poly* — багато). До дисахаридів належать сахароза, лактоза та мальтоза (рис. 4).

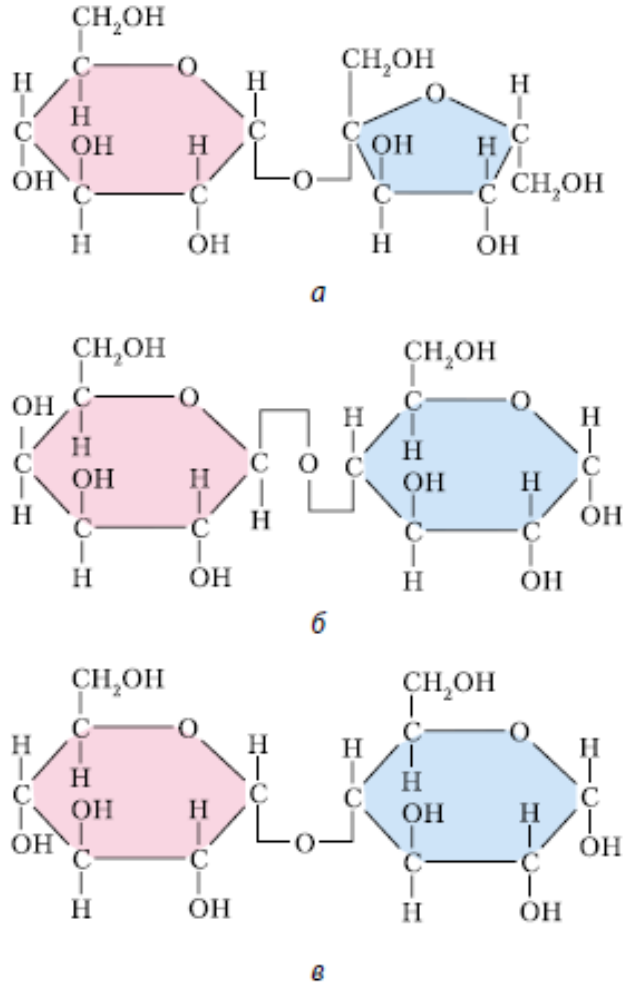


**Рис. 4. Дисахариди: а – сахароза; б – лактоза; в – мальтоза**

**Сахароза** — тростинний або буряковий цукор. Складається із залишків глюкози та фруктози. Міститься в насінні, ягодах, корінні, бульбах, плодах. Відіграє важливу роль у харчуванні багатьох тварин та людини. Легко розчиняється у воді. Головні джерела добування сахарози

(харчового цукру) у харчовій промисловості — цукровий буряк і цукрова тростина.

**Лактоза** — молочний цукор, має у своєму складі глюкозу та галактозу.

Він входить до складу молока і є джерелом енергії для дитинчат ссавців.

**Мальтоза** складається із двох молекул глюкози, є основним структурним елементом таких полісахаридів, як крохмаль та глікоген.

***Полісахариди.*** Органічні сполуки, що складаються з великої кількості структурних одиниць (мономерів), називають **полімерами**.

**Полісахариди** — це полімери, мономерами в яких є моносахариди.

Із полісахаридів найпоширеніші крохмаль, глікоген, целюлоза, хітин (рис. 5). Це високомолекулярні вуглеводи, що складаються з великої кількості моносахаридів. Вони мають дуже велику молекулярну масу.

**Рис. 5. Полісахариди: картопляний крохмаль**

**Крохмаль** є основним запасним полісахаридом у рослин. Кількість залишків глюкози в ньому налічує кілька тисяч. Він міститься у великій кількості в бульбах картоплі, плодах, насінні. У гарячій воді крохмаль утворює колоїдний розчин, що в побуті має назву крохмальний клейстер. Структурні компоненти крохмалю — амілоза й амілопектин (рис. 6, *а*, *б*).

**Глікоген** — запасний полісахарид, що міститься у тканинах тіла тварин та людини, а також у грибах, дріжджах тощо. Він відіграє важливу роль у перетвореннях вуглеводів в організмі тварин. У значній кількості накопичується в печінці, м’язах, серці та багатьох інших органах. Є

постачальником глюкози в кров. За структурою нагадує крохмаль, але є сильніше розгалуженим. Молекула глікогену складається приблизно із 30 000 залишків глюкози (рис. 6, *в*).

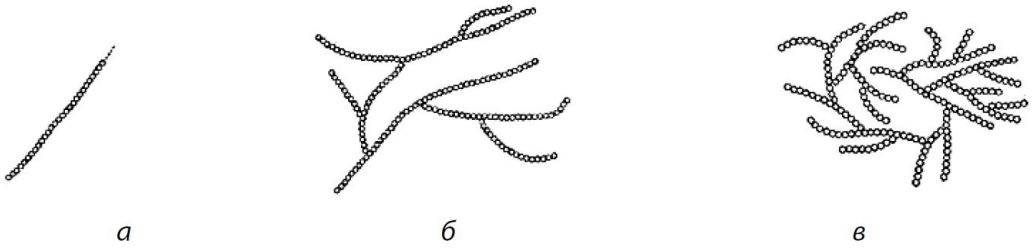



**Рис. 6. Полісахариди: а – амілоза; б – амілопектин; в – глікоген**

**Клітковина** (целюлоза) — головний структурний полісахарид клітинних оболонок рослин. Целюлоза за своєю структурою — лінійний полімер. Вона нерозчинна у воді й лише набухає в ній.

**Хітин** — основний компонент зовнішнього скелета членистоногих та деяких інших безхребетних тварин, входить до складу клітинної стінки грибів.

***Функції вуглеводів.*** Будова вуглеводів дозволяє їм виконувати багато біологічних функцій.

**Енергетична функція**. Вуглеводи слугують основним джерелом енергії для організму. Складні за структурою, багаті на енергію, вуглеводи зазнають у клітині глибокого розщеплення й у результаті перетворюються на прості, бідні на енергію сполуки — карбон(IV) оксид та воду. У ході цього процесу вивільняється енергія. У процесі розщеплення 1 г вуглеводів вивільняється 17,6 кДж енергії.

**Структурна функція**. В усіх без винятку тканинах та органах знайдено вуглеводи та їхні похідні. Вони входять до складу оболонок клітин і субклітинних утворень. Беруть участь у синтезі багатьох найважливіших речовин. У рослинах полісахариди виконують також опорну функцію.

**Функція запасання поживних речовин**. В організмі та клітині вуглеводи мають здатність накопичуватися у вигляді крохмалю у рослин та глікогену у тварин. Крохмаль і глікоген є запасними формами вуглеводів та витрачаються в міру виникнення потреби в енергії.

**Захисна функція**. В'язкі секрети (слизи), що виділяються різними залозами, багаті на вуглеводи та їхні похідні. Вони захищають стінки порожнистих органів (стравохід, кишки, шлунок, бронхи) від механічних пошкоджень, проникнення шкідливих бактерій і вірусів.

***Опорні точки***

Органічними називають сполуки, в основі яких лежить ланцюг із ковалентно зв'язаних атомів Карбону. Різноманітність органічних сполук забезпечується різними просторовими структурами ланцюга і функціональними групами, що входять до їхнього складу.

Вуглеводи — це органічні речовини, що містять нерозгалужений ланцюг із декількох атомів Карбону, карбонільну групу та декілька гідроксильних груп.

Вуглеводи виконують такі функції: енергетичну, структурну, захисну, запасаючу тощо.

**Структура і функції білків**

**Білки..** Багато органічних сполук, що входять до складу клітин, характеризуються великим розміром молекул і є біополімерами.

**Біополімери** – це органічні речовини, що складаються з повторюваних структурних одиниць – мономерів. До біополімерів належать молекули білків, що становлять 10–20 % від сирої маси та 50–80 % від сухої маси клітини.

**Білки** – це органічні сполуки, полімери, мономерами в яких є амінокислоти. **Амінокислоти** – це невеликі за розміром органічні сполуки, у молекулі яких одночасно містяться аміногрупа й карбоксильна група. Ці амінокислоти мають загальну формулу (рис. 7), де R – це радикал, який у кожної амінокислоти свій, а решта в молекулі амінокислот однакова.

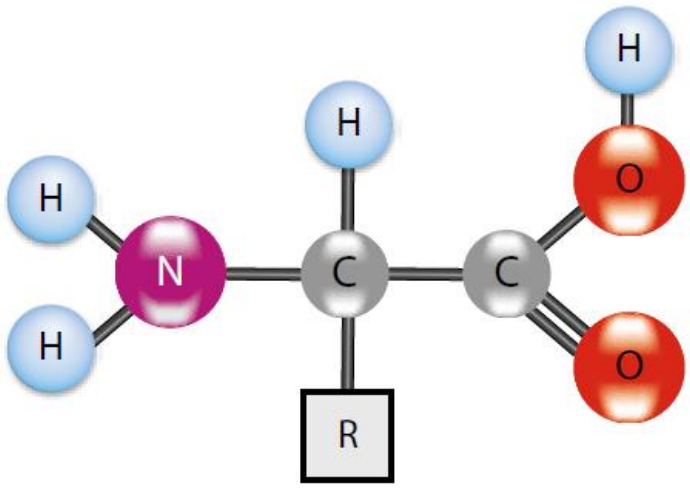



**Рис. 7. Загальна формула амінокислоти**

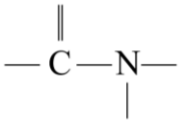
Білки називають також протеїнами (від грец. *protos* — перший,

головний). Цією назвою вчені вказали на надзвичайно важливе значення білків для всіх життєвих процесів.

У процесі біосинтезу білка до його складу включаються 20 амінокислот: аланін (Ала), аргінін (Арг), аспарагінова кислота (Асп), аспарагін (Асн), валін (Вал), гістидин (Гіс), гліцин (Глі), глутамінова кислота (Глу), глутамін (Глн), ізолейцин (Іле), лейцин (Лей), лізин (Ліз), метіонін (Мет), пролін (Про), серин (Сер), тирозин (Тир), треонін (Тре), триптофан (Три), фенілаланін (Фен), цистеїн (Цис).

Є амінокислоти, яких організми людини і тварин синтезувати не можуть, вони називаються незамінними й обов'язково мають надходити до організму з їжею. Незамінними амінокислотами для людини та тварин є: валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан та фенілаланін, а для дітей ще й амінокислоти аргінін та гістидин.

Амінокислоти можуть з'єднуватися одна з одною через спільні для них групи: аміногрупа однієї амінокислоти з'єднується з карбоксильною групою іншої амінокислоти (рис. 8). У процесі з'єднання утворюється молекула води. Між амінокислотами, що з'єдналися, виникає зв'язок



, який називають **пептидним**, а сполуки, що містять декілька амінокислот, називають **пептидами**. Сполуку з великої кількості амінокислот називають **поліпептидом**. Білок може являти собою один або декілька поліпептидів. До складу більшості білків входить 300–500 амінокислотних залишків, але є й більші білки, що складаються з понад 1500 амінокислот.

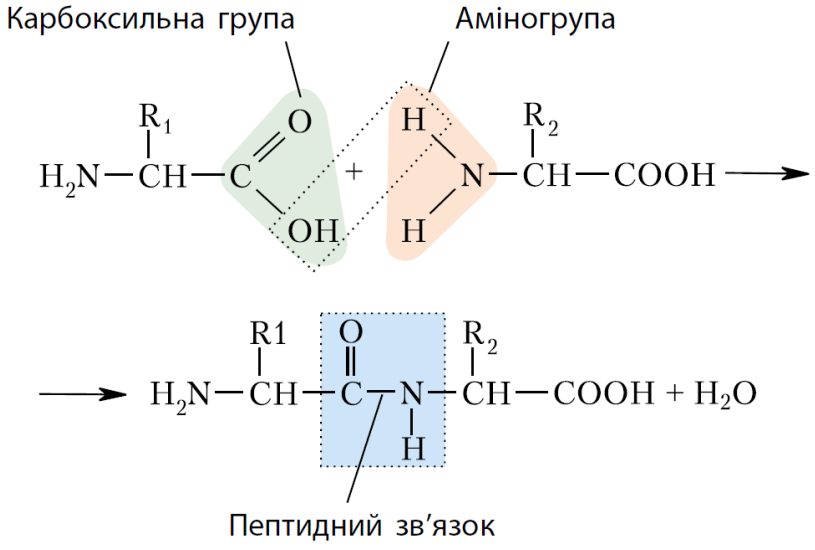



**Рис. 8. Реакція утворення дипептиду**

Білки відрізняються кількістю амінокислот і порядком чергування їх у поліпептидному ланцюгу.

***Рівні організації білкової молекули***

Білкова молекула має складну структуру.

**Первинна структура білка** представлена поліпептидним ланцюгом. У первинній структурі всі зв'язки між амінокислотами ковалентні, а отже, міцні. Первинною структурою білка називають кількість і послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу (рис. 9, *а*).

**Вторинна структура білка** — це спосіб упакування первинної структури в альфа-спіраль або бета-шар (рис. 9, *б, в*). Альфа-спіраль виникає в результаті утворення водневих зв'язків між групами —CO- та —NH, розташованими на різних витках спіралі (рис. 9, *б*).

Бета-шар утворюється в результаті формування водневих зв'язків між CO-групами одного поліпептидного ланцюга та NH-групами іншого поліпептидного ланцюга (рис. 9, *в*). Унаслідок цього велика кількість поліпептидних ланцюгів може розташовуватися поряд, формуючи бета-шар.

Наступний рівень упакування білкової молекули — третинний, характерний для білків, у яких вторинна структура представлена альфа-спіраллю (рис. 9, *г*). У білків, що мають бета-шар, третинна структура не виражена.

**Третинна структура білка** — це спосіб упакування альфа-спіралі у просторову глобулу. Третинна структура білка утворюється завдяки додатковим водневим зв'язкам, гідрофільно-гідрофобним взаємодіям та ковалентним дисульфідним зв'язкам —S—S—, які виникають між двома молекулами цистеїну.

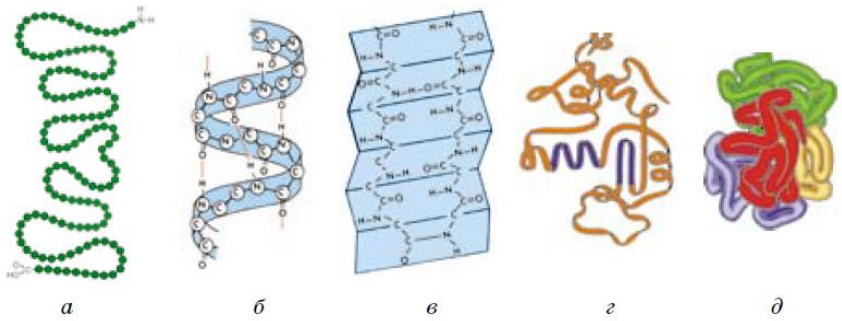



**Рис. 9. Рівні організації білкової молекули: первинна структура білка (а); вторинна структура: б – альфа-спіраль, в – бета-шар; третинна структура (г); четвертинна структура (д)**

Спосіб спільного упакування декількох поліпептидних ланцюгів називають **четвертинною структурою білка**. Наприклад, молекула гемоглобіну — білка, що міститься в еритроцитах,— складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, кожен з яких з'єднується із ферумовмісним гемом (гем — небілкова частина гемоглобіну).

У результаті їх об'єднання й утворюється молекула гемоглобіну, що здатна здійснювати транспортування газів.

Якщо поліпептидні ланцюги лежать у вигляді клубка, то такі білки називають **глобулярними**. Якщо поліпептидні ланцюги лежать у пучках ниток, вони мають назву **фібрилярних** білків (рис. 10).

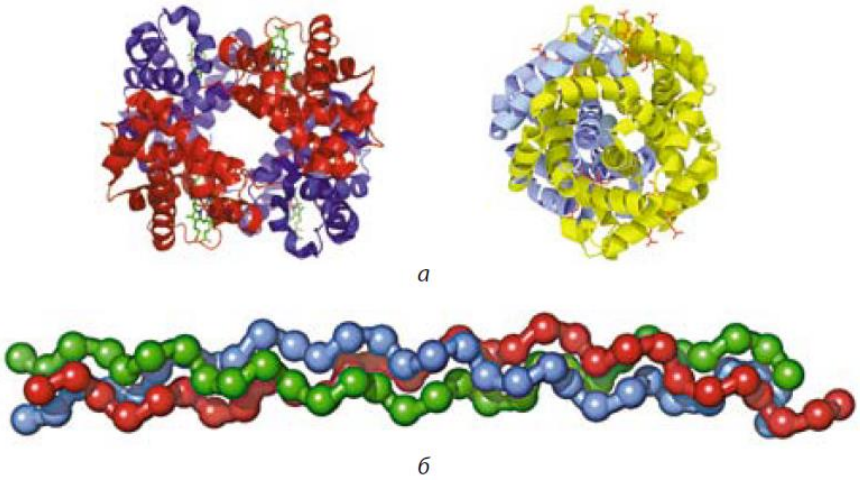



**Рис. 10. Глобулярні (а) і фібрилярні (б) білки**

***Денатурація та ренатурація білка***

Починаючи зі вторинної структури, просторова конформація макромолекул білка підтримується переважно слабкими хімічними зв'язками. Під впливом зовнішніх чинників, наприклад зміни температури, складу солей у середовищі, pH, радіації, зв'язки, що утримують макромолекулу, рвуться і структура білка та його властивості змінюються. Цей процес називається **денатурацією**.

**Денатурація** — це порушення природної структури білка. Якщо порушуються всі структури білка, включаючи первинну, така денатурація називається необоротною. Але бувають і процеси оборотної денатурації.

За умови збереження первинної структури білка після усунення чинника, що призвів до денатурації, багато білків здатні повернути свою природну форму. Такий процес називається **ренатурацією** (рис. 11).

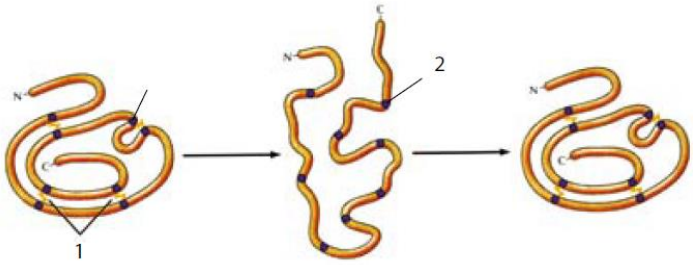



**Рис. 11. Схема ренатурації білка: 1 – S–S-звязки; 2 – цистеїн**

***Біологічні функції білків.*** Структура білків дозволяє їм виконувати різні біологічні функції.

**1. Ферментативна функція**. Хімічні реакції у клітині відбуваються за участю особливих біологічних каталізаторів — ферментів.

**Ферменти** — це глобулярні білки, здатні прискорювати хімічні реакції у клітині в десятки та сотні разів.

**2. Структурна функція**. Білки входять до складу всіх мембран, що оточують і пронизують клітину, й усіх органел.

**3. Транспортна функція.** У крові, зовнішніх клітинних мембранах, у цитоплазмі та ядрі клітин є різні транспортні білки. У крові є білки-транспортери, які розпізнають і зв’язують певні гормони й несуть їх до певних клітин. Такі клітини мають рецептори, що впізнають ці гормони. У зовнішніх клітинних мембранах теж є білки-транспортери, які забезпечують активне і чітко вибіркове транспортування всередину й назовні клітини різних речовин та йонів. Саме з білками пов’язане перенесення кисню та вуглекислого газу в тілі тварин і людини: його здійснює білок крові — гемоглобін.

**4. Рухова, скоротлива функція**. Усі види рухових реакцій клітини виконуються особливими скорочувальними білками, котрі зумовлюють скорочення м’язів, рух джгутиків та війок у найпростіших, переміщення хромосом під час поділу клітини, рух рослин.

**5. Захисна функція**. Багато білків утворюють захисний покрив, що захищає організм від шкідливих впливів, наприклад рогові утворення — волосся, нігті, копита, роги. Це механічний захист. У відповідь на проникнення до організму чужорідних агентів (антигенів) у клітинах крові виробляються речовини білкової природи (антитіла), котрі знешкоджують їх, захищаючи організм. Захисним білком є, наприклад, інтерферон.

**6. Енергетична функція**. Білки можуть бути джерелом енергії. Під час розпаду 1 г білка до кінцевих продуктів виділяється близько 17 кДж

енергії. Однак білки використовуються як джерело енергії зазвичай коли вичерпуються інші джерела, такі як вуглеводи та жири.

**7.** Білки можуть також виконувати **запасаючу функцію**, наприклад казеїн молока.

**8. Гормональна функція**. Білки можуть бути регуляторами фізіологічних процесів — гормонами. Багато гормонів є білками, наприклад гормон росту, адренокортикотропний гормон, тиреотропний гормон та інші гормони гіпофіза.

**9. Регуляторна функція**. Багато процесів регулюються білковими молекулами, які не служать ні джерелом енергії, ні будівельним матеріалом для клітини. Ці білки регулюють транскрипцію, трансляцію, активність інших білків. Регуляторну функцію білки здійснюють або за рахунок ферментативної активності, або за рахунок специфічного зв'язування з іншими молекулами.

**10. Сигнальна функція** — це здатність білків служити сигнальними речовинами, передаючи сигнали між тканинами, клітинами або організмами. Сигнальну функцію часто об'єднують з регуляторною, оскільки регуляторні білки теж можуть здійснювати передачу сигналів.

Відома велика група білкових факторів росту, що активують ферменти синтезу ДНК у клітинах і таким чином посилюють поділ клітин. Це важливо для відновлення тканин у випадку поранень, а також після операцій. Але надлишковий синтез факторів росту може спричиняти надто інтенсивний поділ клітин — їх злоякісний ріст, виникнення злоякісних пухлин. Блокувати надлишковий синтез деяких факторів росту або пригнітити їх дію означає пригнітити зростання злоякісної пухлини. На цьому шляху вчені шукають нові засоби для лікування раку.

***Опорні точки.*** Білки — це органічні сполуки, полімери, мономерами в яких є амінокислоти. Амінокислоти — це невеликі за розмірами органічні сполуки, у молекулі яких одночасно містяться карбоксильна й аміногрупа. У процесі біосинтезу білка до його складу включаються 20 амінокислот. Білки відрізняються кількістю амінокислот і порядком чергування їх у поліпептидному ланцюгу та мають первинну, вторинну, третинну і четвертинну структури.

Структура білків дозволяє їм виконувати різні біологічні функції: ферментативну, рухову, структурну, гормональну, регуляторну, енергетичну, захисну, транспортну, сигнальну.

**Завдання**

1. Які органічні сполуки називають вуглеводами?
2. Які є функціональні групи?
3. Чим альдози відрізняються від кетоз?
4. Що таке моносахариди, і які є найпоширеніші?
5. Що таке дисахариди, і які є найпоширеніші?
6. Що таке полісахариди, і які є найпоширеніші?
7. Які біологічні функції виконують моносахариди та полісахариди?
8. Що таке білки?
9. Що таке первинна структура білка?
10. Що таке вторинна структура білка?
11. Що таке третинна структура білка?
12. Що таке четвертинна структура білка?
13. У яких випадках денатурація може бути оборотною?
14. Які біологічні функції виконують білки?

# ТЕМА 16-17: МОЛЕКУЛЯРНІ ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ: НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ ДНК

***Мета:*** вивчити нуклеїнові кислоти ДНК, їх будову, властивості і функції.

## *Теоретична частина*

1. Спадковість всіх організмів пов'язана з функціями нуклеїнових кислот. У всіх досліджених організмів виявлено ДНК, і тільки до складу деяких вірусів замість неї входить РНК.

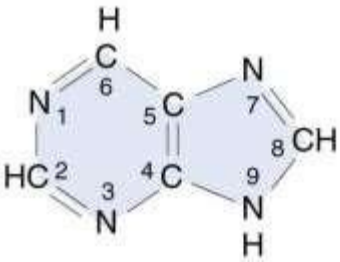
Молекула ДНК має вигляд нерозгалуженої нитки. При повному розпаді (гідролізі) її утворюються азотні основи, пентозний цукор – дезоксирибоза і фосфорна кислота.

Азотні основи входять до складу обох нуклеїнових кислот і є производними двох органічних азотовмісних гетероциклічних сполук:

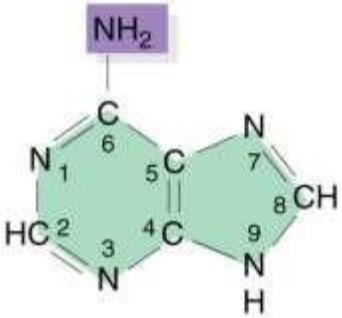
– пурину ($C_5H_4N_4$)
– піримідину ($C_4H_2N_4$)

Молекула пурину складається з двох кільців атомів, а молекула піримідину – з одного.

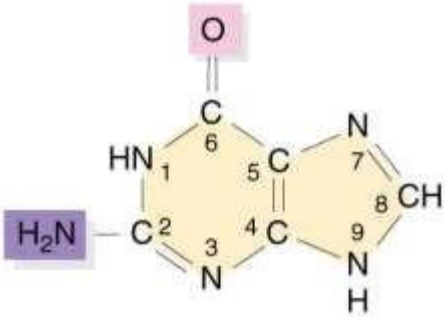
Азотні основи, що входять до складу ДНК представлені чотирма сполуками. Дві з них – аденін і гуанін – є похідні пурину, дві інших – цитозин і тимін – є похідні піримідину.



***Пурин***

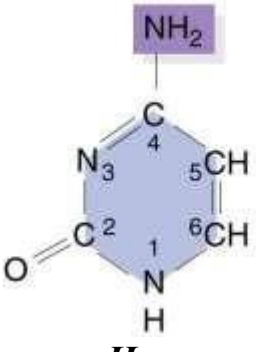


***Аденін (А)***

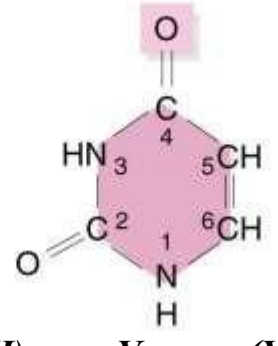


***Гуанін (Г)***

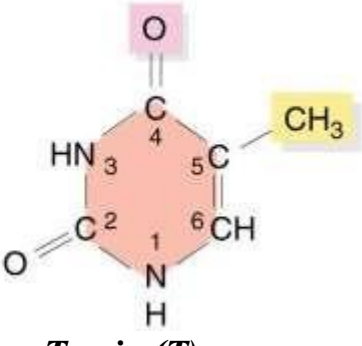
***Піримідин***



***Цитозин (Ц)***



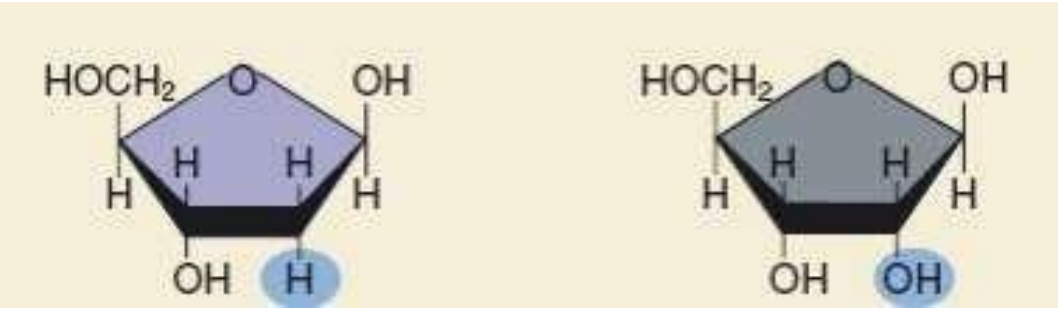
***Урацил (У)***



***Тимін (Т)***

При гідролізі молекули РНК виділяються ті ж три типи сполук: азотні основи, цукор і фосфорна кислота. Але замість тиміну присутній урацил, а замість цукру дезоксирибози – рибоза.

Урацил, як тимін і цитозин, похідний піримідину, а дезоксирибоза відрізняється від рибози відсутністю гідроксильної групи у другого атома вуглеводу:

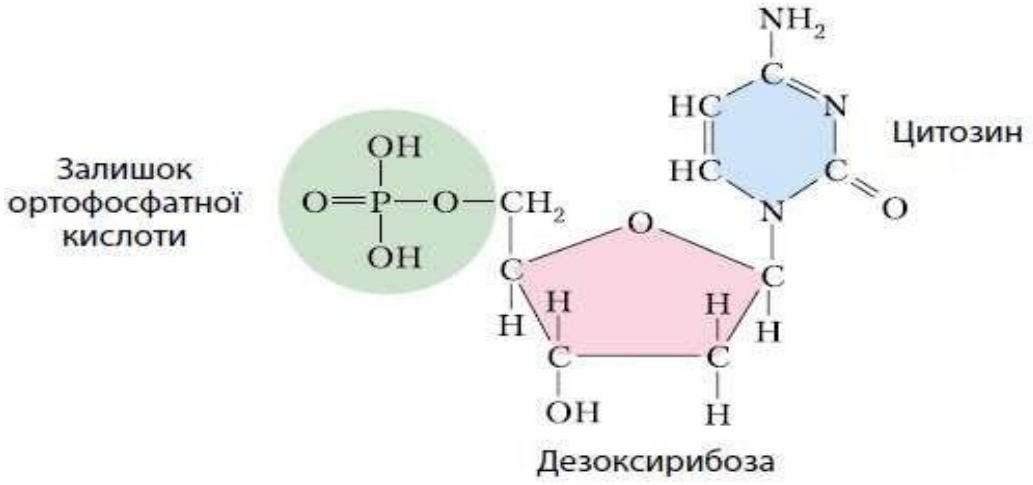


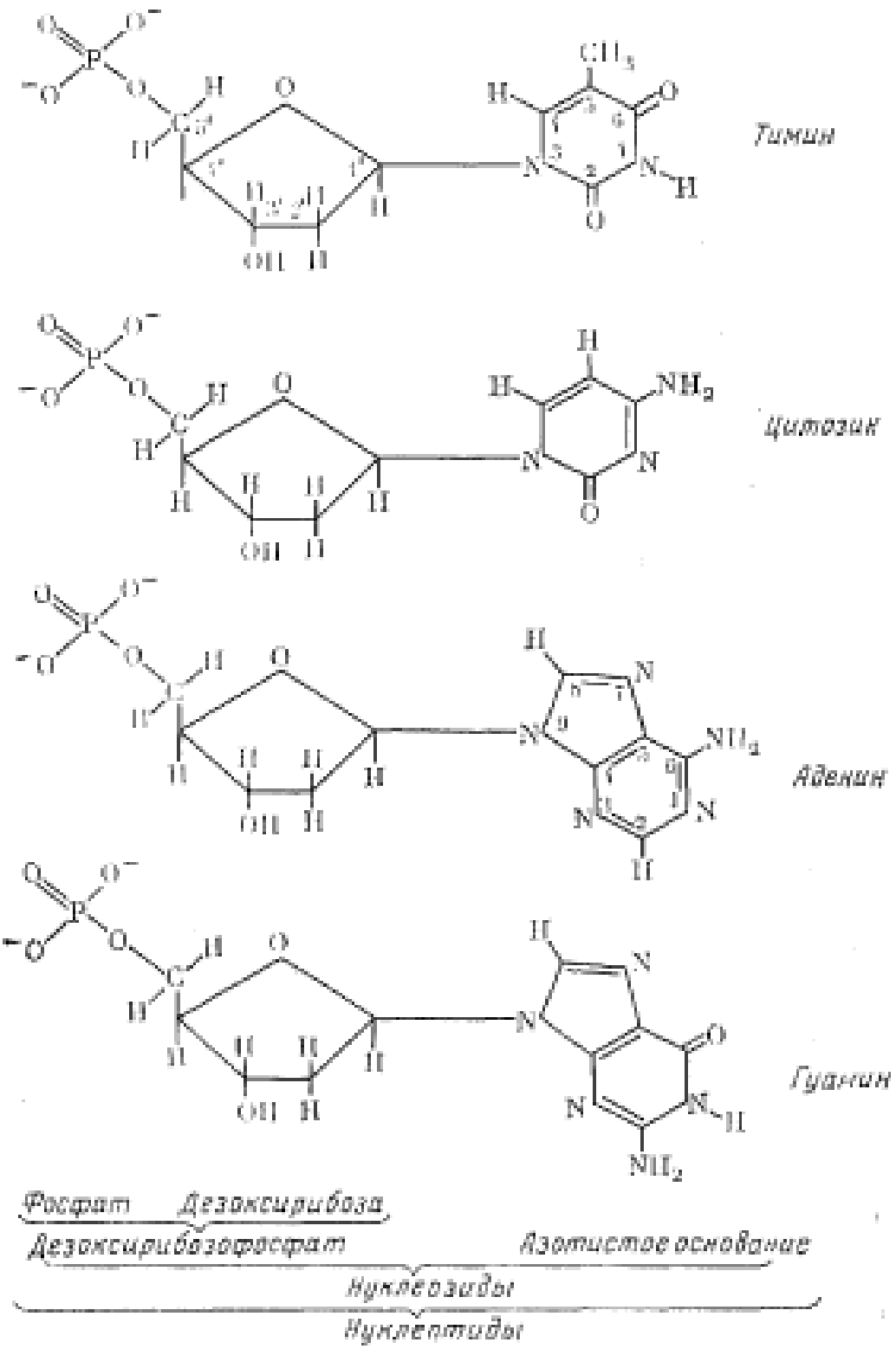

***Дезоксирибоза*** ***Рибоза***

Нуклеїнові кислоти – складні біологічні полімери. Вони складаються з простих сполук, що називаються нуклеотидами. Нуклеотиди є мономерами основним «будівельним матеріалом» нуклеїнових кислот. Кожний нуклеотид складається з трьох компонентів:

– молекули цукру (рибоза або дезоксирибоза),
– молекули азотної основи (пуринова або піримідинова),
– молекули фосфорної кислоти.

Цукор рибоза або дезоксирибоза з'єднуючись з азотною основою утворює нуклеозиди. З'єднання їх з рибозою дають рибонуклеозиди, а з дезоксирибозою – дезоксирибонуклеозиди. Наприклад, з'єднання рибози і аденіна дає нуклеозид аденозин, а дезоксирибози і цитозина – дезоксицитидин.






Нуклеозиди, приєднуючи до своєї гідроксильної групи фосфорну кислоту, утворюють фосфорні ефіри, які називаються нуклеотидами. Якщо фосфорна кислота з'єднується з рибонуклеозидами, утворюються рибонуклеотиди, а якщо з дезоксирибонуклеозидами – утворюються

дезоксирибонуклеотиди. Наприклад, в результаті з'єднання фосфорної кислоти з аденозином утворюється рибонуклеотид аденілова кислота, а з дезоксицитодином – дезоксирибонуклеотид дезоксицитидилова кислота.

Аналогічно утворюються всі нуклеотиди РНК і ДНК. Цукор в нуклеотидах з'єднується з основами глюкозидним зв'язком, а з фосфорною кислотою – ефірними зв'язками.

Нуклеотиди в молекулах ДНК і РНК з'єднуються між собою через фосфорну кислоту і утворюють довгі ланцюги. Нуклеотиди називаються за відповідно від складу азотних основ і скорочено позначаються відповідними початковими буквами цих основ (А, Т, Г, Ц, У).

**Нуклеотидний склад нуклеїнових кислот**

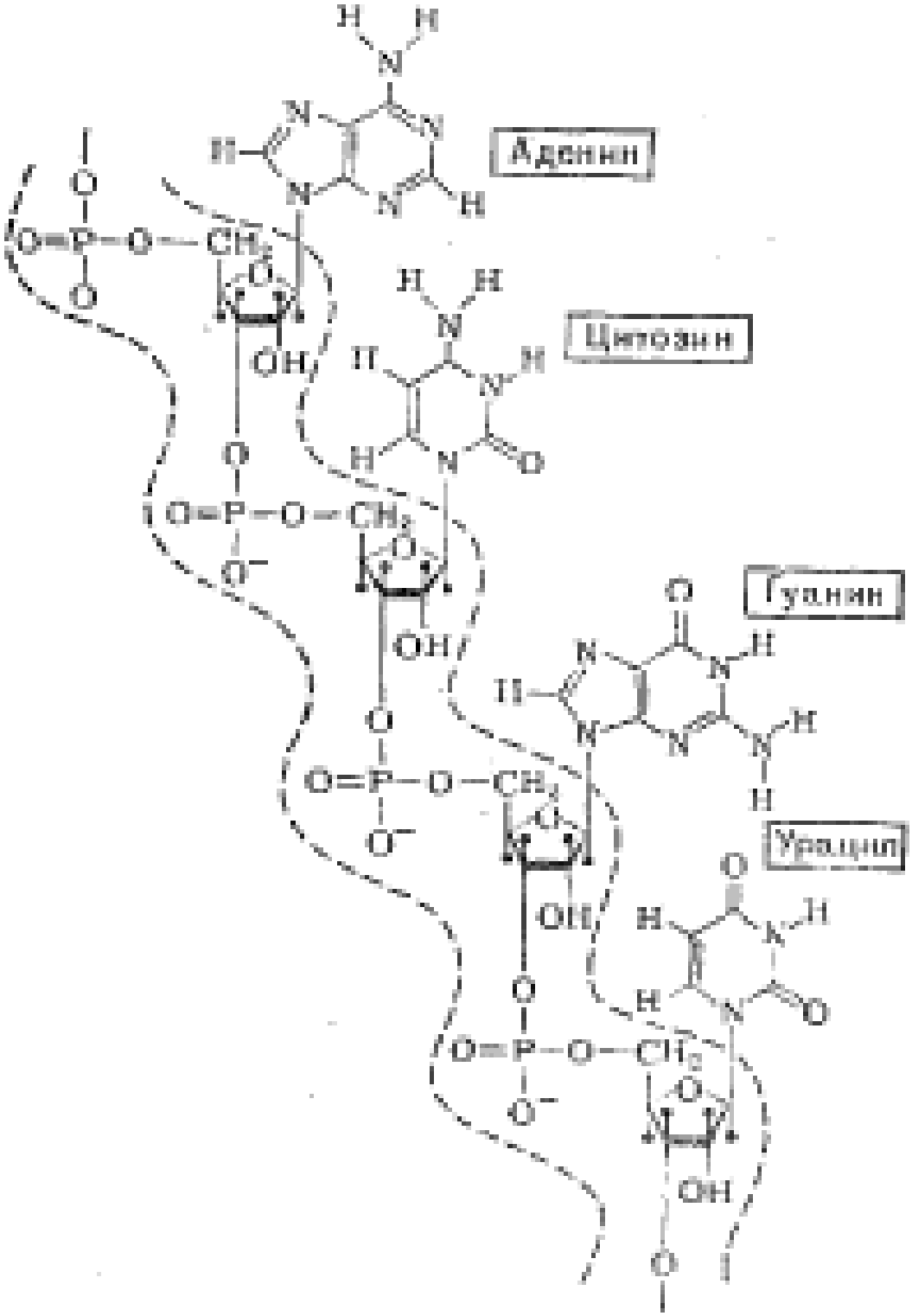
| Азотисті основи | Нуклеозиди | Нуклеотиди | | |
|---|---|---|---|---|
| | | повна назва | скорочена назва | |
| | | | російська | міжнародна |
| Аденін | Аденозин | Аденілова кислота (аденозинмонофосфат) | АМФ, або А | AMP, або A |
| Гунін | Гуанозин | Гуанілова кислота (гуанозинмонофосфат) | ГМФ, або Г | GMP, або G |
| Цитозин | Цитидин | Цитидинова кислота (цитидинмонофосфат) | ЦМФ, або Ц | CMP, або C |
| Тимін | Тимідин | Тимідинова кислота (тимідинмонофосфат) | ТМФ, або Т | TMP, або T |
| Урацил | Уридин | Уридилова кислота (уридинмонофосфат) | УМФ, або У | UMP, або U |

Молекула РНК складається з одного довгого нерозгалуженого ланцюга, ДНК – з двох полінуклеотидних ланцюгів.

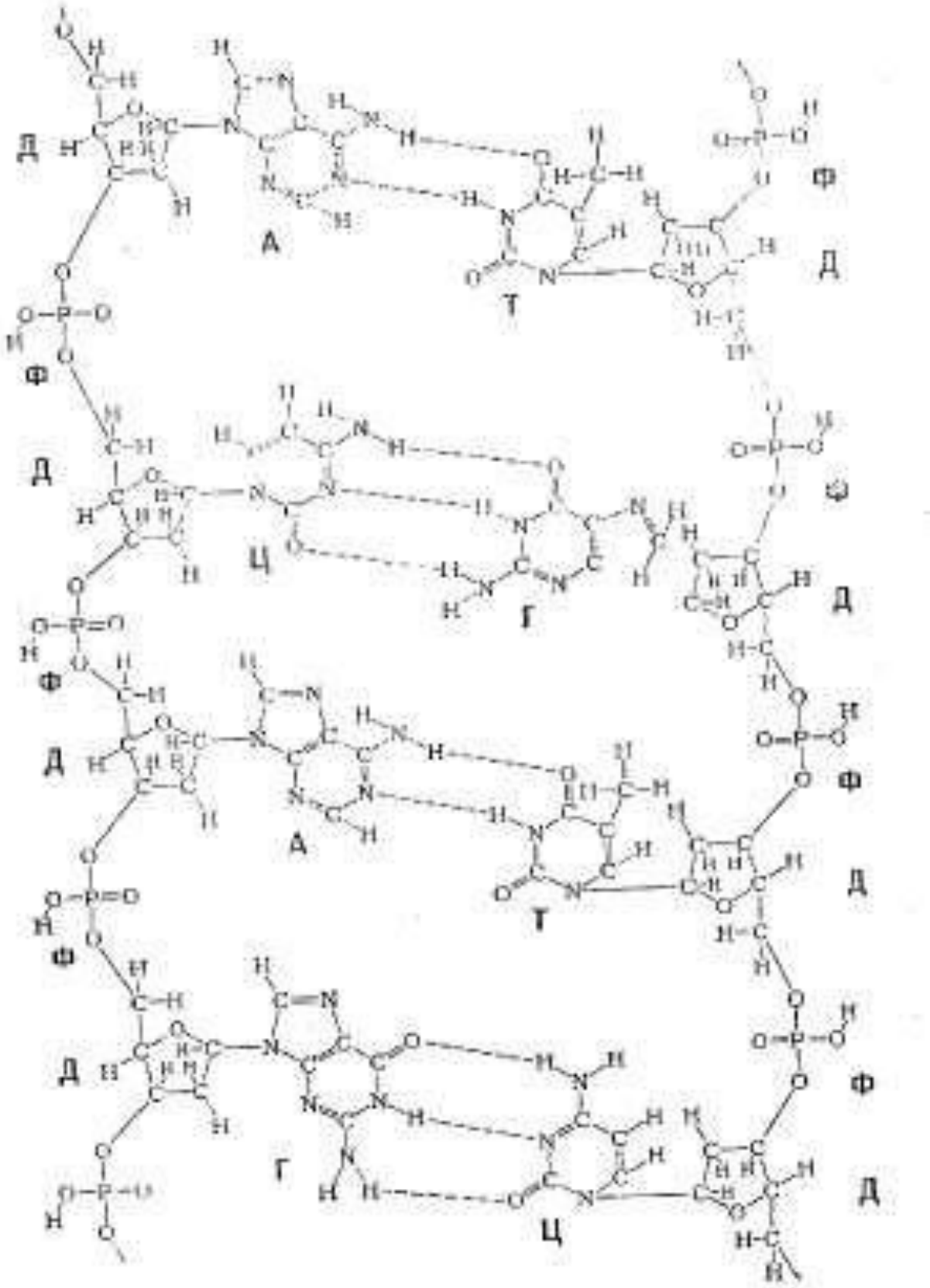
Молекули ДНК у різних рослин складаються з одних і тих же нуклеотидів, але сильно відрізняються між собою за їх кількістю і чергуванню в молекулі.

Склад молекули ДНК довго залишався нез'ясованим. Тільки в результаті узагальнення великої кількості фактів, отриманих у фізичних і хімічних експериментах, структура ДНК була розгадана.

Важливе значення мало відкрите Е. Чаргаффом правило спарування великих пуринових і малих піримідинових основ. Цими даними блискуче скористались американський біохімік Дж. Уотсон і англійський фізик Ф. Крік.




**Структура рибонуклеїнової кислоти**




**Ділянка подвійного ланцюга ДНК**

В 1953 р. вони на основі співставлення даних рентгеноструктурного і

біохімічного аналізів та математичних розрахунків запропонував свою модель макромолекулярної структури ДНК. Вона отримала назву моделі Уотсона-Кріка. Згідно цієї моделі молекула ДНК складається з двох дуже тоненьких довгих ланцюгів, закручених правильними витками навколо однієї загальної для них осі в подвійну спіраль. Кожний з двох ланцюгів являє собою полінуклеотид, тобто полімер, в якому залишки цукру двох сусідніх нуклеотидів зв'язаних фосфатними групами. Між собою такі полінуклеотидні ланцюги сполучені азотними основами. При цьому пуринові основи, що складаються з двох кілець, зв'язані слабкими водневими зв'язками з піримідиновими основами, що складаються з одного кільця. Цими ж зв'язками утримуються разом два ланцюга всієї молекули.

Аденін завжди зв'язаний з тиміном, а гуанін з цитозином. Ці пари азотних основ, відповідно, додаткові (комплементарні) по відношенню один до одного. Додаткові і обидва ланцюги молекул ДНК. Схематично молекула ДНК може бути відображена у вигляді кручених сходів, ступені якої – це пари азотних основ, а бокові сторони – молекули дезоксирибози і фосфорної кислоти.

Відстань між нуклеотидами 0,00034 мкм, діаметр подвійної спіралі дорівнює 0,002 мкм.

Один повний оборот спіралі включає 10 нуклеотидів і займає відстань 0,0034 мкм.

Одна з важливих властивостей ДНК – здатність її до самоподвоєння (реплікації).

Механізм реплікації молекул ДНК експериментально був доказаний у 1958 р. американським генетиком А. Корнбергом. В його лабораторії вдалось розробити спосіб виділення з бактеріальних екстрактів в чистому вигляді ферменту, здатного синтезувати ДНК поза організмом (ін вітро). Цей фермент отримав назву ДНК-полімерази. Субстратом для нього була суміш, що складалась з чотирьох дезоксирибонуклеотидів, що входять до складу молекули ДНК. Один з дезоксирибонуклеотидів – аденозинтрифосфат (АТФ) – являвся одночасно і джерелом енергії, необхідної для будь-якого синтезу.

За участі ДНК-полімерази з чотирьох дезоксирибонуклеотидів утворилась високомолекулярна сполука, що має всі властивості і будову природної ДНК. Проте синтез ДНК відбувався тільки у випадку, якщо суміш містила в достатній кількості всі чотири дезоксирибонуклеотиду

і в неї добавлялась так звана «приманка». Такою «приманкою» для ДНК-полімерази являлась невелика кількість ДНК, взята з будь-якого організму. Без «приманки» штучна ДНК- синтезуюча система не працювала. ДНК-полімераза і «приманка» могли бути неродинного походження: для ДНК-полімерази з Escherichiia coli «затравку» можна брати з дріжджів.

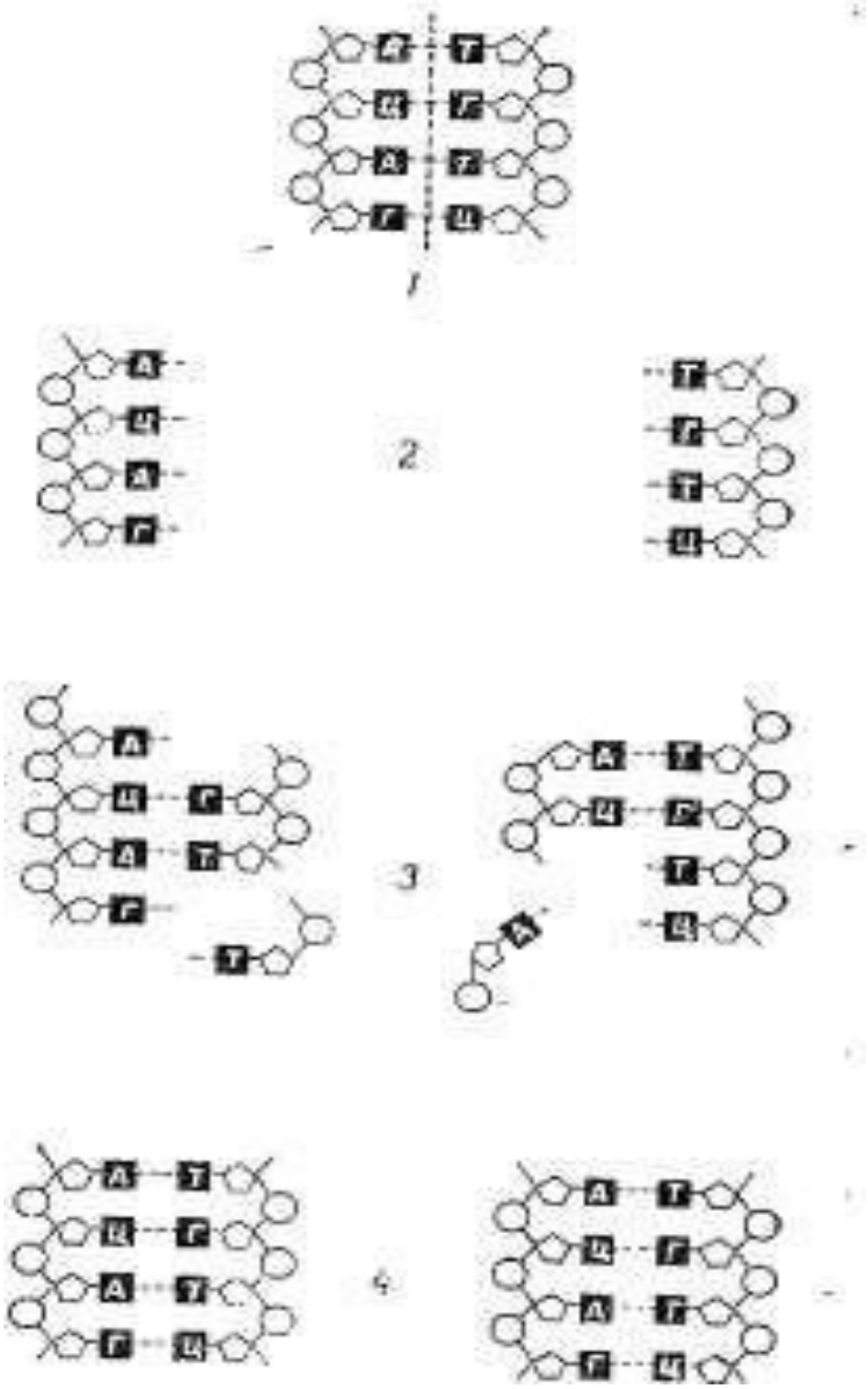



**Схема самоподвоєння (реплікації) молекул ДНК**

Одним із самих важливих результатів досліду був доказ того, що співвідношення основ у синтезованій ДНК не залежить від співвідношення чотирьох дезоксирибонуклеотидів, що входили в склад суміші. Воно визначалось відношенням А+Т / Г+Ц, яку мала використана ДНК-«приманка».

Більш тонкий біохімічний аналіз, проведений Корнбергом, показав, що існує не тільки кількісна подібність у співвідношенні чотирьох основ в синтезованій ДНК і ДНК-«приманки», але і велика подібність в послідовності складових їх нуклеотидів. З цього випливав висновок про те, що приманочна ДНК є матрицею, що визначає таку ж послідовність нуклеотидів в синтезованій ДНК, як в її молекулі. Відповідно, в основі матричної функції ДНК лежить компліментарність основ.

Так як ланцюги молекули ДНК комплементарні по відношенню один до одного і розміщення нуклеотидів на одній з них точно визначає структуру іншої, вдалось пояснити механізм самоподвоєння.

В загальних рисах він призводить до наступного: подвійна спіраль молекули ДНК при участі деяких ферментів починає розкручуватись, водневі зв’язки між парами основ рвуться, і ланцюги роз’єднуються. Кожна з них приєднує вільні нуклеотиди, що присутні в розчині і будує таким чином додатковий собі новий ланцюг, подібний до того, з яким він був сполучений раніше. Так з одної молекули ДНК по типу матричного відбитка утворюються дві однакові з нею нові молекули.

Властивість самоподвоєння, або самокопіювання, молекул ДНК – унікальне. Ним не обладають ніякі інші молекули хімічних речовин. Відкриття цієї властивості ДНК мало важливе значення для пояснення на молекулярному рівні явищ спадковості, зв’язаних з утворенням в процесі розмноження тотожних клітин.

ДНК бере участь у синтезі всіх білків, вона визначає їх будову і функції. Але цілий ряд даних вказує на те, що сама ДНК безпосередньо не може бути матрицею в синтезі білків. У всіх клітинах, крім бактеріальних, майже вся ДНК знаходиться в хромосомах клітинного ядра, але в той же час добре відомо, що синтез білка відбувається основним чином в цитоплазмі, де ДНК міститься в мізерно малих кількостях. Отже, вже сам факт просторового розділення ДНК, що знаходиться в ядрі, і білків, що синтезуються в цитоплазмі, вказує на існування якоїсь проміжної матриці,

що переносить генетичну інформацію з ядра в цитоплазму – до місця синтезу білків.

ДНК (транскрипція) РНК (трансляція)
(реплікація) ⟶ ⟶ білок

Реплікація – процес самоподвоєння ДНК, в якому роль матриці відіграє сама молекула ДНК. Вигнута стрілка пояснює, що при реплікації молекули ДНК розмножуються шляхом самокопіювання.

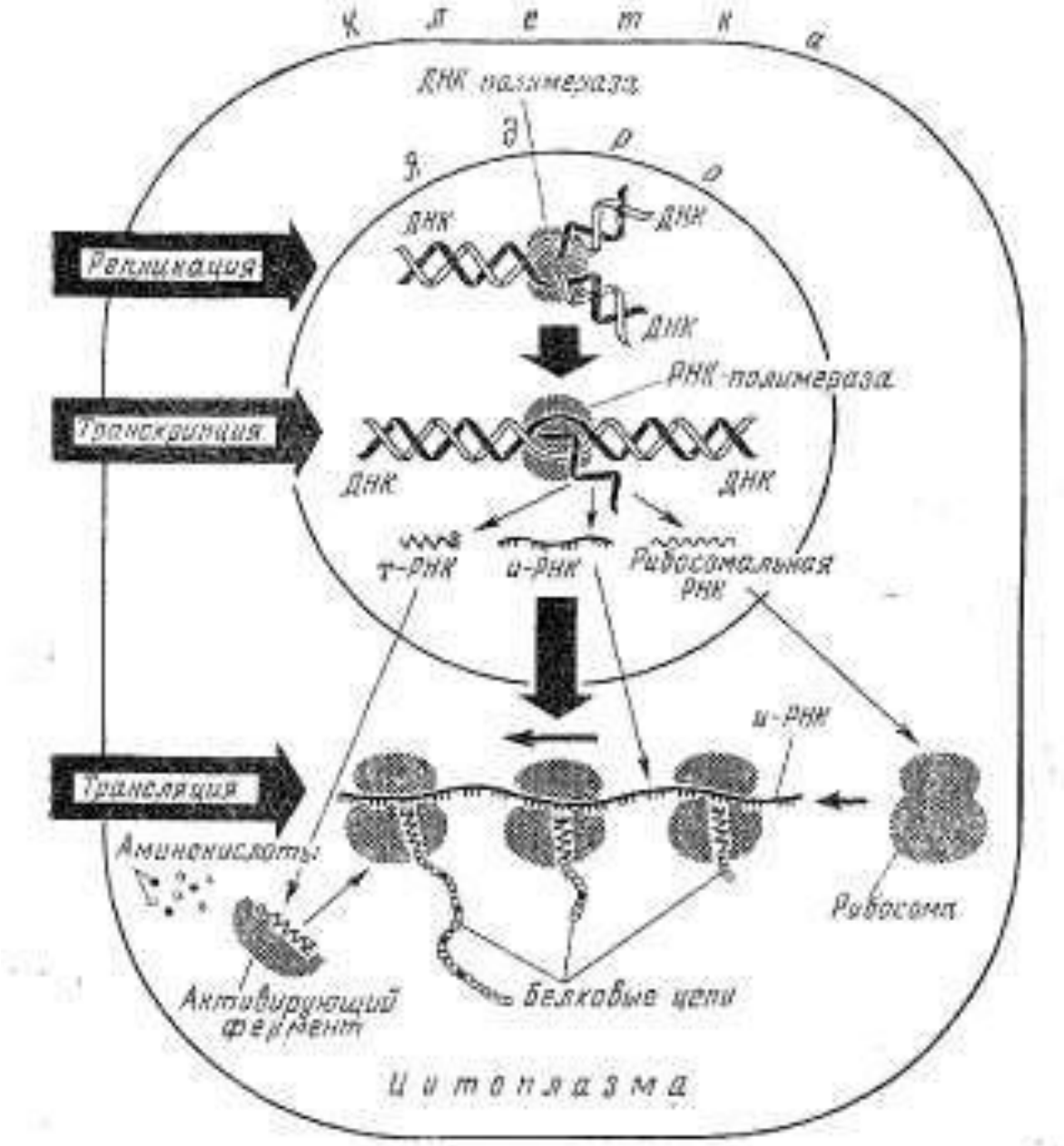


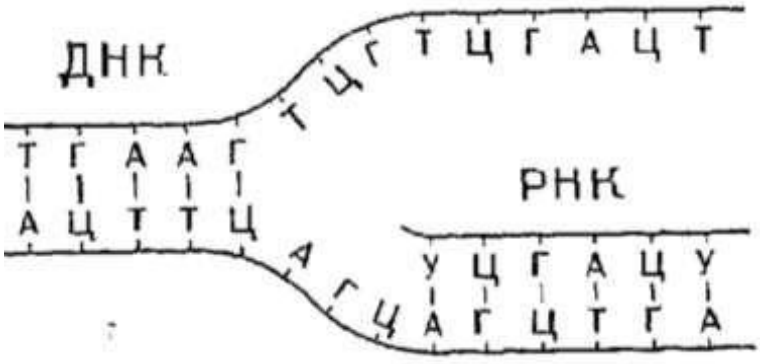

**Схема реплікації, транскрипції і трансляції генетичного матеріалу в клітині**

Транскрипція – перенесення (переписування) інформації про нуклеотидну будову ДНК на РНК. Стрілка показує, що РНК утворюється на ДНК-матрицях.

Трансляція – процес, в якому матрицею для біосинтезу білка служить РНК. Вона визначає послідовність амінокислот у всіх білках. Стрілка вказує, що відбувається зчитування (трансляція) або переклад інформації про нуклеотидну будову РНК на амінокислотну будову білка.

Отже, ДНК, входячи до складу ядра клітини, завдяки властивості самоподвоєння молекул зберігає своє кількісне постоянство при діленні клітин, визначає структуру і регулює синтез утворених в клітині білків. Але молекули ДНК не являють безпосередньо матрицями в самому процесі синтезу білка. Спочатку відбувається перенесення генетичної інформації про нуклеотидну будову ДНК на РНК. Потім остання сама стає матрицею і у відповідності з інформацією, отриманою від ДНК, визначає послідовність з'єднання амінокислот у білковій молекулі.

Тепер, коли нам у загальних рисах відома панівна в молекулярній генетиці теорія спадковості, розглянемо, як відбувається транскрипція генетичної інформації. Вона відбувається шляхом синтезу інформаційної РНК (і-РНК) на ДНК-матриці. Назву інформаційної ця РНК отримала за те, що вона, проникаючи через пори ядерної оболонки, несе в цитоплазму (до місця синтезу білка) інформацію про порядок чергування нуклеотидів в молекулі ДНК. Будується молекула і-РНК на одній із ланцюгів молекули ДНК-матриці під час її роздвоєння за участі спеціального ферменту РНК-полімерази.




**Формування молекули і-РНК на ДНК матриці**

Парування нуклеотидів відбувається за принципом компліментарності: послідовність нуклеотидів в молекулі і-РНК визначається їх послідовністю в ланцюгу ДНК, при цьому гуанілова кислота з'єднується з цитоділовою, тимідилова – з аденіловою, а аденілова

кислота ДНК не з тимідиловою, як це буває при реплікації ДНК, а з уридиловою кислотою. Одна молекула і-РНК, як правило, несе інформацію про будову одного поліпептидного ланцюга.

Як тільки закінчується будова на ДНК-матриці ланцюга і-РНК, вона відразу ж переходить в цитоплазму і прикріплюється там до однієї з рибосом. Слідом за цим починається синтез білка. Але насамперед необхідно познайомитися з генетичним кодом.

**Завдання**

1. Яка номенклатура азотистих основ, нуклеозидів і нуклеотидів?
2. Зробити рисунки складових компонентів нуклеїнових кислот: піримідинових і пуринових основ; моносахаридів (пентозних цукрів).
3. Зробити рисунки нуклеотидів – АМФ, ГМФ, ЦМФ, ТМФ, УМФ.
4. Описати схему реплікації, транскрипції і трансляції генетичного матеріалу в клітині.
5. Показати схематично реплікацію молекул ДНК.
6. Показати схематично формування молекули іРНК на ДНК-матриці.
7. Розв’язати наступні задачі:

1) Один з ланцюгів молекули ДНК має такий вигляд: ГЦГ ГГТ ГГА ТАА ЦТА ГЦЦ. Який вигляд буде мати інший ланцюг цієї молекули ДНК, синтезований під час самоподвоєння?

2) Молекула іРНК складається з наступної послідовності нуклеотидів: УУЦ ГАА ЦГА УУГ УЦГ ЦЦГ ГАУ. Яка будова молекули ДНК, на одному з ланцюгів якого була синтезована ця молекула іРНК?

3) Скільки амінокислот кодує молекула іРНК, якщо вона синтезована на ділянці молекули ДНК, що складається з таких нуклеотидів: ААГ ТЦА ГЦА ЦТЦ ЦАА АТТ?

4) Виявлено, що 24% загальної кількості нуклеотидів даної молекули іРНК припадає на гуанін (Г), 38% – на урацил (У), 22% – на цитозин (Ц) і 16% – на аденін (А). Визначити відсотковий вміст азотних основ молекули ДНК, на одному з ланцюгів якого була синтезована ця молекула іРНК.

5) Дано ряд нуклеотидів: А (аденін), Т (тимін), У (урацил), Ц (цитозин), Г (гуанін). Визначте, які входять до складу ДНК , які до складу РНК.

6) На фрагменті одного ланцюга ДНК нуклеотиди розташовані в

послідовності: А - А - Г - Т - Ц - Т - А - Ц - Г - А - Т - Г. Запишіть схему структури дволанцюгової молекули ДНК; поясніть, якою властивістю ДНК при цьому ви керувалися; яка довжина даного фрагмента ДНК. *Примітка*. Кожен нуклеотид займає 0,34 нм за довжиною ланцюга ДНК.

7)На фрагменті одного ланцюга ДНК нуклеотиди розташовані в такій послідовності: А - А - Г - Т - Ц - Т - А - Ц - Г - Т - А - Г. Визначте схему структури дволанцюгової молекули ДНК, підрахуйте відсотковий склад нуклеотидів в цьому фрагменті.

8)Довжина фрагмента молекули ДНК дорівнює 20,4 нм. Скільки нуклеотидів в цьому фрагменті?

9)Часткова і-РНК гена має наступний склад: УУУ - ГУУ - ГАУ - ЦАА - ЦАЦ - УУА - УГУ - ГГГ - УЦА - ЦАЦ. Визначте співвідношення (А + Т) : (Г + Ц) у фрагменті названого гена.

10) Ділянка гена має таку послідовність нуклеотидів: ТТТ - ТАЦ - АЦА - ТГТ - ЦАГ. Визначте послідовність нуклеотидів і-РНК і послідовність амінокислот у білковій молекулі, яка синтезується під контролем цього гена.

# ТЕМА 18-19: ОСНОВИ ГЕННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

***Мета:*** вивчити основи генної інженерії.

## *Теоретична частина*

**Вектор** – це специфічна відносно клітини-хазяїна і здатна до реплікації структура, яка може приєднувати до себе ті або інші гени і переносити їх в інші клітини; це нуклеотидна послідовність, спроможна включатися в ДНК (не порушуючи її цілісності). Векторами називаються модифіковані плазмідні, бактеріофагові, вірусні, дріжджові або бактеріальні ДНК чи РНК, що забезпечують проникнення екзогенної ДНК в клітини хазяїна. Назва «вектор» у генетичній інженерії застосовується до молекули ДНК, отриманої з плазміди або бактеріофага, в яку можуть бути вставлені фрагменти чужорідної ДНК. Вектори мають відповідати таким вимогам:

– містити один або декілька унікальних сайтів рестрикції для вбудовування чужорідної ДНК;

– автономно реплікуватися;

– мати маркери, за якими легко виявляють трансформовані клітини (наприклад, стійкість до антибіотика);

– введення чужорідного гена не повинно порушувати функцій вектора;

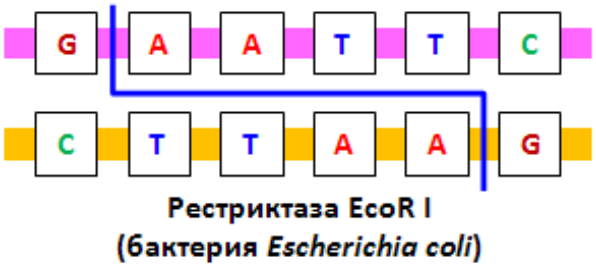
– бути невеликими за розмірами.

**Реплікон** – молекула або ділянка ДНК або РНК, що реп лікується з однієї точки початку реплікації. У більшості прокаріотичних хромосом репліконом є ціла хромосома.

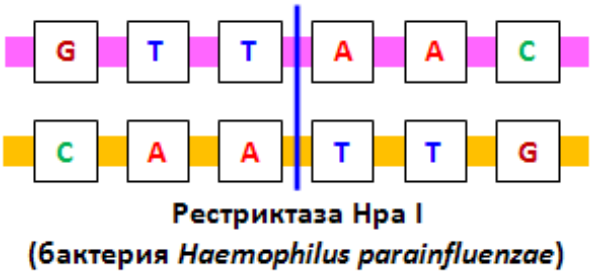
**Сайт рестрикції** (ділянка впізнавання) – коротка послідовність нуклеотидів в молекулі ДНК, яка розпізнається ферментом ендонуклеазою рестрикції-модифікації

(рестриктазою). Рестріктаза зв'язується з молекулою ДНК в точці розташування сайту рестрикції і перерізає ланцюжок нуклеотидів усередині сайту або в безпосередній близькості від нього.

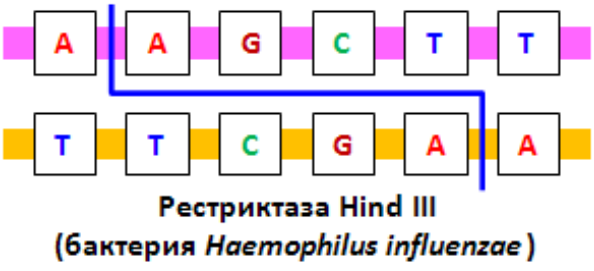
Ферменти рестрикції вироблені бактеріями в процесі еволюції з метою руйнування чужорідної ДНК, здатної проникнути всередину клітини і викликати її трансформацію. Розмір сайту рестрикції різних рестриктаз становить, як правило, 4–6 нуклеотидів. Сайти рестрикції в ДНК самої бактерії замасковані за допомогою метилювання залишків А і С. Наприклад, фермент рестрикції EcoRI розпізнає симетричну послідовність GAATTC і перерізає ланцюжок між нуклеотидами G і A, залишаючи на кінцях перекриваючі ділянки AATT.



**Рестриктаза EcoR I**
**(бактерия *Escherichia coli*)**



**Рестриктаза Hpa I**
**(бактерия *Haemophilus parainfluenzae*)**



**Рестриктаза Hind III**
**(бактерия *Haemophilus influenzae*)**

**Промотор** – специфічна ділянка ДНК, яка виконує регуляторну функцію в результаті приєднання РНК-полімерази, що ініціює транскрипцію РНК.

**Термінатор** – послідовність нуклеотидів ДНК, що пізнається РНК-полімеразою, як сигнал до припинення синтезу молекули РНК і дисоціації транскрипційного комплексу. Часто ці послідовності закінчуються ланцюжком тимінових нуклеотидів (у транскриптів – уридінових), якій передує ділянка, що містить внутрішні, взаємно комплементарні послідовності в протилежних орієнтаціях («шпилькові» структури). Область «шпильки» збагачена GC парами , що додають цій структурі велику стійкість.

**ДНК-полімераза** – фермент, що бере участь у реплікації ДНК. Ферменти цього класу каталізують полімеризацію дезоксирибонуклеотідів уздовж ланцюжка нуклеотидів ДНК, яку фермент «читає» і використовує як шаблон. Тип нового нуклеотиду визначається за принципом комплементарності з шаблоном, з якого ведеться зчитування.

Як відомо, два ланцюги молекули ДНК антипаралельні. Різні кінці

одного ланцюга називаються 3'-кінець і 5'-кінець.

*3'-кінець* – кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою третьому вуглецевому атомі рибози або дезоксирибози.

*5'-кінець* – кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою п'ятого атома рибози або дезоксирибози; з 5'-кінця починається синтез полінуклеотид них ланцюгів у процесах реплікації, транскрипції репарації.

**Плазміда** – невелика кільцева дволанцюгова молекула ДНК, здатна до стабільного, не зв'язаного з хромосомами, існування і автономної реплікації (позахромосомний генетичний елемент (переважно у бактерій)). Плазміди в природі частіше за все зустрічаються у бактерій.

*Передача плазмід*. Плазміда може потрапити в клітину кількома шляхами. Багато плазмід можуть передаватися при кон'югації бактерій, тобто при їх безпосередньому контакті; плазміди також зазвичай успадковуються при звичайному розподілі клітин. Можлива також передача плазмід при трансдукції (тобто разом з фагом) і при трансформації (плазміда захоплюється клітиною зовні).

**Вектори прокаріот**

*Кон'югативні плазміди.* Найбільш відомою кон'югативою плазмідою є F-плазміда E. coli. Кон'югативні плазміди відомі, як у грампозитивних, так і у грамнегативних бактерій. (Кон'югація – процес розмноження у бактерій, при якому здійснюється перенесення ДНК від донорської ($F^+$-

бактерії) клітини у реципієнтну ($F^-$-бактерію)).

*Функції пзамід.* Багато плазмід не викликають помітних змін у фенотипі своїх господарів. Інші, навпаки, відповідальні за прояв у клітині-господаря властивостей, які допомагають їй вижити в певних умовах навколишнього середовища, і без цих плазмід бактерії гинули б або їх зростання уповільнювалось би .

Функції плазмід у клітині надзвичайно різноманітні. До них відносять:

– перенесення генетичного матеріалу при кон'югації – F-плазміда;

– плазміди бактеріоциногенності контролюють синтез білків, летальних для інших бактерій – Col-плазміди ;

– синтез гемолізинів – Hly-плазміди (є кон'югативними);

– стійкість до важких металів;

– стійкість до антибіотиків (R-плазміди);

– синтез ентеротоксинів – Ent-плазміди;

– стійкість до УФ-випромінювання;

– синтез антигенів, що забезпечують адгезію бактерій на клітинах в організмі людини і тварин – плазміди антигенів колонізації;

– система рестрикції – модифікації;

– розщеплення камфори (плазміда CAM), ксилолу (плазміда XYL), саліцилату (плазміда SAL) (виявлені у деяких штамів Pseudomonas).

У таблиці наведено приклади окремих природних плазмід і функцій, що ними виконуються:

| **Плазміда** | **Господар** | **Розмір плазміди (тис. пар основ)** | **Відома функція** |
|---|---|---|---|
| pT181 | *Staphylococcus aureus* | 4,4 | Стійкість до тетрацикліну |
| ColEl | *Escherichia coli* | 6,6 | Утворення коліцину і стійкість до нього |
| pMBl | *Escherichia coli* | 8,5 | Система рестрикції-модифікації |
| pGKL2 | *Kluyveromyces lactisb* | 13,5 | Плазміда-вбивця |
| pAMpi | *Enterococcus faecalis* | 26,0 | Стійкість до еритроміцину |
| pSK41 | *Staphylococcus aureus* | 46,4 | Множинна стійкість |
| pBM4000 | *Bacillus megaterium* | 53,0 | Оперон рРНК |
| pI258 | *Staphylococcus aureus* | 28,0 | Стійкість до іонів тяжких металів |
| pSLT | *Salmonella enterica ssp. typhimurium* | 93,9 | Детермінанта вірулентності |
| pMT1 | *Yersinia pestis* | 101,0 | Детермінанта вірулентності |
| pADP-1 | *Pseudomonas sp.* | 108,8 | Катаболізм атразину (гербіцид) |
| pWW0 | *Pseudomonas putida* | 117,0 | Деградація ароматичних вуглеводів |
| pX01 | *Bacillus anthracis* | 181,7 | Синтез ентеротоксинів |
| pSOL1 | *Clostridium acetobutylicum* | 192,0 | Утворення сольвенту |
| pSymB | *Sinorhizobium meliloti* | 1683,3 | Множинні функції |

Найбільш поширеними є F-плазміда, Col- і R-плазміда.

F-плазміди – плазміди фертильності, які містять tra-гени, що здатні до бактеріальної кон'югації. У неї є власна точка початку реплікації – oriV і точка розриву – oriT.

R-плазміди – плазміди опору, які містять гени, що можуть надати клітині стійкість проти антибіотику або отрути.

Col-плазміди – плазміди, які містять гени для виробництва коліцина, білка, який може вбивати інші бактерії.

Деградаційні плазміди – плазміди, які допомогають травленню різних речовин, наприклад, толуолу або саліцилової кислоти.

Плазміди отруйності – плазміди, які перетворюють бактерію на патоген.

**Реплікатор** – ділянка ДНК, з якої розпочинається процес її реплікації.

**Резистентність** (від лат. *resistentia* – «опірність», «здатність чинити опір чому-небудь») – стійкість організму, здатність чинити опір, несприйнятливість до будь-яких факторів зовнішнього впливу.

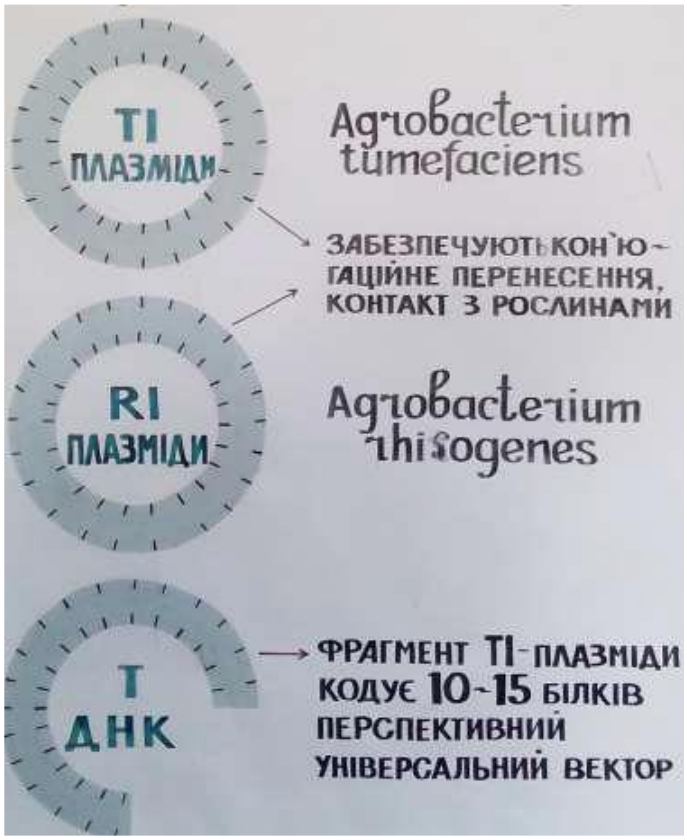
**Фаг λ (бактеріофаг λ, коліфаг λ)** – помірний бактеріофаг кишкової палички (*Escherichia coli*). Бактеріофаг фаг λ здатний до спеціалізованої трансдукції – перенесення генів однієї клітини живителя до іншої. Ця його властивість дозволила використати фаг λ з метою конструювання одних із перших векторних молекул для клонування генів. Їх вдосконалені версії використовуються генетиками і молекулярними біологами і досі.

**Сайт ділянка** – нуклеотидна або амінокислотна послідовність у нуклеїновій кислоті чи білку.

**Фазмі́ди** – одноланцюгові кільцеві ДНК плазміди. Вони здатні вмонтовуватись у геном бактерії-господаря, реплікуватися разом з ним, захоплювати його окремі гени і запаковуватись у капсид бактеріофагів, з якими передаються до інших бактерій. Фазміди часто називають ще *фагемідами* – клонувальним вектором, використовуючи у генній інженерії для переносу генів.

**Косміди** – плазміди, що містять фрагмент ДНК фага лямбда включно із *cos*-ділянкою, що є місцем замикання лінійної структури і перетворення її в кільцеву. Косміди вперше сконсутруювали Коллінс та Брюнінг у 1978 році. Їхня назва походить від скорочення двох термінів: **cos**-ділянка (сам термін у свою чергу походить від англ. ***co**hesive end**s*** – липкі кінці) та плаз**міда**.

**pBR322** – плазміда, що використовується в бактеріях E. coli як вектор клонування. Створена в 1977 році мексиканськими біологами Франціско Боліваром і Раймондом Родрігесом. pBR322 містить 4361 нуклеотидну пару і складається з ділянки реплікації *ori*; гена *amp*, що кодує білок стійкий до ампіциліну і гена *tet*, що забезпечує стійкість до тетрацикліну. Плазміда містить унікальні сайти рестрикції для більш ніж 40 рестриктаз.




***Вектори еукаріот***

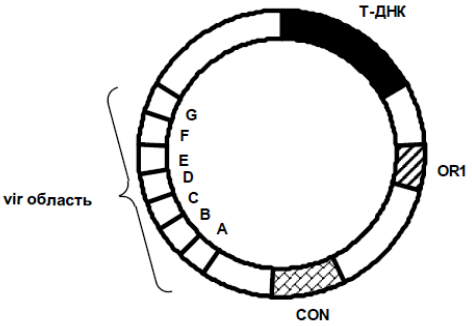
**Ті-плазміди** *(англ. tumor inducing – індукуючі пухлини)* – кільцеві молекули ДНК розміром 50–80 мкм, молекулярною масою близько $1{,}3.10^6$Д і довжиною до 200 тис. пар нуклеотидів, що дозволяє їм кодувати близько 150–200 білків. У бактеріальній клітині міститься 1–2 Ті-плазміди, на частку яких припадає близько 4% клітинної ДНК. Генетична карта pTi повністю не розшифрована. З'ясовано тільки 4 ділянки: дві онкогенні (Т-ділянка, vir-гени) і дві ділянки (OR1, CON), які визначають морфологію пухлин, забезпечують реплікацію плазмід та їх кон'югацію.

**Т-ДНК** (від англ. transferred – перенесення) – основний об'єкт генно-інженерних маніпуляцій, тому що саме цей фрагмент переноситься від онкогенної pTi в рослинну клітину, що приводить до її пухлинного переродження. Т-ДНК – фрагмент Ті-плазміди, який являє собою кластер бактеріальних генів. Т-ділянка містить приблизно 20–23 тис. пар нуклеотидів, що складає 5–8% всієї плазміди. Онкогени Т-ДНК контролюють синтез опінів (біологічно активних сполук, які є специфічними джерелами живлення азотом і вуглецем тільки для агробактерій) і фітогормонів, що стимулюють проліферацію тканин рослини-господаря (утворення наростів). Розрізняють декілька типів Ті-

плазмід: октопінові, опалінові, атропінові та інші.

*Vir-ділянка* (від англ. virulence – вірулентність, ступінь патогенності) містить близько 35 тис. пар нуклеотидів і складається з 7 локусів – A, B, C, D, E, F, G, які відповідають за вирізання і вбудовування генів Т-ДНК в ядерну ДНК рослинної клітини.

Рис. Узагальнена генетична карта Ті-плазміди *Agrobacterium tumefaciens*:

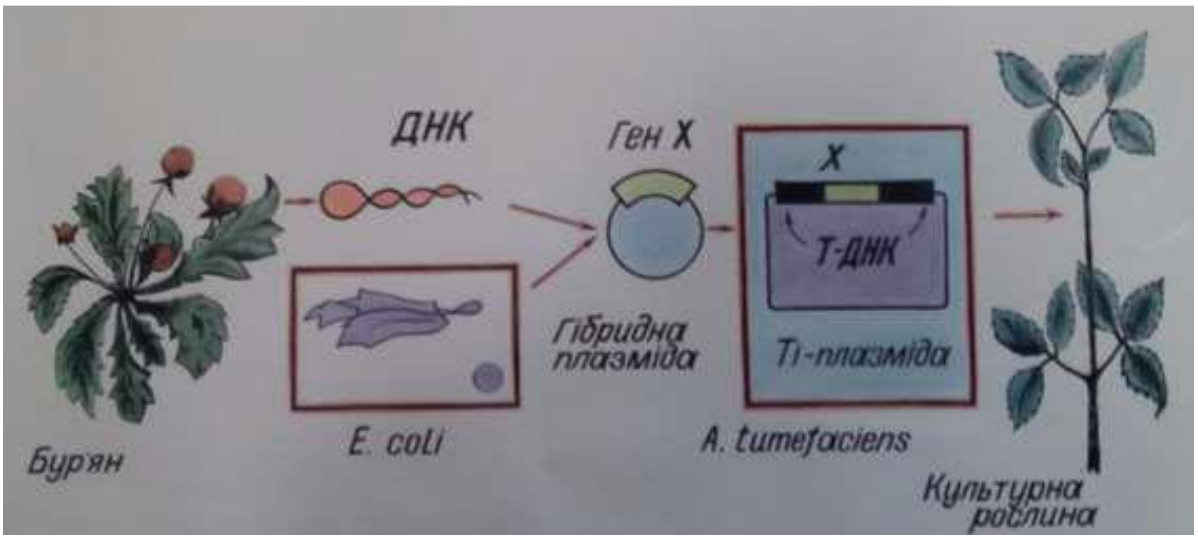



*vir-область* – забезпечує вірулентність (вирізання і вбудовування Т-ДНК в геном рослинної клітини); Т-ДНК – містить ген, який контролює синтез тільки одного із опінів; OR1 – ділянка реплікації; CON – ділянка кон'югації.

**Ri-плазміда, індукуюча корені плазміда –** високомолекулярна плазміда бактерії *Agrobacterium rhizogenes*, здатна переміщатися в клітини коренів вищих рослин, вбудовуватись в їх ядерну ДНК і сприяти надлишковому розростанню коренів. Вперше описана Ф. Вайтом і Е. Нестером у 1980 р.

**Генетична трансформація.** Термін трансформація походить від латинського *transformatio* – перетворення і означає зміни в геномі та спадкових властивостей організму.

Генетична трансформація досягається шляхом проникнення крізь канали клітинної мембрани екзогенної ДНК і взаємодії останньої з клітинним геномом.




Генетичну трансформацію розглядають як спосіб отримання більш

обмежених і специфічних генетичних змін. У багатьох випадках окрема важлива у сільськогосподарському відношенні ознака, що контролюється одним або невеликою кількістю генів, може бути змінена шляхом трансформації, при цьому більша частина геному залишається без змін.

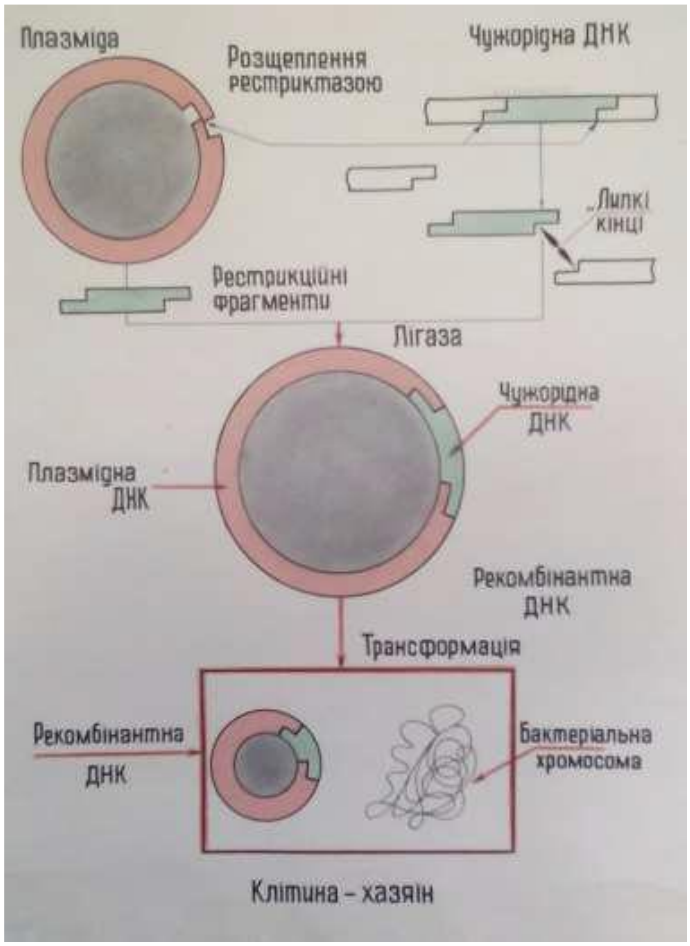
В усьому світі проводяться дослідження по визначенню, виділенню, клонуванню і введенню в рослини генів, які відповідають за стійкість до холоду, посухи, засолення, тобто до стресових впливів оточуючого середовища, за стійкість до шкідників, гербіцидів і пестицидів, хвороб тощо. На сьогодні розроблено багато підходів до проблеми трансформації, однак з практичної точки зору відносно простий і відтворюваний метод базується на використанні *Agrobacterium tumefaciens*.

Для введення чужорідної ДНК використовують коінтегративну векторну систему, яка передбачає використання проміжного вектора. Спочатку Т-ДНК за допомогою рестриктаз вирізають із плазміди і вставляють у вектор для клонування в *E. coli*. Плазміду з Т-ДНК розмножують і, використовуючи стандартні методи, вбудовують чужорідний ген всередину Т-області і знову розмножують з уже вставленим геном. Потім отриману рекомбінантну плазміду вводять в клітини *A. tumefaciens*, які несуть повну Ті-плазміду. В результаті подвійного кросинговеру (гомологічної рекомбінації) між гомологічними районами Т-ДНК частина рекомбінантної плазміди, яка містить чужорідний ген, включиться в Ті-плазміду, замістивши у ній нормальну Т-ДНК. Нарешті, бактеріями, які мають Ті-плазміду з вбудованими генами, заражають рослини і в результаті отримують клітини корончатого гала, які будуть містити Т-область з вбудованим у неї чужорідним геном.

**Технологія рекомбінантних ДНК. Рекомбінантна ДНК** – молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії (молекулярне клонування). Молекула поєднує в собі генетичний матеріал, виділений з різних біологічних джерел, створюючи таким чином певну ДНК послідовність. Отримана таким чином векторна ДНК може реплікуватись в клітинах-хазяях. Векторами для рекомбінантної ДНК можуть бути плазміди, віруси, штучні хромосоми на основі дріжджових чи тваринних хромосомальних елементів.

Існує велика кількість різних систем, що дозволяють здійснювати експресію генів. Окрім загальної назви «рекомбінантна ДНК», таку молекулу іноді називають химерною ДНК. В технології рекомбінантної ДНК загалом використовують паліндромну послідовність, яка після

відповідних маніпуляціях має тупі та липкі кінці. За допомогою технології рекомбінантної ДНК можливо перенести в геном одного організму певний ген, виділений з геному іншого організму, створюючи таким чином генетично модифікований організм.




Для створення молекули рекомбінантної ДНК необхідно пройти декілька етапів:

1. виділення потрібного (цільового) гену;
2. вбудова гену в специфічну ДНК послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-господарі;
3. введення вектору в організм-реципієнт;
4. визначення та відбір клітин, в геномі яких виявлена присутність гену інтересу.

Створення рекомбінантної ДНК відбувається завдяки методу молекулярним клонуванням. Це є неосновний метод, але найбільш поширений. Тож, спочатку за допомогою рестриктаз отримують різного роду фрагменти ДНК, в тому числі й послідовності, що кодують гени. Фрагменти ДНК можуть мати як тупі так і липкі кінці. В результаті, різноманітні фрагменти ДНК можливо комбінувати між собою за допомогою різноманітних методів, наприклад методом рестрикційно/лігазного методу, методом Гібсона (Gibson assembly) та ін. Після введення чужорідної ДНК у геном організму-господаря, рекомбінантна ДНК-конструкція може експресуватись. В деяких випадках експресія не відбувається.

**Поліпшення якості рослинної продукції.** Існує ряд підходів для отримання рослин із зміненими якостями плодів і овочів.

Для поліпшення смакових властивостей рослинної продукції (надання солодшого смаку) використовують гени синтезу монеліну або

тауматину – білків, які в 100 000 разів солодші, ніж цукор, в розрахунку на молекулярну масу. Ці білки виділені з плодів африканських рослин Dioscoreophyllum cumminsii та Thaumatococcus danielli. Ген синтезу монеліну введено в рослини томатів і цибулі-латуку. Трансгенні рослини накопичують цей білок у значній кількості в плодах і листках.

Якість і користь рослинних жирів залежать від вмісту пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої кислот. Жири, збагачені олеїновою кислотою, стабільні до окислення, містить кращий запах і корисніші для здоров'я, тоді як жири, збагачені ненасиченими жирними кислотами (лінолевою і ліноленовою), мають менш якісні органолептичні характеристики і менш стабільні. Більшість рослинних жирів містить понад 50 % ненасичених жирних кислот. Тому були розпочаті роботи з отримання трансгенних олійних рослин зі зміненим вмістом жирних кислот. Ці дослідження свідчать про те, що трансгенні рослини сої, які несуть ген, що кодує антисмислову омега-3-десатуразу (каталізує синтез ліноленової кислоти із лінолевої), характеризуються зниженим вмістом ліноленової кислоти. Трансгенні соя і ріпак із геном омега-6-десатурази мали знижений вміст лінолевої і підвищений вміст олеїнової кислот. Ріпак із внесеним геном ацил-тіоестерази має в насінні підвищений вміст пальмітинової і стеаринової кислот.

Проведено роботи щодо внесення генів, які кодують інші жирні кислоти і запасні ліпіди, такі, як петроселінова кислота, циклопропанові жирні кислоти, рідкі воски, ерукова, рицинолева, g-ліноленова кислоти, жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом.

Отримані трансгенні рослини сої і кукурудзи з поліпшеними якостями жирів, з дуже низьким вмістом поліненасичених жирних кислот і високим рівнем мононенасичених кислот. Деякі з цих модифікованих жирів застосовують в промисловості як мастильні матеріали і вихідні продукти для подальших хімічних перетворень.

Найбільш простою і очевидною стратегією в поліпшенні якості білка пшениці та інших злаків є збільшення кількості генів, які кодують високомолекулярні субодиниці білка (поліпептиди). Цей напрям розроблявся в декількох лабораторіях, які мають подібні гени під контролем ендоспермспецифічних промоторів. З використанням таких генів здійснено описані нижче досліди.

Проведено мікробомбардування ембріогенного калюсу пшениці плазмідою, що містила гібридний ген, отриманий внаслідок штучного

об'єднання генів DylO і Dx5, які кодують високомолекулярні субодиниці глютеніну. Були отримані трансформанти, у яких відбувалося накопичення гібридної субодиниці глютеніну в доповнення до вихідних субодиниць. У такий спосіб встановлено адитивний ефект, що призвів до формування високомолекулярних субодиниць глютеніну на рівні 120—180 % порівняно з вихідним сортом. Стабільна експресія трансгенів спостерігалася протягом семи статевих поколінь рослин.

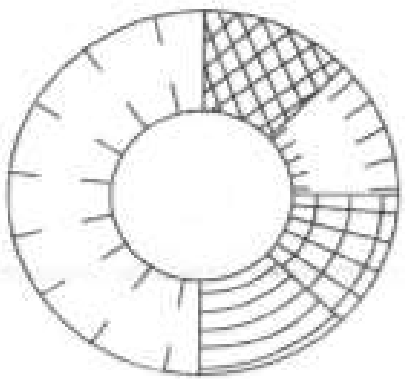
Використання запасних білків насіння можливе також для поліпшення харчової цінності кормових культур, методом внесення генів, які кодують повноцінні білки під промоторами, що експресуються в листках кормових культур і генів, що кодують ферменти, здатні підвищувати засвоєння кормових культур.

Зокрема, в рослини люцерни введено гени, які кодують дигідропіколінатсинтазу і аспартаткіназу, які підвищують вміст незамінних амінокислот лізину і треоніну відповідно. Трансгенні рослини люцерни характеризувалися підвищеним у 8 разів вмістом вільного треоніну. В рослини люцерни і лядвенцю введені генетичні конструкції з генами d- і b-зеїнів під 35S промотором. Обидва білки інтенсивно накопичувалися у вегетативних органах новоутворених білкових тілець. У разі спільної експресії обох генів відмічені переважне накопичення d-зеїну і спільна локалізація обох типів зеїнів.

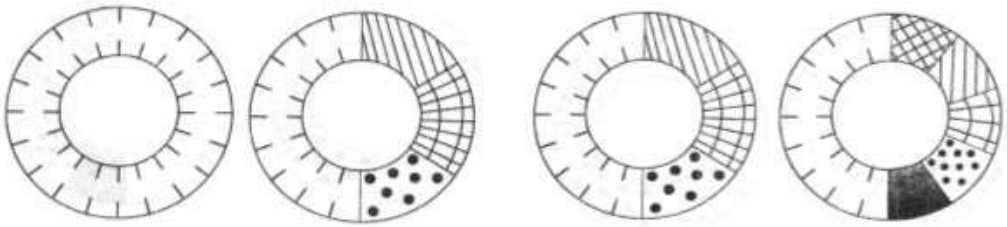
Запропоновано отримувати насіння трансгенних кормових культур, які містять набір ферментів для підвищення засвоєння кормів, антибіотики, вітаміни, інші корисні складові. Можливе також введення в рослини генів, що кодують ензими, які сприяють виведенню із їжі небажаних інгредієнтів, наприклад холестерину, кофеїну, чи гени, що підвищують засвоєння їжі.

***Завдання***

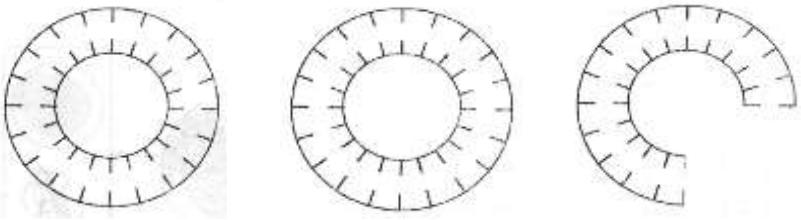
1. Описати вимоги вектора



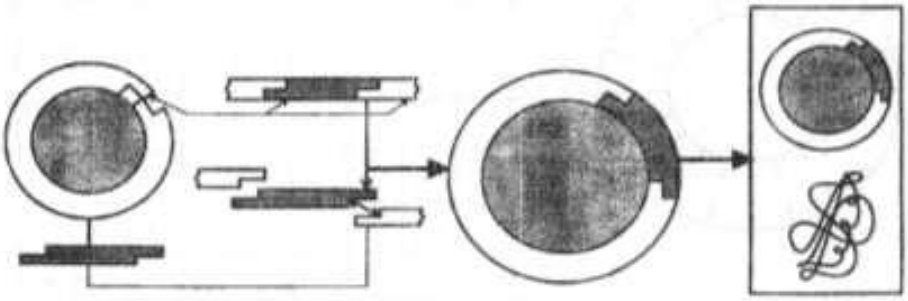
2. Описати вектори прокаріот



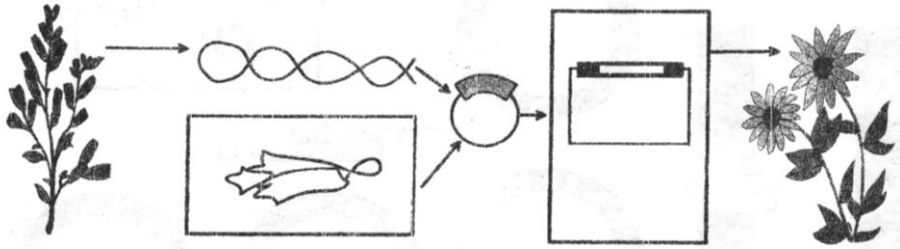
3. Описати вектори еукаріот



4. Описати метод добування рекомбінантної ДНК



5. Описати схему перенесення ДНК від однієї рослини до іншої



# ТЕМА 20: ОСНОВИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ РОСЛИН

***Мета:*** ознайомлення з особливостями кріозбереження генофонду рослин

## *Теоретична частина*

Як наука кріобіологія почала розвиватися у кінці XIX століття.

Для більшості соматичних клітин і спермііів ряду видів тварин кріоконсервація стала звичайною процедурою. В той час як для рослинних клітин все ще немає універсального методу, який був би придатним для їх кріозбереження. Більше того, як правило, навіть штами, похідні від одного вихідного, потребують різних умов на деяких важливих етапах цієї екстремальної процедури. І все ж у світі досягли кріозбереження (при – 196°С) культур клітин майже для 40 видів рослин і культур апікальних меристем ще 25 видів.

Причина такого відносно повільного просування пов’язана не лише з недостатньою увагою до цієї проблеми, але перш за все зі специфікою рослинних клітин: великими розмірами, значною вакуолізацією, великою кількістю води та надзвичайно широкою пластичністю їхнього метаболізму, оскільки вони перебувають у більш мінливих умовах, ніж умови строгого гомеостазу внутрішнього середовища, яке оточує клітини тварин. Тому виживання клітин після розморожування навіть у кращих, рідких випадках не перевищує 60–70 %.

Пошкодження клітин при заморожуванні і послідуючому відтаюванні залежать від утворення льоду всередині клітин і від їх дегідратації. Небезпечним є ріст центрів кристалізації у крупні кристали (понад 0,1 мкм), чиї грани руйнують ендомембрани. Швидкість росту кристалів сильно зростає при збільшенні ступеня переохолодження води. Повністю ріст і перебудова кристалів льоду зупиняються у чистій воді тільки при – 140 °С. Ось чому тривале зберігання можливе тільки при більш низьких температурах.

Точка замерзання цитоплазми ≈ - 1 °С, кріопротектори знижують її до - 3,5 °С, але клітини, як правило, не замерзають до - 10–15 °С, бо за цих температур плазмалема ще запобігає проникненню всередину кристалів льоду, які ростуть у зовнішньому розчині. Отже на момент ініціації кристалізації у клітині уже існує значне переохолодження, що дуже несприятливо. Але якщо температура знижується досить повільно, то

вільна вода встигає вийти із клітини. Відбувається значна дегідратація і стиснення протопласта, тобто плазмоліз. Пошкодження, які виникають можуть мати різні механізми, але провідну роль для клітин рослин, якщо в середині них не утворюються великі кристали льоду, при зниженні температури до – 25 °С відіграє надмірний плазмоліз і послідуюча повна втрата осмотичної реактивності в результаті порушення цілісності плазмалеми.

Кріозбереження як система єдиного екстремального процесу (заморожування–зберігання-розморожування) складається з таких елементів: підготовка об'єкту, додавання кріопротектора, заморожування в певному режимі, зберігання в рідкому азоті, розморожування, видалення кріопротекторів (відмивка), рекультивація (для клітин), регенерація цілих рослин (Рис.).

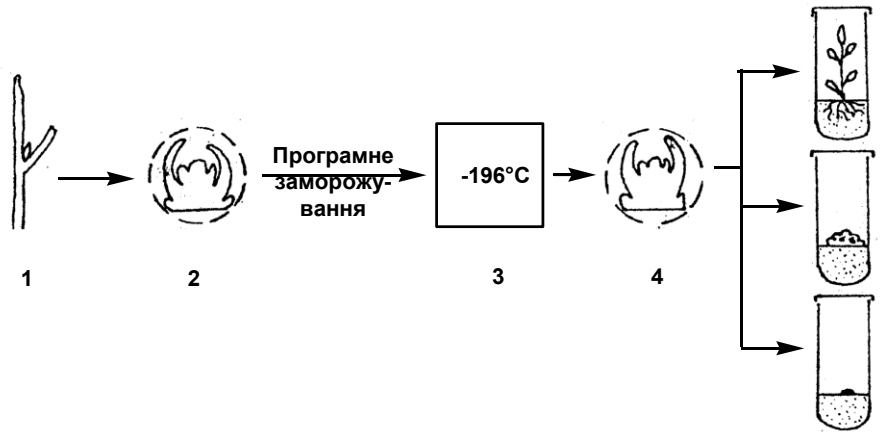



***Рис. Схема технології кріозбереження меристем у рідкому азоті: 1 – вилучення меристем; 2 – підготовка об'єкту, додавання кріопротекторів; 3 – кріозбереження у рідкому азоті; 4 – розморожування, посадка на середовище для регенерації.***

Кріоконсервація культур клітин і меристем рослин на відміну від клітин тварин у багатьох випадках починається з етапу спеціальної підготовки, хоча є культури, для яких він не обов'язковий. Але і такі культури для заморожування варто брати на початку або всередині експоненціальної фази росту, коли вони збагачені меристемоїдними клітинами. Звідси найпростіший спосіб підготовки полягає у частому пересаджуванні культури , що дозволяє підтримувати її майже постійно в ранній експоненціальній фазі. Іноді пересадки роблять кожні 2 – 4 доби.

Інші способи потребують попереднього культивування у певних умовах. При одному із способів у середовище додавали маніт або сорбіт у

концентрації 2 – 6 % на період від кількох діб до 2 – 3 пасажів. Такий спосіб зменшував розмір клітин і, що важливіше, їх вакуолей, значно покращував виживання клітин явора, моркви, перцю, забезпечував кріозбереження багатьох штамів. Іноді концентрацію сорбіту підвищують до 1 М (18,2 %), але не довше ніж на добу.

При другому способі передкультивуванння використовують амінокислоти і в першу чергу пролін, який має значення для зв'язування води у клітинах рослин. Його концентрацію поступово підвищували для ряду клітин до 1 М (11,5 %) на строк до 4 діб. Але клітини деяких видів дуже чутливі до проліну, навіть при короткочасній (1 – 2 год) інкубації. Наприклад, для клітин діоскореї використовували низькі концентрації (0,01 – 0,05 М) і не тільки проліну, але і аланіну, серину і аспарагіну протягом 4 – 6 діб. Найкращі результати були отримані з аспарагіном, інші амінокислоти були менш ефективні. Показано, що замість проліну або разом з ним у ряду видів рослин значна роль в осморегуляції належить аспарагіну або гліцину. Крім названих речовин для попереднього культивування і кріозахисту використовували γ-аміномасляну кислоту.

Третій спосіб передкультивування – додавання у середовище кріопротекторів – речовин, які зв'язують вільну воду як в міжклітинниках, так і в клітинах; ускладнюють її кристалізацію за рахунок утворення з нею водневих зв'язків; зменшують ущільнення протопластів клітин при заморожуванні.

Найефективнішими кріопротекторами є диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь і його похідні, пролін, гліцерин, сахароза і глюкоза. Крім того є повідомлення про кріозахисну дію і інших (крім проліну) амінокислот і близьких сполук (гліцин-бетаін, γ-аміномасляна кислота, оксипролін і аспартат). Всі ці речовини використовують як окремо, так і в комбінаціях, що дозволяє зменшити їхню токсичність. Наприклад, ПЕГ з середньою мол. масою 6000 діє саме таким чином, оскільки сам не захищає. Рідко як кріопротектор використовують трегалозу, яка у концентрації 15% виявилась у 1,5 рази ефективнішою, ніж 7%-й ДМСО, а 20% - майже на рівні ДМСО. Особливо ефективним було використання суміші трегалози з ДМСО та сахарозою.

Спочатку цей спосіб передкультивування використовували тільки для апексів пагонів.

Для передкультивування з кріопротекторами слід використовувати рідке середовище і містки із фільтрувального паперу.

Четвертий спосіб попереднього культивування відбувається в умовах штучного загартовування, його краще застосовувати для зимуючих рослин помірного клімату. Для клітинних, тканинних і органних культур не зимуючих рослин цей спосіб непридатний. У разі культур меристем доцільно попередньо загартовувати самі рослини із яких потім вирізають меристеми і культивують їх на середовищі з ДМСО. Суть загартування полягає в імітації природного осіннього процесу підготовки рослин до періоду зимового спокою. У різних груп рослин цитофізіологічні механізми такої підготовки різні. При роботі з клітинними суспензійними або калюсними культурами звичайно їх або зразу поміщають в умови з температурою від 2°С до 5°С на строк від 1 до 6 тижнів, або спочатку протягом кількох діб витримують при температурі 8–10 °С. Ефективнішим є загартування у присутності сахарози. Для калюсних культур її додають до 12 – 15 %.

Для перед- і рекультивування рослинних тканин використовують середовище Мурасиге і Скуга (МС) із 2% сахарозою, вітамінами за Стабом, інозитом – 100, кінетином - 0,5, гібереловою кислотою – 2, аденіном – 40 мг/л.

Вибір способу підготовки залежить від об’єкта і його особливостей.

Після підготовки перед додаванням кріопротекторів клітинні суспензії концентрують. Оскільки центрифугування (навіть протягом 5 хв при 100 g) пошкоджує багато рослинних клітин, то використовують осаджування у циліндрі або прямо у колбі, які поміщають у посудину з льодом. Тривалість осадження 15 – 20 хв залежно від розміру клітин і їх агрегатів. Невеликі агрегати з дрібними найбільш життєздатними клітинами осідають останніми. Після осадження супернатант відсмоктують.

Для найдрібніших і найстійкіших клітин (наприклад, моркви) допустимі швидкості заморожування 1 – 4 °С/хв, але для більших і вакуолізованих, до яких належить більшість рослинних клітин, що культивуються *in vitro*, рекомендується швидкість 0,5 °С/хв, а для самих великих агрегатів і апексів ще менші швидкості. Апарати програмного заморожування випускає Спеціальне конструкторське бюро при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у Харкові.

Сьогодні створено універсальну програму заморожування, яка забезпечила успіх з 13 клітинними штамами 6 видів рослин і меристемами трьох видів. Основна відмінність цієї програми – це використання

„затравки”, тобто примусової ініціації кристалізації. Затравка має бути при температурі на 1–2 °С (не більше) нижчій точки замерзання кріозахисного розчину. Для затравки ампули занурюють у рідкій азот на 0,5–1,0 сек (у камері заморожувача).

Після затравки доцільно стабілізувати температуру на тому ж рівні до кристалізації всього розчину в ампулі. Для цього достатньо 20 хв. Далі знижують температуру із заданою швидкістю до –30 $^0$С, а потім зі швидкістю ≈ 9 °С/хв до –70 °С і швидко переносять ампули в рідкий азот. Саме при цій кінцевій температурі повільного заморожування отримують максимальне виживання рослинних клітин.

Тривалість зберігання у рідкому азоті не лімітована при умові, що ампули не виступають над його поверхнею, так як температура над нею швидко підвищується. Відтавання має бути як можна більш швидким. Для цього ампули струшують у воді з температурою 40 °С, іноді навіть 60 °С.

Відмивання від кріопротектора застосовують тільки у разі речовин, токсичних для даних клітин. Вміст ампули розбавляють у 3–4 заходи з 15-хвилинним інтервалами великим об’ємом холодного живильного середовища або 3–15 % сахарозою. Потім клітини просто відстоюють, а супернатант замінюють на живильне середовище, об’єм якого приблизно рівний вихідному об’єму суспензії.

Найпростіший і цілком задовільний спосіб оцінки життєздатності клітин після розморожування – фарбування вітальним барвником. Для цього змішують краплю суспензії і краплю 0,1 % феносафраніна або 0,25 % синього Еванса. Розглядати під мікроскопом можна відразу, забарвлення мертвих клітин стійке не менше 30 хв (живі клітини не забарвлені). При використанні флюоресцеюючого барвника флюоресцеіндіацетату, навпаки, не забарвлені мертві клітини, але у цьому випадку розглядати можна через 6 хвилин, забарвлення менш стабільне і потрібний люмінесцентний мікроскоп. В зв’язку з тим що основна маса клітин в основному зосереджена в агрегатах з числом клітин більше 10–15, де клітини маскують одна одну і порахувати їх неможливо або складно, то рекомендують при підрахунку агрегатів, вважати агрегат живим, якщо 1/2 і більше його клітин не пофарбовані, і мертвим якщо більше половини клітин пофарбовані. Інші способи оцінки мають свої переваги, але потребують більше часу і не підвищують точність. Кінцевим критерієм є чітке відновлення росту при рекультивуванні розморожених об’єктів. Для цього варто розподілити суспензію із однієї або двох–трьох ампул на

поверхні агарового живильного середовища. Відновлення культур потребує від 2 до 6 тижнів.

Вивчення життєздатності клітин після кріоконсервування показало, що зберігання в рідкому азоті не впливає на виживання і відновлення клітинних культур після кріозбереження. Наприклад, життєздатність клітинних ліній діоскореї не змінилася після зберігання у рідкому азоті протягом 4,5 років (штам ДМ-0,5) і 6 років (штам Д-1). Клітини моркви відновили ріст після 12 років кріозбереження. Вже одержані рослини-регенеранти картоплі, моркви, гороху, суниць, томатів з меристем, які зберігались при наднизьких температурах. Проводяться дослідження з кріозбереження клітинних штамів-продуцентів економічно важливих речовин.

***Завдання***

1. Описати схему технології кріозбереження меристем у рідкому азоті.
2. Описати способи культивування рослин.
3. Які кріопротектори є найефективнішими?
4. Який найпростіший і задовільний спосіб оцінки життєздатності клітин після розморожування?

# ТЕМА 21: ПЕРВИННІ ТА ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ

***Мета:*** освоєння особливостей отримання біологічно активних речовин

## *Теоретична частина*

Клітини, вилучені з материнських рослин і поміщені *in vitro,* зберігають здатність відтворювати основні ланцюги біохімічних синтезів вторинних метаболітів.

*In vitro* створюються умови, які дозволяють виділити окремі нові штами клітин зі стійкою направленістю синтезу речовин вторинного обміну. Важливим є те, що у ряді випадків *in vitro* клітина набуває здатності синтезувати речовини, які в інтактній материнській рослині не виявлені, наприклад: перицин, перикалін, хінокіол, феригінол, воміленін та інші. У ряді випадків у клітинних культурах цільовий продукт накопичується у значно більших кількостях, ніж у відповідних інтактних рослинах (табл. 1). Цьому сприяють селекція мутантних клонів і оптимізація умов вирощування.

Таблиця 1

**Вміст деяких біологічно активних речовин в інтактних рослинах і в культурі клітин**

| Речовина (цільовий продукт) | Рослина | Вміст цільового продукту, % від сухого залишку | |
|---|---|---|---|
| | | Культура клітин | Інтактна рослина |
| Аймаліцин | ***Catharanthus roseus*** | 1,0 | 0,3 |
| Антрахінони | ***Morinda citrifolia*** | 18,0 | 2,2 |
| Віснагін | ***Ammi visnaga*** | 0,31 | 0,1 |
| Гінзенгозид | ***Panex ginseng*** | 27,0 | 4,5 |
| Глутатіон | ***Nicotiana tabacum*** | 1,0 | 0,1 |
| Діосгенін | ***Dioscorea deltoidea*** | 2,0 | 2,0 |
| Кофеїн | ***Coffea arabica*** | 1,6 | 1,6 |
| Розмаринова кислота | ***Coleus blumei*** | 15,0 | 3,0 |
| Серпентин | ***Catharanthus roseus*** | 0,8 | 0,5 |
| Убіхінон-10 | ***Nicotiana tabacum*** | 0,036 | 0,003 |
| Шиконін | ***Lithospermum erythrouhizou*** | 12,0 | 1,5 |

На цій основі створюється можливість розробки методів і технологій для отримання речовин вторинного синтезу, які цінні для медицини, парфюмерії, сільського господарства. Перше повідомлення про синтез каучуку клітинами гваюли зробив у 1940 році Дж. Боннер. Сьогодні нараховують понад 50 груп вторинних метаболітів, які продукуються культурами рослинних клітин. Серед них: алкалоїди, амінокислоти, антилейкемійні агенти, антипухлинні агенти, білки, вітаміни, гормони, запашні речовини, інгібітори вірусів рослин, барвники, інсектициди, інсулінподібні речовини, ліпіди, пігменти, харчові добавки тощо.

Отримання вторинних метаболітів *in vitro* має ряд переваг:

- швидкість одержання;
- незалежність від погодних умов;
- непотрібність великих площ для вирощування рослин у відкритому грунті;
- звільнення рослинного матеріалу від хвороб та шкідників;
- одержання екологічно чистих продуктів.

Для отримання речовин вторинного синтезу використовують два основних типи культур *in vitro*. Це культура калюсних тканин і клітинні суспензії. Калюсні культури, які мають повільнішу швидкість росту, як правило, накопичують вторинні метаболіти у більших кількостях, ніж клітини суспензії, які при вирощуванні у ферментерах накопичують значну кількість біомаси, але вихід вторинних речовин залишається відносно низьким. У зв’язку з цим при промисловому культивуванні перевага надається використанню іммобілізованих (нерухомих) клітин, які накопичують біомасу повільніше, ніж клітини, які ростуть в рідких суспензійних культурах.

Клітини, іммобілізовані в або на інертний субстрат мають ряд переваг над клітинами, що культивуються у вільному стані:

- вони не утворюють агрегатів, не диференціюються і не змінюють синтетичну активність;
- мають підвищену стійкість до механічних пошкоджень;
- у них фаза росту співпадає з фазою утворення метаболітів;
- їх легко можна перенести у свіже середовище або реакційну суміш.

Для іммобілізації можна використовувати гомогенну суспензію, невеликі агрегати клітин або гомогенат рослинної тканини.

В зв’язку з тим що рослинні клітини тотипотентні, то для того щоб змусити будь-яку клітину продукувати речовини властиві вихідній рослині достатньо створити відповідні умови культивування. Але цей підхід доречний для культур, отриманих із високопродуктивних рослин. Дослідження синтезу алкалоїдів у рослинах і культурах барвінку показали, що в цілому культури, отримані із високопродуктивних рослин мали тенденцію до синтезу більшої кількості алкалоїдів, ніж культури із малопродуктивних рослин. Подібні ж результати отримані і для *Nicotiana tabacum* – високопродуктивні культури отримували із високопродуктивних рослин. Ні разу не спостерігали, щоб калюс низькопродуктивної рослини давав більший вихід нікотину, ніж калюс високопродуктивної рослини. Тобто утворення нікотину детерміновано генотипом батьківської рослини. Ці дані свідчать, що для отримання високопродуктивних культур потрібно відбирати найпродуктивніші рослини. Але це не значить, що необхідно відбирати частину рослини найбільш збагачену цією сполукою, бо висока концентрація речовини у тканині може бути результатом направленого транспорту, а не продуктом синтезу, що тут локалізований. Збільшення синтезу вторинних речовин *in vitro* можна індукувати фізіологічними стимулами, тобто впливаючи на пускові механізми біосинтезу вторинних метаболітів. Як один із пускових механізмів біосинтезу вторинних речовин розглядають умови культивування.

***Компоненти середовища.*** Найчастіше для культивування калюсної і суспензійної культур використовують середовище Мурасиге і Скуга (МС). Це середовище підтримує ріст більшості клітин рослин, а також оптимальне для індукції вторинних метаболітів у цих клітинах. В основному умови середовища, які обмежують швидкість поділу клітин, підтримують активний синтез вторинних метаболітів і їх накопичення в культурах клітин.

Найвпливовішим фактором живильного середовища є регулятори росту: змінюючи концентрації або складовий набір гормональних речовин, можна суттєво впливати на процеси синтезу. Наприклад, при заміні 2,4–Д на НОК у середовищі для вирощування суспензійної культури *Morinda citrifolia* отримали збільшення синтезу алколоїду антрахінону у 3 рази. Подібні результати отримані для тютюну: спостерігали синтез нікотину на середовищі з ІОК, але не з 2,4–Д у тій же концентрації. НОК, залежно від концентрації, мала стимулюючий або інгібуючий вплив на біосинтез

нікотину в культурах клітин тютюну. Отже, 2,4-Д менше прийнятна для запуску вторинного метаболізму в культурах рослинних клітин, ніж ІОК.

У більшості випадків ауксини додають до середовища разом із цитокінінами. Цитокініни по різному впливають на накопичення вторинних метаболітів. У культурах клітин *Scopolia maxima* відносно висока концентрація кінетину ($5 \cdot 10^{-5}$ М) викликає утворення алкалоїдів, тоді як в калюсних і суспензійних культурах *N. tabacum* кінетин в концентраціях вищих $5 \cdot 10^{-5}$ М повністю пригнічував утворення нікотину.

Важко оцінити спільну дію ауксинів і цитокінінів на утворення вторинних метаболітів, особливо у зв'язку з тим, що не має даних про відносний вміст цих регуляторів росту у клітинах, що культивуються. Вивчення впливу регуляторів росту на біосинтез стероїдів у культурах *Solanum aviculare*, показало, що ауксин у порівнянні з цитокініном сильніше впливає на вихід стероїдів і ріст біомаси навіть при додаванні цитокініну в різних концентраціях.

Мінеральні солі. Підвищення вмісту нітратів, калію, амонію і фосфату приводить до підтримки швидкого росту клітин, тоді як виснаження або відсутність деяких із цих живильних речовин стає фактором, який лімітує ріст і супутній вторинний синтез. Недостача фосфату у більшій мірі, ніж будь-яких інших живильних речовин, стимулює синтез вторинних метаболітів. Наприклад, біосинтез нікотину у культурах тютюну пов'язаний з виснаженням фосфату в живильному середовищі і зі зменшенням вмісту інших живильних речовин, таких як нітрат і сахароза.

На накопичення біомаси впливає вуглеводневе живлення. Для більшості культур використовують сахарозу у концентраціях 15-30 г/л. Використання підвищених концентрацій сахарози (3-5%) звичайно приводить до збільшення виходу вторинних метаболітів у культурах.

Попередники. Додавання у середовище попередників для підвищення виходу кінцевого продукту не набуло широкого використання. Основною перепоною для використання попередників є недостатнє вивчення шляхів біосинтезу багатьох речовин вторинного синтезу.

Оптимізація живильного середовища є ключовим фактором у підвищенні виходу продукту. Дослідження впливу живильних середовищ на вихід продукту привели до розробки так званих „продукційних середовищ", із яких найбільш відоме середовище Ценка. Основна особливість продукційних середовищ – можливість створювати умови для

низької швидкості росту при незначній або повній відсутності поділу клітин для підвищеного виходу продукту.

*Фізичні фактори.* На синтез вторинних метаболітів культурами рослинних клітин впливає інтенсивність і довжина хвилі світла. Освітлення люмінісцентними лампами типу “холодне біле світло” (250 люкс) стимулює біосинтез багатьох вторинних метаболітів, наприклад, стероїдні сапогеніни, стероїдні алкалоїди та інші. Для більшості культур індукуючу дію має світло з піками 372 нм і 438 нм.

Відомості про температурний оптимум для росту культур клітин і утворення вторинних метаболітів в цих культурах дуже обмежені. Мабуть це обумовлене традиційним підходом, коли дослідження *in vitro* проводять при температурі близько $25^0$ С.

*Селекція і відбір.* У клітинній популяції, одні клітини синтезують значно більші кількості речовини, ніж інші. Селекція і відбір клітин-продуцентів дозволять одержати клітинні лінії, які перевищують рівень біосинтезу вторинних метаболітів вихідної клітини. Там, де продуктом є пігмент, відбір можна проводити за допомогою мікроскопа або і візуально виявити інтенсивно забарвлені окремі клітини або групи клітин.

Запропоноване в 70-ті роки минулого століття використання радіоімунодіагностики (РІД) підвищило ефективність відбору клітин-продуцентів.

Сьогодні перевага надається використанню ферментної імунодіагностики (ЕЛАЙЗА). Необхідність використання таких складних систем відбору обумовлена труднощами при визначенні дуже низьких концентрацій метаболітів.

Отже, створивши сприятливі умови культивування, *in vitro* можна отримати вторинний метаболіт у кількостях, які синтезуються *in vivo*, а іноді і вищих. Тому сьогодні культуру клітин рослин розглядають як технологію для отримання цінних сполук, які потрібні у невеликих кількостях.

*Утворення вторинних речовин в культурах рослинних тканин*

***Алкалоїди***

Тропанові алкалоїди, особливо атропін і скополамін, мають велике значення для медицини. У рослинній сировині їх вміст дуже незначний. Джерелами тропанових алкалоїдів в основному є представники родини *Solanacea*. Тропанові алкалоїди ідентифіковані у культурах ізольованих

коренів, клітинних і калюсних культурах *Atropa belladonna* (красавка), видів *Scopolia, Datura*, але в менших кількостях ніж у інтактній рослині.

Індольні алкалоїди в ізольованій культурі найбільш вивчені у барвінку і раувольфії. Барвінок містить понад 60 алкалоїдів, 4 з яких мають протипухлинну активність. У культурі *in vitro* виявлено 10 алкалоїдів, які не ідентифіковано у дорослої рослини. Алкалоїди виявлені у калюсах стеблового і листового походження, але відсутні у калюсах кореневого походження.

Із кореневого калюсу раувольфії виділені резерпін, серпентин і аймалін – протигіпертонічні препарати. При вивченні калюсів різного походження виявлено, що культури насіннєвого і кореневого походження багатші на алкалоїди, ніж культура листкового походження. Показано, що загальна кількість алкалоїдів раувульфії збільшується по мірі росту і старіння культури.

***Глікозиди***

Основною сировиною для промислового отримання серцевих глікозидів є види *Digitalis* (наперстянка). Кількість глікозидів у калюсних культурах *Digitalis* зменшується у процесі культивування.

Таніни – катехіни, епікатенхіни, лейкоантоціани виявлені у калюсній тканині ялівцю, суспензійній культурі троянди, калюсній культурі листка і стебла чайної рослини, калюсах сосни і цикламена.

У калюсі ялівцю таніни накопичуються у окремих клітинах або групах клітин, у калюсі сосни – у гранулярному ЕР і вакуолях клітин, у калюсі цикламена – у вакуолях клітин губчастої і складчастої паренхіми.

Фенольні сполуки - каротиноїди, стероїди, антоціани. Культура клітин використовується для вивчення багатьох аспектів біохімії цих сполук. Феноли у суспензійних культурах активно накопичуються на завершальних етапах росту.

Ефірні олії у тканинах цілих рослин утворюються у спеціалізованих секреторних утвореннях – ефіроолійних залозистих волосках, каналах, а у культурі тканин в результаті послабленої диференціації такі структури не утворюються. Можливо тому не вдалося виявити ефірні олії у калюсних тканинах лимона, персика, авокадо. Але відомі приклади збереження калюсною тканиною здатності до синтезу ефірних олій в особливих клітинах паренхімного типу – ідіобластах. Так, у культурах рути духм’яної, які вирощували у темряві, ефірна олія виявлена в ідіобластах,

розташованих групами у глибині тканини, а для калюсу, що виріс на світлі характерна наявність спеціалізованих вмістилищ на його поверхні.

У культурі тканин деяких рослин виявлені складові ефірних олій, які не зустрічаються в органах цілої рослини. У калюсних культур рослин родин зонтичних і губоцвітих виявлена ефірна олія, яка за складом відрізняється від олії інтактних рослин.

Є дані, що ефірні олії, які синтезують ефіроолійні рослини, не завжди утворюються в калюсних тканинах із цих рослин.

***Завдання***

1. Назвати основні групи вторинних метаболітів, які продукуються культурами рослинних клітин.

2. Які переваги отримання вторинних метаболітів *in vitro*?

3. Які типи культур *in vitro* використовують для отримання речовин вторинного синтезу?

4. Назвати переваги використання іммобілізованих клітин для отримання речовин вторинного синтезу.

5. Які концентрації сахарози підвищують вихід вторинних метаболітів у культурах?

6. Чим продукційні середовища відрізняються від звичайних живильних середовищ?

7. Які фізичні фактори впливають на вихід речовин вторинного синтезу в культурі?

8. Назвіть основні методи відбору *in vitro* клітин-продуцентів речовин вторинного синтезу?

# ТЕМА 22: МЕТОДИ ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКИ

***Мета:*** освоєння та вивчення основних методів експрес діагностики

## *Теоретична частина*

Нові біотехнологічні методи в рослинництві ставлять за мету одержання нових цінних генетично реконструйованих форм, що традиційними методами селекції зробити важко або неможливо, а також розробку методів швидкої діагностики, аналізу й оцінки селекційного матеріалу, отриманого методами як генної інженерії, так і класичної селекції. Одержані результати вказують на те, що ці підходи можуть слугувати потужним засобом підвищення ефективності селекційно-генетичних програм і сприяти створенню таких сортів і гібридів, які будуть відрізнятися своєю продуктивністю, господарськими і біологічними показниками, задовольняти вимоги екологічно безпечного сільськогосподарського виробництва.

Утворення антитіл є основою фізіологічного процесу, названого імунною відповіддю. Спеціалізовані клітини – В- і Т-лімфоцити, що містяться в селезінці, лімфатичних вузлах і крові, розпізнають чужорідні білки (антигени), які потрапили в організм тварини, і відповідають синтезом антитіл, що специфічно реагують з антигенами та інактивують їх.

Антигенами можуть бути не лише білки, а й їхні комплекси з іншими речовинами: полісахаридом, ліпідно-вуглеводневими комплексами, органічними речовинами різної будови. Антитілами є білки глобулінової природи, що утворюються в організмі у відповідь на введення речовин, що несуть на собі ознаки чужорідної генетичної інформації (антигенів). Антитіла строго специфічні, тобто вступають в реакцію лише з антигеном, що індукує їх синтез. Саме на специфічності реакції антиген-антитіло й ґрунтується один з основних сучасних методів діагностики — імунодіагностика.

У організмі тварини під час попадання антигену з'являється значна кількість різноманітних антитіл, що синтезуються лімфоцитними клонами. Незалежно від цього кожний лімфоцит, що бере участь в імунній відповіді, виробляє лише одне антитіло. У разі створення самостійної культури лімфоцитів in vitro остання буде спроможна виробляти моноклональні антитіла. Ця ідея реалізована шляхом злиття лімфоцитів із мієломними (пухлинними) клітинами, причому отримана гібридна клітина одержує

одночасно властивість лімфоцита синтезувати специфічне антитіло і властивість мієломної (пухлинної) клітини проліферувати постійно in vitro.

З імунологічної точки зору кожна гібридомна лінія є продуцентом моноклонального антитіла, тобто антитіла, яке специфічно реагує лише з одним строго визначеним антигеном.

*Метод ідентифікації антигенів у тканинах рослин.* Вдаючись до здатності антитіл зв'язуватись з доступними маркерами (ферментами, флюорохромами і тощо), створено високочутливі специфічні методи ідентифікації пошукових речовин, яким попередньо було надано властивості антигенів в органах, тканинах і клітинах рослин. Такі модифікації імунологічного методу мають безсумнівні переваги над цитохімічними, що пов'язані з визначенням внутрішньоклітинного складу за допомогою хімічної взаємодії з відповідними барвниками.

Імунофлюоресцентний метод (ІФМ) виявлення антигенів у рослинних тканинах був розроблений на початку 70-х років XX ст. В його основу покладено визначення антигенів за допомогою специфічних антитіл, мічених флюоресцентною речовиною. Незважаючи на його високу чутливість, протягом багатьох років у цитології рослин не приділялося належної уваги ІФМ. За останні роки зростала кількість досліджень із застосуванням методу ІФМ. За допомогою імуноцитохімічних досліджень рослин можна отримати цінну інформацію про точну локалізацію певних макромолекул на ультраструктурному рівні клітин і зміні розподілу макромолекул на клітинному рівні в онтогенезі.

Важливим моментом імуноцитохімії рослин є стан досліджуваного антигена, що може бути зв'язаний із мембранними структурами або розчинений в клітині, дифундувати в міжклітинний простір, — від цього залежить вибір найефективнішого методу діагностики.

*Одержання антитіл.* Для одержання специфічних антисироваток найчастіше використовують два методи — ін'єкція антитіл тваринам (кроликам, вівцям, козам і тощо) і одержання антитіл щепленням у мишей. Перший метод застосовують в імуноцитохімії рослин, а другий успішно використовують для ідентифікації вірусів рослин. Ці методи відрізняються один від одного своїми специфічними вимогами. Поліклональні антисироватки містять значну кількість різноманітних антитіл, спрямованих проти як аналізованого антигену, так і домішок у ньому, у той час як гібридомний метод дає змогу одержувати гомогенні антитіла, що можуть розпізнавати антигени і реагувати за допомогою єдиної

антигенної детермінанти.

Звичайно антисироватки застосовують у разі проведення попередніх досліджень, їх легко одержати за порівняно короткий термін, а їх специфічність досліджується доступними методами. Зазвичай вони характеризуються подібністю із досліджуваним антитілом. Часто використовувані антисироватки у вигляді препаратів пропонуються і для комерційних цілей.

Методи одержання антитіл проти антигенів рослин істотно не відрізняються від застосування антисироваток проти антигенів тварин.

Слід зазначити, що під час ізолювання й очищення антигенів рослин виникають певні ускладнення, пов'язані з тим, що гомогенати рослин швидко темніють внаслідок вмісту поліфенолоксидаз, тирозиназ і протеаз, а також низького pH клітинного соку. Потемніння можна усунути або значно зменшити додаванням до екстракту полівінілпіролідону або сполук, що містять сульфгідрильні групи, а також екстракцією соку рослин за низьких температурах.

Чисті імуноглобуліни для антигенів рослин успішно одержують додаванням у відповідні імунні сироватки сульфату амонію з наступною хроматографією на аніонообмінниках.

*Мічення антитіл.* Маркірування антитіл флюорохромами є важливим етапом імунофлюоресцентних методів із локалізації антигенів у клітині рослин. Частіше для цього використовують флюорохроми флюоресцеінізотіоціанат (ФІТЦ) і тетраметилродамінізотіоціанат (ТРІТЦ). Високий ступінь автофлюоресценції рослинних клітин за довжини хвилі збуджуючого випромінювання ФІТЦ часто маскує флюорохром. Причиною інтенсивної автофлюоресценції в тканинах рослин є високий вміст поліфенолів (флавоноїдів та інших пігментів) у клітинах. Автофлюоресценція може значно зменшитися, якщо мікроскопічне спостереження здійснюється на хвилях більшої довжини. Тому у деяких випадках для мічення антитіл як флюорохром використовують переважно ТРІТЦ.

Ферментні маркери для локалізації антигенів рослинних тканин застосовують рідше, тому що ферменти, із яких утворюються мічені антитіла, часто входять до складу клітин рослин, і це викликає потребу усунення їх активності перед етапом візуального виявлення антитіла в препараті. Особливо широко використовують антитіла, мічені пероксидазою. У 1980 р. застосовано непрямий імунопероксидазний метод

виявлення ізоферменту целюлози, а для видалення ендогенної пероксидазної активності тканин рослин — оброблення кислим алкоголем. Після обробки препаратів рослинних тканин утворений комплекс з антитілом представлений антивидовим антитілом, міченим пероксидазою.

Іншим маркером антитіл є високомолекулярний білок феритин, що містить велику кількість заліза і колоїдного золота. Для локалізації реакцій антиген— антитіло у клітинах використовують комплекси протеїну А і золота. Метод полягає у фарбуванні ультратонких зрізів тканин рослин, що вміщаються в епоксидну смолу, і особливо цінний внаслідок рівномірного розподілення часток золота з великою електронною щільністю.

Локалізація антигенів рослин пов'язана з проблемами, спричиненими труднощами проникнення мічених антитіл у клітину. Слід зазначити, що суспензійні клітини із цілими клітинними стінками не дають змогу міченому антитілу проникнути в клітину. Проникнення мічених антитіл у клітину не створює проблем під час роботи з клітинами рослин, у яких попередньо повністю або частково зруйновано клітинні стінки, або з фрагментами плазматичної мембрани після осмотичного шоку, або з клітинами рослин, що підлягають іншому впливу для полегшення дифузії кон'югатів. Методи використання ультратонких зрізів дають змогу перебороти ці труднощі і забезпечити прямий доступ антитіл до певних місць локалізації антигенів у клітинах рослин.

Слід зазначити, що наведені методи можуть давати неточні результати.

Відзначалася перехресна імунологічна реакція, точну оцінку якої можуть дати високочутливі кількісні імуноаналітичні методи. Іншим джерелом помилкових реакцій є властивість імуноглобулінів реагувати з клітинними компонентами, що відрізняються від антигенів, до яких спрямована їх специфічність. Речовинами, що обумовлюють появлення артефактів у імунологічних реакціях рослинних тканин, є також лектини. Вони містяться в значній концентрації у багатьох тканинах і насінні, можуть зв'язувати сироватку кроликів, наприклад конканвалін.

*Серологічні та імунологічні тести.* Для виявлення в рослинах патогенів сьогодні застосовують різноманітні методи. Вже класичним є метод ELISA (Ensyme Linked Immunosorbent Assay), який широко застосовують у фітопатології і вірусології рослин. У 1971 р. методом ELISA вперше діагностована віспа слив, а пізніше й інші віруси плодових культур, виявлення яких особливо ускладнене внаслідок пригнічення

вірусів під час їх екстрагування з клітинного соку. Велике значення при використанні цього методу має спосіб збереження досліджуваного рослинного матеріалу.

Під час тестування рослинного матеріалу методом ELISA використовують спеціальні полівінілхлоридні камери з заглибленнями — плати. Також потрібно застосовувати антисироватку високої якості, із титром не менше 1:28 для визначеного патогену і не більш 1:4 — з нормальним білком. Тест можна виконати як з антисироватками з поліклональних антитіл, так і із сироватками, продукованими гібридомними клітинами. Із зразків антисироватки виділяють IgG-фракцію гама-глобуліну і маркірують ферментом за певною методикою (всього відомо кілька класів імуноглобулинів — IgM, IgG, IgA, IgE, IgD).

Послідовно у заглиблення плати нашаровують окремі компоненти, потрібні для проведення тесту. Варіант ELISA — подвійний сендвіч — у свій час широко використовувався для визначення ряду вірусних хвороб плодових культур, картоплі, винограду тощо.

Метод ELISA полягає в тому, що виділена IgG-фракція гама-глобуліну зі специфічної антисироватки в концентрації 0,5—1 мг/мл, розведена в 0.05М розчині карбонатного буфера, наноситься у всі заглиблення плат, інкубується певний час (частіше 240 хв за температури ЗО або 37 °С), після чого надлишки видаляються, а заглиблення тричі промивають фосфатно-буферним фізіологічним розчином, що містить поверхнево-активну речовину TWEEN-20. Другим компонентом є зразки, у яких потрібно визначити вірус, для якого отримана антисироватка (це може бути сік із листків, насіння, бульб, цибулин і навіть перенощиків вірусів — попелиць або нематод). До буферного розчину, як правило, додають розчини нікотину, альбуміну, сульфату натрію, діетилдитіокарбамату натрію й інших стабілізаторів. Екстракти розміщують за попередньо підготовленою схемою в кількох повторностях й інкубують протягом 12 год за температури 4 °С, після чого заглиблення тричі добре промивають фосфатним буфером.

Третім основним компонентом є мічений фермент IgG. Широко застосовують ферменти — лужна фосфатаза і пероксидаза. Останнє розбавлення маркірованого ферментом IgG або кон'югата визначається оптимізацією і проводиться у фосфатному буфері з додаванням 2 %-го альбуміну. Його інкубують 240 хв за температури 30 або 37 °С, після чого тричі промивають. Реакцію визначають за відповідним субстратом у

безбарвному буферному розчині. У разі позитивної реакції утворюється забарвлений продукт, що гідролізується у тих зразках, де відбулося зв'язування. Крім візуального обліку проводять і фотометричний метод, при цьому щільність адсорбції пропорційна концентрації вірусів. Метод ELISA можна цілком автоматизувати. Він характеризується високою чутливістю, крім того, це порівняно дешевий тест. В Україні він застосовується для визначення вірусних хвороб винограду, гвоздики, картоплі і тощо.

*Використання моноклональних антитіл у рослинництві.* Моноклональні антитіла успішно використовують під час аналізу найважливіших сільськогосподарських культур. З цього погляду рослинні білки можна розглядати як серію антигенів, з якими зв'язуються специфічні антитіла.

Моноклональні антитіла використовують у імуноцитохімії для локалізації, зокрема рецепторів ауксину, фітохрому і цитокінінів, а також антигенів плазмових мембран.

Відомо, що патогени рослин (віруси, бактерії, гриби, мікоплазми і нематоди) щороку завдають великої економічної шкоди сільському господарству. Для запобігання поширення хвороб рослин розроблені національні і міжнародні сертифікати і карантинні програми. Для ідентифікації патогенів використовують діагностичні тести, основані на антитілах. Застосування діагностичних тестів на основі поліклональних сироваток обмежується їх недостатньою специфічністю, не завжди достатнім рівнем відтворення, відсутністю потрібних реагентів. Тому зусилля вчених спрямовувались на створення моноклональних антитіл для різноманітних груп вірусів, бактеріального раку цитрусових, грибних хвороб та ін.

Оскільки моноклональні антитіла розпізнають лише одиничну антигенну детермінанту, то вони не взаємодіють з іншими білками рослини-хазяїна. Це дуже важливо для вірусів, тому що вони порівняно важко піддаються очищенню.

Вірус жовтої карликовості ячменю може бути прикладом такого вірусу.

Існує кілька штамів вірусу, кожний з яких характеризується різноманітними антигенними властивостями. Створено моноклональні антитіла, що взаємодіють із специфічним акцептором лише певного штаму вірусу або із загальними детермінантами всіх штамів. Моноклональні

антитіла можуть бути використані для ідентифікації специфічних штамів вірусу, що важливо в тих випадках, коли відомо, який вірус особливо шкідливий.

Високий ступінь специфічності обмежує ідентифікацію комплексних патогенів рослин, таких, як бактерії і гриби, тому що кількість різноманітних акцепторів у цих патогенів може бути значною. У цьому випадку для діагностики віддається перевага моноклональним антитілам, що розпізнають загальний антигенний акцептор у всіх ізолятів виду. На сьогодні використання моноклональних антитіл для тестування бактерій, грибів й інших патогенів рослин значно відстає від їх застосування в діагностиці рослинних вірусів.

Вдосконалення методів експрес-діагностики хвороб рослин із застосуванням моноклональних антитіл усе ще не досягло такого рівня, коли їх можна використовувати для попередження і профілактики хвороб рослин.

Найбільш наочні приклади використання технології моноклональних антитіл — ідентифікація й ізоляція антигенів, що застосовуються для вакцинації від інфекційних хвороб. Шляхи використання моноклональних антитіл для ідентифікації захисних антигенів відрізняються залежно від інфекційного чинника.

Особливо цінні моноклональні антитіла, які використовують для очищення білків, алкалоїдів й інших речовин, їх застосовують як у медицині, так і в сільському господарстві. Речовину, що потрібно очистити від домішок, пропускають через колонку з імобілізованими моноклональними антитілами для взаємодії (зв'язування), у той час як домішки вільно проходять через колонку.

Такий зв'язок має зворотний характер, зв'язані молекули звільняються за допомогою спеціальних, але дуже простих методів, і збираються в колонку.

Заслуговує на увагу можливість зв'язування флюоресцентно мічених моноклональних антитіл із визначеним видом клітин. Таку суміш пропускають через проточний флюороцитометр, що дає змогу сортувати мічені популяції клітин із достатньо високою швидкістю (50 тис. клітин за 1 хв).

Застосування технологій рекомбінантних ДНК і моноклональних антитіл дає змогу діагностувати патогени. Методи рекомбінантних ДНК використовують для одержання молекул антитіл у клітинах бактерій. У

такий спосіб можна перебороти гібридомну нестабільність, пов'язану з отриманням моноклональних антитіл у мишей або в культурі тканин, що значно збільшило б рентабельність їх виробництва.

*Молекулярно-генетичні маркери.* Ферменти використовують як маркери у культурі тканин і генетиці соматичних клітин, зокрема, для з'ясування проблем, пов'язаних з укоріненням і вітрифікацією мікроклонів; для виявлення гібридної природи нових форм після використання ембріокультури і соматичної гібридизації; сомаклонального варіювання і клітинного мутагенезу, а також причин, що зумовлюють ембріогенний і неембріогенний розвиток гаметофіта або соматичних тканин; у дослідженні моносомних ліній, отриманих внаслідок віддаленої гібридизації; вивченні диференціальної експресії генів в онтогенезі тощо. Так, порівнянням спектрів ізоферментів, наприклад естерази та пероксидази, у вихідних органах цілісних рослин, в недиференційованих калюсних тканинах різних за терміном культивування in vitro та в диференційованих тканинах рослин-регенерантів, було встановлено таке. У первинному калюсі і в субкультивованих калюсних тканинах утворюється максимальна кількість ізозимів вивчених ферментів, а в листках, стеблах або коренях цілої рослини спектр ізозимів звужується. Тобто під час диференціювання репресується синтез деяких ізоферментів.

Відомо, що поліморфні запасні білки (зеїни, гордеїни, глобуліни та ін.) широко використовують в селекційних дослідженнях генетичні маркери для характеристики генотипів, сортів, гібридів, гібридних поколінь. Їх особливості полягають в тому, що в електрофоретичному спектрі одна смуга — це, як правило, продукт експресії одного гена. Звідси зміни електрофоретичного спектра відображають генетичні зміни, тобто зміни цього гена (генів), в тому числі зміни в його експресії. За останні роки такі білки слугують біохімічними маркерами під час вивчення ряду процесів в культурі in vitro і генетичній інженерії в цілому.

Наприклад, експресію 7S і 11S запасних білків глобулінів досліджували у соматичних зародках люцерни. Зроблено висновок, що існує позитивна кореляція між стадіями розвитку зародків і накопиченням певних запасних білків, що дає змогу передбачати окремі фази розвитку, пов'язані з дозріванням ембріоїдів.

Кількість накопичених запасних білків може бути показником процесів розвитку, оскільки кількість 11S запасних білків у соматичних зародках порівняно із зиготичними зменшується.

У процесі дослідження білків насіння ялини (Picea glauca) встановлена тісна залежність між ембріогенною здатністю калюсних тканин і вмістом запасних білків. Роботи з вивчення накопичення запасних білків у соматичних зародках, отриманих культивуванням in vitro мікроспор ріпаку, показали збільшення накопичення певних білків у період фази «торпеда».

Подібність білкового складу соматичних і зиготичних зародків дає змогу використовувати зародки з мікроспор у дослідженнях з біохімії і генетичної регуляції процесів, що відбуваються в насінні рослини.

Проте генетичні маркери на рівні білків у разі вирішення деяких проблем мають істотні обмеження:

- більшість білків, що легко ідентифікуються, не мають внутрішньовидового поліморфізму (поліморфні локуси є скоріше виключенням, а не правилом);

- ідентифікація алелей потребує значної кількості матеріалу;

- багато білків є продуктами об'єднання кількох субодиниць, які іноді важко розділити;

- значна кількість ферментативних білків змінюється протягом онтогенезу.

Крім того, аналіз білків виявляє зміни лише в тих послідовностях ДНК, які кодують білки та продукти тільки діючих (працюючих) генів. Оскільки значна частка геному представлена повторюваними послідовностями, а гени містять інтрони, ці складові (понад 90 % геному) не виявляються аналізом білкового поліморфізму. Неможливо ідентифікувати також функціональні ділянки генів (промотори та енхансери). В результаті деяких амінокислотних змін не змінюється сумарний заряд або конфігурація білкової молекули, внаслідок чого лельні варіанти також не виявляються електрофорезом білків за умови зниженої роздільної здатності.

Тому білкові маркери використовують головним чином у разі вивчення експресії чужорідних генів. Перспективнішим є використання поліморфних послідовностей нуклеотидів у молекулі ДНК.

*ДНК-зонди.* Здатність зондів розпізнавати специфічні ДНК-послідовності і зв'язуватись з ними може стимулювати розроблення додаткового методу, що полягає у приєднанні до зондів інших компонентів. Ці компоненти можуть викликати мутації в ділянці зв'язування послідовності ДНК із зондом, що створює передумови для

контролю генних функцій. Внаслідок цих властивостей ДНК-зонди використовують в селекції рослин і тварин.

Перший крок в ідентифікації генів чи послідовностей, відповідних специфічному зонду, полягає у подрібненні ДНК геному, що досліджується, на фрагменти, зручні для подальшої роботи. Бажано, щоб ген знаходився в якомога меншій кількості фрагментів ДНК (в ідеальному випадку — лише в одному).

Максимальна довжина фрагментів геному, які можна досліджувати, знаходиться в межах 15—20 т. п. н. Іноді неможливо отримати ген у вигляді одного фрагмента, тоді для визначення його структури необхідно узагальнити дані, отримані в результаті аналізу його різних фрагментів.

Для фрагментації досліджуваного геному (ДНК) використовують два методи: розщеплення ендонуклеазами рестрикції (рестриктазами) і механічне подрібнення ДНК ультразвуком або іншим способом. У першому випадку кожний фрагмент ДНК закінчується сайтом пізнавання відповідної рестриктази, в другому — місця розривів є випадковими.

Розподіл сайтів рестрикції вздовж молекули ДНК носить випадковий характер, тому внаслідок обробки ДНК рестриктазами виникає багато фрагментів. Після електрофорезу в гелі ці фрагменти утворюють пляму, в якій не розрізняються окремі смуги, за винятком деяких із них, що відповідають певним повторюваним послідовностям ДНК.

Наявність досліджуваної послідовності в плямі можна виявити за допомогою специфічного зонда. Для цього ДНК денатурують в агарозному гелі (найчастіше лугом і нагріванням) для утворення одноланцюгових фрагментів. Денатуровану (одноланцюгову) ДНК переносять на нітроцелюлозний (інколи нейлоновий або інший) фільтр, де одноланцюгові фрагменти імобілізуються. Процес перенесення фрагментів ДНК з агару на целюлозу нагадує промоконня (від англ. — blotting), тому цей метод відомий під назвою блотинга за Саузерном (за прізвищем автора методу). Агарозний гель розміщують на фільтрувальному папері, змоченому концентрованим розчином солі. Потім на гель кладуть нітроцелюлозний фільтр і зверху — сухий фільтрувальний папір, який поглинає сольовий розчин. Останній проходить крізь агарозний гель, а потім крізь нітроцелюлозний фільтр. ДНК переноситься разом із розчином, але затримується (міцно зв'язується) нітроцелюлозою. Імобілізовану нітроцелюлозним фільтром досліджувану послідовність ДНК можна гібридизувати in situ зі специфічним радіоактивним зондом (теж

одноланцюговим), а потім виявити методом радіоавтографії. Кожна гомологічна зондові послідовність виявляється у вигляді радіоактивної смуги. Місце знаходження останньої залежить від розміру шуканого фрагмента ДНК.

За останні роки розроблено чутливіші ферментні і флюоресцентні методи визначення кількості з гібридизованої ДНК.

**Послідовність методичних процедур при виконанні блотингу за Саузерном**

*Картування геному.* Картування геному – це визначення положення гена на будь-якій хромосомі відносно інших генів. Для картування застосовують три головні методи:

- фізичне картування за допомогою рестрикційних карт довгих фрагментів ДНК, що перекриваються;
- генетичне картування, що ґрунтується на визначенні частоти рекомбінації між генами в мейозі;
- цитогенетичне картування, в основу якого покладено методи гібридизації in situ, отримання моносомних клітинних гібридів, делеційний метод.

Ці методи детально розглядаються в відповідних розділах курсу генетики.

Наслідком таких досліджень є розробка генетичних карт, що є схематичним зображенням відносного розташування генів, що належать до однієї пари гомологічних хромосом (до однієї групи зчеплення). На сьогодні вже складено генетичні карти більшості найважливіших с.-г. рослин (рису, кукурудзи, томатів).

Побудова генетичних карт є одним з актуальних завдань сучасної генетики та молекулярної біології, передбачає використання молекулярно-генетичних маркерів, кількістю яких визначається роздільна здатність,

тобто визначення максимально точного місцерозташування гена.

Побудова карт на основі генетичних маркерів розпочалась у 80-ті роки XX ст. з використанням поліморфізму білків (запасних білків, ізоферментів).

Застосування цих маркерів дає змогу ідентифікувати генотипи пшениці, ячменю, вівса, соняшнику, картоплі, цукрових буряків, визначати в популяціях рослин (сортів) індивідуальні рослини, їх генотипи.

Проте можливість використання білкових маркерів обмежена багатьма причинами, а саме: порівняно невеликим поліморфізмом білкових маркерів; часто неможливістю виявлення невеликих змін у білках, що не змінює їхньої електрофоретичної рухливості; ідентифікація поліморфізму білків лише тих генів, які експресують в момент аналізу.

З 90-х років широко застосовують методи аналізу поліморфізму ДНК.

Молекулярно-генетичні методи полегшують первинну ідентифікацію, яка в подальшому потребує проведення поліфазного таксономічного аналізу.

Поряд із дослідженням геному, останній передбачає вивчення:

- морфології та ультраструктури;
- потреби в факторах росту та живлення елементів;
- фізіолого-біохімічних особливостей метаболічних процесів;
- білкового поліморфізму;
- амінокислотного складу.

Проте найважливіша функція колекцій та банків — слугувати джерелом вихідного матеріалу для біотехнологій.

***Завдання***

1. Що таке антигени?
2. Метод ідентифікації антигенів у тканинах рослин.
3. Одержання антитіл.
4. Мічення антитіл.
5. Серологічні та імунологічні тести.
6. Використання моноклональних антитіл у рослинництві.
7. Для чого використовують ферменти, як маркери у культурі тканин і генетиці соматичних клітин.
8. Для чого використовують поліморфні запасні білки.
9. Застосування ДНК-зондів.
10. Що таке метод блотинга за Саузерном?
11. Що таке картування геному?

# ТЕМА 23: ТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

***Мета:*** вивчення технологічних прийомів промислової біотехнології

## *Теоретична частина*

Біотехнологічні об'єкти знаходяться на різних щаблях організації:

а) субклітинні структури (віруси, плазміди, ДНК мітохондрій і хлоропластів, ядерна ДНК);

б) бактерії і ціанобактерії;

в) гриби;

г) водорості;

д) найпростіші;

е) культури клітин рослин і тварин;

ж) рослини - нижчі і вищі.

### *Бактерії і ціанобактерії*

Мікроорганізмів, які синтезують продукти або здійснюють реакції, корисні для людини, кілька сотень видів. Біотехнологічні функції бактерій різноманітні. Бактерії використовуються при виробництві:

- харчових продуктів, наприклад, оцту (Gluconobacter suboxidans), молочнокислих напоїв (Lactobacillus, Leuconostoc) і ін .;
- мікробних інсектицидів (Bacillus thuringiensis);
- білка (Methylomonas);
- вітамінів (Clostridium - рибофлавін);
- розчинників і органічних кислот;
- біогазу та фотоводень.

Корисні бактерії відносяться до еубактеріям. Оцтовокислі бактерії, представлені родами Gluconobacter і Acetobacter, - це грамнегативнібактерії, здатні перетворювати етанол в оцтову кислоту, а оцтову кислоту в вуглекислий газ і воду. Рід Bacillus відноситься до грампозитивних бактерій, які здатні утворювати ендоспори і мають перитрихиально жгутикования. B.subtilis - строгий аероб, а B.thuringiensis може жити і в анаеробних умовах. Анаеробні, що утворюють спори бактерії представлені родом Clostridium. C.acetobutylicum зброжує цукру в ацетон, етанол, ізопропанол і n-бутанол (ацетобутаноловое бродіння), інші види можуть також зброджувати крохмаль, пектин та різні азотовмісні сполуки.

До молочнокислим бактеріям відносяться представники родів Lactobacillus, Leuconostoc і Streptococcus, які не утворюють спор, грамположительни і нечутливі до кисню. Гетероферментативні молочнокислі бактерії роду Leuconostoc перетворюють вуглеводи в молочну кислоту, етанол і вуглекислий газ. Гомоферментативное молочнокислі бактерії роду Streptococcus продукують тільки молочну кислоту, а бродіння, здійснюване представниками роду Lactobacillus, дозволяє отримати поряд з молочною кислотою ряд різноманітних продуктів.

До бактеріям роду Corynebacterium, нерухомі грампозитивні клітини яких не утворюють ендоспори, відносяться патогенні (C.diphtheriae, C.tuberculosis) і непатогенні грунтові види, що мають промислове значення. C.glutamicum служить джерелом лізину і поліпшують смак нуклеотидів. Коринебактерії хоча і вважаються факультативними анаеробами, краще ростуть аеробно. Бактерії використовуються для мікробного вилуговування руд і утилізації гірничорудних відходів.

Широко використовується така властивість деяких бактерій, як діазотрофних, тобто здатність до фіксації атмосферного азоту.

Виділяють 2 великі групи діазотрофи:

- симбіонти: без кореневих бульбочок (азотобактер - лишайники, азоспіріллум - лишайники, Анаб - лишайники, азолла), з кореневим бульбами (бобові - ризобії, вільха, лох, обліпиха - актиноміцети);

- вільноживуі: гетеротрофи (азотобактер, клостридиум, метілобактер), автотрофи (хлоробіум, родоспіріллум і амебобактер).

Мікробні клітини використовують для трансформації речовин.

Бактерії також широко використовуються в генно-інженерних маніпуляціях при створенні геномних клонотекі, введення генів у рослинні клітини (агробактерії).

Виробничі штами мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам: здатність до зростання на дешевих поживних середовищах, висока швидкість росту і освіти цільового продукту, мінімальне утворення побічних продуктів, стабільність продуцента щодо виробничих властивостей, нешкідливість продуцента і цільового продукту для людини і навколишнього середовища. У зв'язку з цим все мікроорганізми, використовувані в промисловості проходять тривалі випробування на нешкідливість для людей, тварин і навколишнього середовища. Важливою

властивістю продуцента є стійкість до інфекції, що важливо для підтримки стерильності, і фагостійкості.

Всі ціанобактерії мають здатність до азотфіксації, що робить їх дуже перспективними продуцентами білка. Анаб (Anabaena) – нитчасті синьо-зелені водорості. Нитки з більш-менш округлих клітин, містять гетероцисти і іноді великі суперечки, по всій довжині нитка однакової товщини. У цитоплазмі клітин відкладається близький до глікогену запасний продукт - анабенін. Такі представники ціанобактерій, як носток, спіруліна, тріходесміум їстівні і безпосередньо вживаються в їжу. Носток утворює на безплідних землях скоринки, які розбухають при зволоженні. В Японії місцеве населення використовує в їжу пласти ностока, що утворюються на схилах вулкана і називає їх ячмінним хлібом Тенгу (Тенгу - добрий гірський дух).

Свою ходу спіруліна (Spirulina platensis) почала з Африки - населення району озера Чад давно вживає її в їжу, називаючи цей продукт «діхе». Інше місце, звідки почала поширюватися спіруліна, але іншого виду (Spirulina maxima) - води озера Тескоко в Мексиці. Ще ацтеки збирали з поверхні озер і вживали в їжу слизову масу синьо-зеленої водорості спіруліни. Вперше галети "текуітлатл" згадані іспанцем Кастільо в 1521 р. Ці галети продавалися на базарі в Мехіко і складалися з висушених шарів S.maxima. У 1964 році бельгійський ботанік Ж.Леонар звернув увагу на галети синьо-зеленого кольору, які місцеве населення виготовляло з водоростей, що ростуть в лужних ставках навколо озера Чад. Ці галети представляли собою висушену масу спіруліни. Аналіз зразків Spirulina показав, що в ній міститься 65% білків (більше, ніж в соєвих бобах), 19% вуглеводів, 6% пігментів, 4% ліпідів, 3% волокон і 3% золи. Для білків цієї водорості характерно збалансований вміст амінокислот. Клітинна стінка цієї водорості добре перетравлюється. Як озеро Тескоко, так і водойми району озера Чад мають в воді дуже високий вміст лугів. Характерно, що в таких озерах спіруліна повністю домінує і зростає майже як монокультура - складає в окремих озерах до 99% загальної кількості водоростей. Зростає спіруліна в лужному середовищі при pH аж до 11. Її збирають також з озер біля м Мехіко, отримуючи до 2 т сухого ваги біомаси водорості на добу, і ця продукція розсилається в США, Японію, Канаду. В інших країнах спіруліну культивують звичайно в штучних водоймах або спеціальних ємностях. Спіруліну можна культивувати в відкритих ставках або, як в Італії, в замкнутій системі з поліетиленових

труб. Урожайність дуже висока: отримують до 20 г сухої маси водорості з 1 м2 в день, а розрахунки на рік показали, що вона перевищить вихід пшениці приблизно в 10 разів.

Переваги спіруліни в порівнянні з іншими їстівними водоростями не тільки в простоті культивування, але і в простоті збору біомаси, висушування її, наприклад, під сонцем. У ряді країн вирощують спіруліну виду Spirulina platensis. Нещодавно було показано, що в клітинах спіруліни, крім цінного білка, вуглеводів, ліпідів, вітамінів, в значних кількостях запасається, наприклад, таке цінне речовина, як полі-b-оксибутират. Вітчизняна фармацевтична промисловість випускає препарат «Сплат» на основі ціанобактерії Spirulina platensis. Він містить комплекс вітамінів і мікроелементів і застосовується як загальнозміцнюючий і іммуностимулюючий засіб.

***Гриби***

Біотехнологічні функції грибів різноманітні. Їх використовують для отримання таких продуктів, як:

- антибіотики (Пеницилл, стрептоміцети, цефалоспорини);
- гібереліни і цитокініни (фізаріум і ботритис);
- каротиноїди (н-р, астаксантин, що надає м'якоті лососевих риб червоно-помаранчевий відтінок виробляють Rhaffia rhodozima, яких додають в корм на рибозаводах);
- білок (Candida, Saccharomyces lipolitica);
- сири типу рокфор і камамбер (Пеницилл);
- соєвий соус (Aspergillus oryzae).

До грибів відносяться актиноміцети, дріжджі і цвілі. Справжні актиноміцети - строгі аероби, вони грам позитивні і не утворюють спор. Найбільш представницький в цій групі - рід Streptomyces, окремі види якого продукують широко застосовані антибіотики. При вирощуванні на твердих середовищах актиноміцети утворюють дуже тонкий міцелій з повітряними гіфами, які диференціюються в ланцюжки конідіоспор. Кожна конідіоспор здатна утворити мікроколонії.

Антибіотики продукує і інший вид актиноміцетів, Micromonospora, колонії якого позбавлені повітряних гіф і утворюють конідіоспор безпосередньо на міцелії.

З 500 відомих видів дріжджів першим люди навчилися використовувати Saccharomyces cerevisiae, цей вид найбільш інтенсивно культивується. До дріжджів, зброджують лактозу, відноситься

Kluyveromyces fragilis, який використовують для отримання спирту з сироватки. Saccharomycopsis lipolytica деградує вуглеводні і вживається для отримання білкової маси. Всі три види належать до класу аскоміцетів. Інші корисні види відносяться до класу дейтероміцетів (недосконалих грибів), так як вони розмножуються статевим шляхом, а брунькуванням. Candida utilis зростає в сульфітних стічних водах (відходи паперової промисловості). Trichosporon cutaneum, окисляє численні органічні сполуки, включаючи деякі токсичні (наприклад, фенол), грає важливу роль в системах аеробного переробки стоків. Phaffia rhodozyma синтезує астаксантин - каротиноид, який надає м'якоті форелі та лосося, вирощуваних на фермах, характерний помаранчевий або рожевий колір. Промислові дріжджі зазвичай не розмножуються статевим шляхом, не утворюють спор і поліплоїдні. Останнім властива їх сила і здатність адаптуватися до змін середовища культивування (в нормі ядро клітини S.cerevisiae містить 17 або 34 хромосоми, тобто клітини або гаплоїдні, або диплоїдні).

Цвілі викликають численні перетворення в твердих середовищах, які відбуваються перед бродінням. Їх наявністю пояснюється гідроліз рисового крохмалю при виробництві саке і гідроліз соєвих бобів, рису і солоду при отриманні їжі, що вживається в азіатських країнах. Харчові продукти на основі зброджених пліснявими грибами Rhizopus oligosporus соєвих бобів або пшениці містять в 5 - 7 разів більше таких вітамінів, як рибофлавін, нікотинова кислота) і відрізняються підвищеною в кілька разів вмістом білка. Цвілі також продукують ферменти, які використовуються в промисловості (амілази, пектиназу і т.д.), органічні кислоти і антибіотики. Їх застосовують і в виробництві сирів, наприклад, камамберу і рокфору.

Штучне вирощування грибів здатне внести і інший, не менш важливий внесок у справу забезпечення продовольством зростаючого населення земної кулі. Люди вживають гриби в їжу з глибокої давнини. Тому зробити гриби так само керованою сільськогосподарською культурою, як зернові злаки, овочі, фрукти, давно вже стало актуальним завданням. Найбільш легко піддаються штучному вирощуванню дерево розрушуючі гриби. Це пов'язано з особливостями їх біології, які стали нам відомі та зрозумілі тільки зараз. Їх здатність легко рости і плодоносити використовували з найдавніших часів.

Штучне розведення дерево розрушуючих грибів отримало досить широке поширення. Міцелій їстівних грибів можна вирощують на рідких

середовищах, наприклад на молочній сироватці і ін. В спеціальних ферментерах, в так званій глибинній культурі. Це повністю механізований і автоматизований процес. Так, в Інституті мікробіології Академії наук УРСР розроблені та апробовані в дослідному виробництві способи отримання білкових грибних препаратів даедаліна і пантегріна з міцелію дерево розрушуючих грибів дедалеопсіса бугристого і пілолістніка тигрового, з високим вмістом білка і біологічно активних речовин. За вмістом білка 1 кг цих препаратів еквівалентний 2 кг м'яса. За біологічної цінності білок цих препаратів не поступається рослинним і наближається до тваринних білків. Перетравлюваність білків даних препаратів становить понад 80%. В основі цього способу отримання харчового білка лежать отримані мікологами дані про те, що плодові тіла грибів та їх грибниця близькі за своїм хімічним складом і харчовою цінністю. Грибні білкові препарати даедалін і пантегрін рекомендовані в якості харчових добавок після відповідного медичного контролю. Дослідження в цьому напрямку тривають.

***Клас найпростіші***

Найпростіші відносяться до числа нетрадиційних об'єктів біотехнології. До недавнього часу вони використовувалися лише як компонент активного мулу при при біологічному очищенні стічних вод. В даний час вони привернули увагу дослідників як продуценти біологічно активних речовин.

Тому раціональніше використовувати вільноживучі найпростіші, що характеризуються різноманітними біосинтетичними можливостями і тому широко поширеними в природі.

Особливу екологічну нішу займають найпростіші, що мешкають в рубці жуйних тварин. Вони володіють ферментом целюлазою, що сприяє розкладанню клітковини в шлунку жуйних. Найпростіші рубця можуть бути джерелом цього цінного ферменту. Збудник американського трипаносомоза - Trypanosoma (Schizotrypanum cruzi) стала першим продуцентом протипухлинного препарату круцина (СРСР) і його аналога-тріпанози (Франція). Вивчаючи механізм дії цих препаратів, радянські вчені (Г. І. Роськин, Н. Г. Клюєва і їх співробітники), а також їх французькі колеги (Ж. Кудер, Ж. Мішель-Брен і ін.) Прийшли до висновку, що ці препарати надають цитотоксичний ефект при прямому контакті з пухлиною і пригнічують її опосередковано, шляхом стимуляції ретикулоендотеліальної системи. З'ясувалося, що Інгирі дія пов'язана з

жирнокислотного фракціями. Характерною особливістю цих організмів є високий вміст ненасичених жирних кислот, що становить у тріпаносомід 70-80%, а у Astasia longa (свободноживущий жгутиконосец) - 60% від суми всіх жирних кислот. У жгутіконосцев фосфоліпіди і поліненасичені жирні кислоти мають такий же склад і будова, як в організмі людини і тварин. У світі мікробів поліненасичені жирні кислоти не синтезуються, а багатоклітинні тварини або рослини являють собою більш обмежену сировинну базу, ніж найпростіші, культури яких можна отримувати методами біотехнології незалежно від пори року або кліматичних умов.

Оскільки ліпідний метаболізм найпростіших має відносну лабільність, були вивчені шляхи його регуляції. Застосування до найпростіших загальноприйнятого в мікробіології прийому підвищення біосинтезу ліпідів за рахунок зниження вмісту в середовищі джерела азоту і збільшення вмісту джерела вуглецю призвело до різкого гальмування або зупинки росту культур. Для створення умов спрямованого біосинтезу ліпідів в середовища для культивування жгутиконосців додавали попередники і стимулятори біосинтезу ліпідів: малонат, цитрат, сукцинат, цітідіннуклеотіди в поєднанні з певним режимом аерації.

Російські вчені отримали водорозчинний напівсинтетичний препарат - астазілід, що представляє собою комплекс ефірів сахарози і жирних кислот, попередньо виділених з A. longa. Для вивчення активності і механізму дії цього препарату були застосовані різні моделі: біслойно-ліпідні мембрани (БЛМ), моношарова культури нирки теляти і карциноми яєчника людини, імунокомпетентні клітини - перитонеальні макрофаги. Було встановлено, що астазілід викликає збільшення провідності, поверхневого натягу, а також зменшення електромеханічної стабільності БЛМ.

Отримані дані дозволяють припускати, що в основі фізіологічних ефектів препарату лежить його значна мембраноактивна дія. Астазілід проявляє м'які детергентні властивості. Можливо, що збільшення провідності і деяка дестабілізація клегочних мембран відкривають шлях для проникнення всередину клітини Ca2+ та інших іонів, що грають ключову роль в регуляції метаболізму. При вивченні дії астазіліда на культуру клітин нирки теляти було встановлено, що препарат збільшує мітотичний індекс клітин, знижує їх поліморфізм, покращує адгезивні властивості культури, забезпечує більш щільне зчеплення з субстратом і посилення міжклітинних контактів.

Препарат не мав прямої цитотоксичної дії на культуру пухлинних клітин, а його протипухлинну дію, вивчено на 8 штамах перевиваємих пухлин мишей і щурів, реалізувалося через імунну систему. Астазілід діяв головним чином на клітинну ланку імунітету, викликаючи підвищення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів, збільшення здатності індукувати розвиток гіперчутливості сповільненого типу і деяких інших показників. Препарат попереджав загибель 60-80% тварин, заражених бактеріальними інфекціями (E. coli, Ps. Aerugenosa). Іншою групою біологічно активних речовин найпростіших є полісахариди.

Різноманітність полісахаридів, синтезованих найпростішими, досить велике. Особливий інтерес представляє парамілон, характерний для евгленоїдних жгутоконосців. Представники родів Astasia і Euglena здатні до сверхсинтезу парамілона, що становить понад 50% сухого залишку клітин. Цей полісахарид вивчається як стимулятор імунної системи ссавців. У наших дослідах парамілон A. longa володів вираженим протипухлинним ефектом. Діючи опосередковано через імунну систему, парамілон гальмує зростання саркоми 180 на 60% і знижує щеплення аденокарциноми Ерліха. Аденокарцинома Ерліха взагалі не робила щеплення у 50- 60% мишей, яким профілактично був введений парамілон в дозах 3 і 30 мг / кг ваги тварини. Парамілон, виділений з A. longa, практично нетоксичний. Виражену імуномодулюючу дію і низька токсичність цього препарату є передумовою для його поглибленого дослідження в поєднанні з препаратами прямого протипухлинної дії, радіотерапією та іншими ад'ювантами.

В даний час в світі надається велике значення виробництву глюканів не тільки для медичних цілей, але і для харчової та текстильної промисловості. До сих пір глюкани отримували з культур бактерій або морських водоростей.

***Водорості***

Водорості використовуються, в основному, для отримання білка. Дуже перспективні в цьому відношенні і культури одноклітинних водоростей, зокрема високопродуктивних штамів роду Chlorella і Scenedesmus. Їх біомаса після відповідної обробки використовується в якості добавки в раціони худоби, а також в харчових цілях.

Одноклітинні водорості вирощують в умовах м'якого теплого клімату (Середня Азія, Крим) у відкритих басейнах зі спеціальною живильним середовищем. Наприклад, за теплий період року (6-8 місяців)

можна отримати 50-60 т біомаси хлорели з 1 га, тоді як одна з найбільш високопродуктивних трав - люцерна дає з тієї ж площі тільки 15- 20 т врожаю.

Хлорела містить близько 50% білка, а люцерна - лише 18%. В цілому в перерахунку на 1 га хлорелла утворює 20-30 т чистого білка, а люцерна - 2-3,5 т. Крім того, хлорелла містить 40% вуглеводів, 7-10% жирів, вітаміни А (в 20 разів більше), В2, К, РР і багато мікроелементів. Варіюючи склад живильного середовища, можна процеси біосинтезу в клітинах хлорели зрушити в бік накопичення або білків, або вуглеводів, а також активувати утворення тих чи інших вітамінів.

При завоюванні племен майя місіонерами описувався випадок, коли іспанці близько півтора років облягали фортецю на вершині гори. Природно, що всі продукти давно повинні були закінчитися, проте фортеця не здавалася. Коли ж вона була нарешті взята, то іспанці з подивом побачили в ній невеликі ставки, де культивувалися одноклітинні водорості, з яких індіанці готували особливий сир. Іспанці спробували його і знайшли вельми приємним на смак. Однак це було вже після того, як іспанці знищили всіх захисників і секрет племені був загублений. У наш час робилися спроби визначити цей вид водоростей, з яких готувався сир, але вони не увінчалися успіхом.

У їжу вживають не менше 100 видів макрофітних водоростей як в країнах Європи і Америки, так і особливо на Сході. З них готують багато різноманітних страв, в тому числі дієтичних, салатів, приправ. Їх подають у вигляді зацукрованих шматочків, своєрідних цукерок, з них варять варення, роблять желе, добавки до тесту і багато іншого. У магазині можна купити консерви з морської капусти - ламінарії далекосхідних або північних морів. Її консервують з м'ясом, рибою, овочами, рисом, вживають при приготуванні супів і ін. Вона поряд з мікроводоростей хлорела є найпопулярнішою їстівної і кормової водорістю.

Відомі й інші їстівні макрофітние водорості - ульва, з якої роблять різні зелені салати, а також Алар, порфіру, родіменія, Хондрус, ундарія і ін. В Японії продукти, одержувані з ламінарієвих, називають «комбу», і для того, щоб їх смачно приготувати, існує більше десятка способів.

В цілому ряді країн водорості використовують як вельми корисну вітамінну добавку до кормів для сільськогосподарських тварин. Їх додають до сіна або дають як самостійний корм для корів, коней, овець, кіз, домашньої птиці у Франції, Шотландії, Швеції, Норвегії, Ісландії, Японії,

Америці, Данії і на нашій Півночі. Тваринам згодовують у вигляді добавки також біомасу вирощуваних мікроводоростей (хлорела, сценедесмус, дуналіелла і ін.).

Гідролізати білка зеленої водорості Scenedesmus використовуються в медицині і косметичній промисловості. В Ізраїлі на досвідчених установках проводяться експерименти із зеленою одноклітинної водорості Dunaliella bardawil, яка синтезує гліцерин. Ця водорість відноситься до класу рівножгутикових і схожа на хламідомонад. Dunadiella може рости і розмножуватися в середовищі з широким діапазоном вмісту солі: і в воді океанів, і в майже насичених сольових розчинах Мертвого моря. Вона накопичує вільний гліцерин, щоб протидіяти несприятливому впливу високих концентрацій солей в середовищі, де вона росте. За оптимальних умов і високому вмісті солі на частку гліцерину припадає до 85% сухої маси клітин. Для росту цим водоростям необхідні: морська вода, вуглекислий газ і сонячне світло. Після переробки ці водорості можна використовувати як корм для тварин, так як у них немає нетравне клітинної оболонки, властивої іншим водоростям. Вони також містять значну кількість β-каротину. Таким чином, культивуючи цю водорість, можна отримувати гліцерин, пігмент і білок, що досить перспективно з економічної точки зору.

Поряд з кормами водорості давно застосовують в сільському господарстві в якості добрив. Біомаса збагачує грунт фосфором, калієм, йодом і значною кількістю мікроелементів, поповнює також її бактеріальну, в тому числі азотфіксуючу, мікрофлору. При цьому в грунті водорості розкладаються швидше, ніж гнойові добрива, і не засмічують її насінням бур'янів, личинками шкідливих комах, спорами фітопатогенних грибів.

Одним з найцінніших продуктів, одержуваних з червоних водоростей, є агар - полісахарид, присутній в їх оболонках і складається з агарози і агаропектіна. Кількість його доходить до 30-40% від ваги водоростей (водорості лауренція і грацилярія, гелідіум). Водорості - єдине джерело отримання агару, агароиде, каррагинин, альгинатов. У світі в 1980 р було отримано 7 тис. Т агару, 222 тис. Т альгинатов, 10 тис. Т каррагинин. У нашій країні основним джерелом агару служить червона водорість анфельція.

Бурі водорості є єдиним джерелом отримання одних з найцінніших речовин водоростей - солей альгінової кислоти, альгинатов. Альгінова

кислота - лінійний гетерополісахарид, побудований з пов'язаних залишків (З - Д-маннуроновой і α - L-гіулуроновой кислот.

Альгинати виключно широко застосовуються в народному господарстві. Це виготовлення високоякісних мастил для деталей, що труться машин, медичні та парфумерні мазі і креми, синтетичні волокна і пластики, стійкі до будь-якої погоди лакофарбові покриття, що не вицвітають з часом тканини, виробництво шовку, клеять речовин виключно сильної дії, будівельних матеріалів, харчові продукти відмінної якості - фруктові соки, консерви, морозиво, стабілізатори розчинів, брикетування палива, ливарне виробництво і багато іншого. Альгінат натрію - найбільш використовуваний з'єднання - здатний поглинати до 300 вагових одиниць води, утворюючи при цьому в'язкі розчини.

Бурі водорості багаті також вельми корисним з'єднанням - шестиатомний спиртом манітом, який з успіхом застосовують в харчовій промисловості, фармацевтиці, при виробництві паперу, фарб, вибухівки та ін. Бурі водорості найближчим часом планується використовувати для отримання біогазу. Калусних культури макрофітних водоростей можуть бути використані далі в різних напрямках. У разі, якщо вони отримані від агарофітов, можна безпосередньо отримувати з них агар.

Калусних культури харчових макрофітних водоростей, наприклад ламінарієвих, можуть в перспективі використовуватися для отримання білка, безпосередньо йде в їжу і в харчові добавки, а також в корму сільськогосподарським тваринам. Суспензійні культури макрофітних водоростей відкривають в перспективі можливості використання їх в якості трофічного ланки в марікультурі. Вони могли б також виступати в якості партнера в штучно створюваних рослинних асоціаціях, учасники яких мають корисними властивостями. Кошти, виділені клітинами культури екзометаболіти, характерні для початкового вигляду водорості, становитимуть основу трофічного обміну при вдалому підборі партнерів в рослинній асоціації або комплексі марікультури. Необхідно відзначити, що при відсутності токсичного і антагоністичної дії виділяються з'єднань в природних умовах існують різноманітні і численні природні асоціації, наприклад повсюдно зустрічаються комплекси водоростей і бактерій.

***Рослини***

Водна папороть азолла цінується як органічне азотне добриво, так як зростає в тісному симбіозі з синьо-зеленою водоростюі анабена. Це дозволяє симбіотичному організму Анабена-азолла накопичувати багато

азоту в вегетативній масі. Анабену-азоллу вирощують на рисових полях перед посівом рису, що дозволяє знижувати кількість внесених мінеральних добрив.

Представники сімейства ряскових (Lemnaceae) - найдрібніші і прості за будовою квіткові рослини, величина яких рідко перевищує 1 см. Ряскові – вільноживучі водні плаваючі рослини. Вегетативне тіло нагадує лист або слань нижчих рослин, тому до початку 18 століття ряску відносили до слоєвищних рослин.

В літературі зустрічається кілька назв тіла ряскових. Найвдаліше - дистець. Тіло ряскових - особлива структура, яка не диференційована на листя і стебло (листкогілка), що представляє зелену пластинку, іноді опуклу з нижньої сторони.

Ряскові (Lemna minor, L. trisulca, Wolfia, Spirodela polyrhiza) служать кормом для тварин, для качок та інших водоплавних птахів, риб, ондатри. Їх використовують і в свіжому, і в сухому вигляді як цінний білковий корм для свиней і домашньої птиці. Ряскова містять багато протеїну (до 45% від сухої маси). 45% вуглеводів, 5% жирів і інше - клітковина і т.д. Вони високо продуктивні, невибагливі в культурі, добре очищають воду і збагачують її киснем. Це робить Ряскових цінним об'єктом для морфогенетичних, фізіологічних і біохімічних досліджень.

***Завдання***

1. Бактерії, як об’єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.
2. Гриби, як об’єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.
3. Клас найпростіші, як об’єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.
4. Водорості, як об’єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.
5. Рослини, як об’єкти біотехнології і їх біотехнологічні функції.

## ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ

Роль біотехнології, як фундаментальної основи, у вирішенні завдань та розвитку селекції, насінництва тощо

Роль вітчизняних учених у розвитку біотехнології

Значення стерильності і контроль умов середовища у біотехнологічному виробництві

Використання біологічних об’єктів у біотехнологічному виробництві та вимоги до них

Мезанізм дії регуляторів росту рослин

Мета використання синтетичних регуляторів росту в сучасному рослинництві

Фактори впливу на ріст і розвиток калюсних та суспензійних культур

Практичне значення калюсних та суспензійних культур у біотехнології рослин

Роль фітогормонів у регуляції процесів регенерації рослин у культурі тканин

Значення регенераційних процесів в культурі клітин і тканин для селекції та біотехнології рослин

Значення мікроклонального розмноження для селекції, збереження та швидкого розмноження цінних сортів рослин

Фактори впливають на ефективність мікроклонального розмноження рослин

Сутність сомаклональної мінливості та яке її значення для селекції рослин

Переваги та обмеження використання клітинних біотехнологій у селекції рослин

Перспективи використання культури протопластів у селекції та біотехнології сільськогосподарських культур

Сутність злиття протопластів і яке його значення для клітинної інженерії рослин

Значення молекулярних методів у створенні нових сортів рослин і вдосконаленні сільськогосподарських культур

Значення рекомбінантної ДНК у розвитку біотехнології

Основні етапи створення генетично модифікованих рослин

Переваги та можливі ризики застосування генетично модифікованих рослин у сільському господарстві

Кріозбереження рослинного матеріалу та його значення для

збереження генетичних ресурсів рослин

Переваги та обмеження методу кріозбереження у біотехнології та селекції рослин

Напрями практичного використання біологічно активних речовин у сільському господарстві

Методи для одержання біологічно активних речовин за допомогою культур клітин і тканин рослин

Значення методів експрес-діагностики для контролю якості рослинного матеріалу та фітосанітарного стану посівів

Переваги та обмеження методів експрес-діагностики порівняно з традиційними методами аналізу

Основні екологічні ризики пов’язані із застосуванням біотехнологій у сільському господарстві

Екологічна безпека та основні чинники впливу на її забезпечення

Значення промислової біотехнології для сільського господарства

Фактори впливу на ефективність промислових біотехнологічних процесів

# ВИКОРИСТАНА ТА РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

## Основна

1. Сатарова Т.М., Абраімова О.Є., Вінніков А.І., Черенков А.В. Біотехнологія рослин: [навчальний посібник]. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.
2. Мацкевич В.В., Роговський С.В., Власенко М.Ю., Черняк В.М. Основи біотехнології рослин. Навчальний посібник. К.: Центр учбової літератури, 2010. 136 с.
3. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліновський М.І. Біотехнологія: Підручник. К.: Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
4. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Біотехнологія рослин. Навчальний посібник. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.
5. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: підручник для студ. вищ. навч. закладів. К.: Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.

## Допоміжна

6. Юлевич О.І., Ковтун С.І., Гиль М.І. Біотехнологія: навчальний посібник. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476 с.
7. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: підручник К.: НУХТ, 2009. 336 с.
8. Мусієнко М. М., Панюта О.О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. К.: Фітосоціоцентр, 2001. 47 с.
9. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основи біотехнології рослин. К., 2000. 248 с.
10. Рудишин С.Д. Основи біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 224 с.
11. Герасименко В.Г. Біотехнологічний словник: Пер. на укр. мову Ф.К. Ковальчук. К.: Вища школа, 1991.
12. Сидоров В.А. Біотехнологія рослин. Клітинна селекція. К., 1990. 280 с.
13. Левенко Б.А., Новак Т.В. Культура клітин і тканин в селекції основних сільськогосподарських культур. К., 1987. 40 с.
14. Глеба Ю.Ю., Ситник К.М. Клітинна інженерія рослин. К.: Наукова думка, 1984. 160 с.
15. Кравченко О.О., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Загальна біотехнологія: навчальний посібник. К.: ВПЦ «Київський університет», 2019. 269 с.
16. *Цилюрик О.І., Румбах М.Ю., Іжболдін О.О., Бондаренко О.В., Ноздріна Н.Л., Остапчук Я.В.* Вплив регуляторів росту на ріст і розвиток рослин соняшнику. Агроном. 2023. URL: https://surl.li/hreqeq
17. Ігнатенко О. Як сільськогосподарські практики впливають на довкілля та соціальний розвиток. *Інформаційний центр «Зелене досьє». 2020.* URL: https://lnk.ua/Ws9qWcN52

## Інтернет ресурси

1. https://ir.nmu.org.ua/bitstream/handle/123456789/2622/%D0%9D%D0%A2%D0%91453689.pdf?sequence=1
2. https://biocor-tech.com/blog/metody-biotehnologii
3. https://prombiotech.kpi.ua/vstup/info-spec/