

КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ РОСЛИННИЦТВА, ЕКОЛОГІЇ І
БІОТЕХНОЛОГІЙ

Мельничук М.Д., Кляченко О.Л.

БІОТЕХНОЛОГІЯ В АГРОСФЕРІ
Навчальний посібник

Київ - 2014

УДК 576:58:378.14 (073)

М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко

Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Київ, 2014. – 247 с.

Рецензенти:

Бойко А.Л., доктор біологічних наук, професор, академік НААН України;

Постоєнко В.О., доктор сільськогосподарських рослин;

Рідей Н.М., доктор педагогічних наук, професор

Рекомендовано до друку рішенням вченої ради Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол №__ від ____ 2014 року)

М.Д. Мельничук, О.Л. Кляченко

Біотехнологія а агросфері: Навчальний посібник. – К., 2014. – 245 с.

ISBN

В навчальному посібнику викладені теоретичні положення та найбільш поширені класичні сучасні модифіковані й уніфіковані методи і прийоми біотехнологічних робіт з культурними рослинами. Описані методи введення в культуру *in vitro*, мікроклонального розмноження, одержання калюсних культур, регенерації і адаптації *in vivo* рослин та технологічні генно-інженерні підходи. Наведені визначення і тлумачення найбільш вживаної термінології в біотехнології, дається огляд її історичного розвитку, а також використання стандартів у біотехнологічних дослідженнях.

Для студентів вищих навчальних закладів екологічних спеціальностей, наукових працівників, викладачів, аспірантів, які спеціалізуються в галузі екології, екобіотехнології, клітинної біології, генетики та фізіології рослин.

ЗМІСТ

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	
Розділ I. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки	
Біотехнологічна лабораторія: структура та обладнання.....	
Основні вимоги і правила безпеки у лабораторії біотехнології	
Розділ 2. Вплив мінеральних компонентів живильних середовищ на розвиток клітин	
Тема 1. Принципи та методи вирощування ізолюваних клітин і тканин рослин <i>in vitro</i>.....	
Робота 1. Методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильних середовищ та рослинного матеріалу.....	
Робота 2. Приготування маточних розчинів для середовища Мурасіге і Скуга (МС).....	
Робота 3. Стерилізація рідких середовищ пропусканням через бактеріальний фільтр (холодна стерилізація).....	
Робота 4. Приготування живильних середовищ для культивування ізолюваних клітин та тканин рослин.....	
Робота 5. Стерилізація насіння сої для отримання стерильних проростків.....	
Робота 6. Стерилізація коренеплодів моркви та бульб картоплі і введення їх в культуру <i>in vitro</i>	
Робота 7. Дослідження явища фізіологічної полярності.....	
Тема 2. Культура калюсної тканини.....	
Робота 8. Отримання і культивування калюсної тканини сої.....	
Робота 9. Перенесення (пасаж) калюсної тканини на свіже живильне середовище.....	
Робота 10. Отримання калюсної тканини з листків тютюну.....	
Робота 11. Отримання калюсів з незрілих зародків і вузлів кущування пшениці.....	
Робота 12. Отримання калюсів із корінців квасолі.....	
Тема 3. Облік ростових характеристик калюсної культури.....	
Робота 13. Підрахунок клітин за методом Брауна.....	
Робота 14. Пересадка калюсної тканини на свіже живильне середовище з різним складом гормонів.....	
Тема 4. Морфогенез і регенерація в культурі калюсних тканин. Одержання рослин – регенератів.....	
Робота 15. Індукція органогенезу в калюсній тканині картоплі.....	
Робота 16. Індукція стеблового органогенезу в культурі калюсної тканини томатів. Одержання рослин-регенератів (непрямий морфогенез)	

ЗМІСТ

Робота 17. Індукція соматичного ембріогенезу в калюсній тканині листків люцерни.....	
Тема 5. Суспензійна культура клітин.....	
Робота 18. Отримання суспензійної культури з калюсної тканини женьшеню, моркви, топінамбуру, гвоздики, томатів.....	
Робота 19. Оцінка життєздатності клітин і ступеню агрегації суспензії.....	
Робота 20. Визначення щільності суспензійної культури та оцінка її ростової активності.....	
Робота 21. Визначення ступеня агрегації і життєздатності клітинної суспензії.....	
Робота 22. Висів суспензій на тверде агаризоване середовище для отримання одноклітинних клонів.....	
Тема 6. Застосування методу культури тканин у селекції рослин (нетрадиційний метод селекції).....	
Робота 23. Селекція мутантів на рівні клітинних колоній. Висів суспензії на селективне живильне середовище.....	
Тема 7. Культура ізольованих протопластів.....	
Робота 24. Виділення та культивування протопластів (механічний метод).....	
Робота 25. Виділення та культивування протопластів (ферментативний метод).....	
Тема 8. Мікроклональне розмноження рослин.....	
Робота 26. Виділення і культивування апікальних меристем (гвоздики, картоплі, троянд, смородини).....	
Робота 27. Ізолювання і культивування апікальних меристем картоплі.....	
Робота 28. Отримання безвірусного посадкового матеріалу методом термотерапії в поєднанні з культивуванням апікальних меристем.....	
Робота 29. Отримання мікробульб картоплі <i>in vitro</i>	
Робота 30. Мікророзмноження гвоздики (картоплі) черенкуванням.....	
Робота 31. Індукція коренеутворення при мікроклональному розмноженні гербери.....	
Робота 32. Прискорене мікроклональне розмноження (гвоздики, смородини, картоплі).....	
Робота 33. Культивування рослин-регенерантів.....	
Робота 34. Облік ростових характеристик рослин-регенерантів.....	
Тема 9. Регулятори росту і розвитку рослин.....	
Робота 35. Ізольована тканина сої, як тест-система на цитокініни.....	
Робота 36. Ізольована культура тканини топінамбуру, як тест-система на ауксини.....	
Робота 37. Вплив ауксинів, цитокінінів та гіберелінів на ріст і розвиток	

ЗМІСТ

мікрочеренків стевії, картоплі, гвоздики.....	
Тема 10. Культура ізольованих клітин і тканин в селекції рослин	
Робота 38. Ріст і розвиток пиляків в культурі <i>in vitro</i> (андрогенез).....	
Робота 39. Одержання гаплоїдів з жіночого гаметофіту (гіногенез).....	
Робота 40. Ембріокультура.....	
РОЗДІЛ 3. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ	
Тема 11. Молекулярна біологія та генетична інженерія.....	
Робота 41. Приготування живильного середовища для культивування <i>A.tumefaciens</i>	
Робота 42. Трансформація рослинних клітин коренеплоду моркви під дією <i>A.tumefaciens</i> (природна генна інженерія)	
Робота 43. Трансформація рослинних клітин томатів під дією <i>A.tumefaciens</i>	
Робота 44. Трансформація рослинної клітини під дією Ті-плазмиди <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
Робота 45. Виділення ядерної ДНК з рослинних тканин.....	
Робота 46. Ампліфікація плазмиди.....	
Робота 47. Виділення плазмідної ДНК.....	
Робота 48. Виділення рослинної РНК.....	
Робота 49. Гель-електрофорез РНК.....	
Робота 50. Кількісне визначення ДНК або РНК.....	
Тема 12. Окисно-відновні ферменти.....	
Робота 51. Визначення активності пероксидази	
Робота 52. Вивчення електрофоретичного спектру пероксидаз.....	
Робота 53. Визначення активності поліфенолоксидази.....	
РОЗДІЛ 4. КОЛЕКЦІЇ ТА КРІОБАНКИ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР	
Тема 13. Кріозбереження рослинного матеріалу.....	
Робота 54. Вивчення захисної дії кріопротекторів на стійкість рослинних клітин до дії низьких температур.....	
Робота 55. Вплив кріопротекторів на білки цитоплазми рослинних клітин за дії негативних температур.....	
РОЗДІЛ 5. БІОБЕЗПЕКА І ДЕРЖАВНИЙ КОНТРОЛЬ	
Словник ключових термінів.....	
Історичні віхи розвитку біотехнології.....	
Перелік найуживаніших стандартів, що використовуються у лабораторній практиці із вивчення біотехнології в агросфері	
Література.....	
Додаток.....	

ПЕРЕДМОВА

Біотехнологія – напрямок в науці і технології, який виник в середині ХХ ст. і бурхливо розвивається в різних країнах світу та в Україні, як один із найбільш перспективних для подальшого розвитку різних виробництв, сільського господарства і медицини. Сучасний етап розвитку біотехнології пов'язаний з розробкою нових методів молекулярного клонування, клітинних технологій, їх впровадження в різноманітні напрямки біотехнології та проведення фундаментальних досліджень біологічних систем. Це пояснюється тим, що біологічні системи ефективно функціонують за умов невисокого тиску і температури, піддаються контролю і регулюванню їх активності. Вони компактні і не забруднюють довкілля завдяки тому, що можуть бути безвідходними. Крім того, певні організми здатні утилізувати різноманітні побічні продукти, що утворюються в процесі іншого виробництва.

Технологія рекомбінантних ДНК та клітинна біотехнологія – ефективний інструмент створення біологічних систем з новими заданими властивостями. Цей підхід відкриває принципово нові можливості для точної діагностики хвороб, дозволяє забезпечити значне підвищення врожайності сільськогосподарських культур шляхом створення рослин, стійких до шкідників та стресових факторів довкілля; одержання мікроорганізмів, що продукують різноманітні цінні сполуки (антибіотики, амінокислоти, ферменти); створення порід сільськогосподарських тварин з покращеними ознаками; переробку відходів, які забруднюють навколишнє середовище; переробку та модифікацію продуктів харчування і розробку біологічно активних добавок; вирішення проблем енергетики тощо.

Реалізація цих можливостей вимагає глибоких фундаментальних знань, залучення величезних матеріальних та інтелектуальних ресурсів. Розвиток біотехнології впливає на світогляд і, в майбутньому, може призвести до глибоких змін світогляду та етичних норм в суспільстві. Поки що залишається без відповіді такі важливі питання, як поведінка генетично модифіковані організми будуть в природному середовищі, етичність і правомірність використання технології рекомбінантних ДНК для людини, можливість руйнації традиційного сільського господарства з розвитком молекулярної біотехнології та ін. Наразі розробляються необхідні правила, інструкції, принципи використання біологічних знань в практичній діяльності людини, які спрямовані на безпечний розвиток біотехнології.

Головним завданням біотехнології в агросфері є використання біологічних процесів, систем та організмів в різних галузях і, перш за все, в сільському господарстві, які сприяють його інтенсифікації і перетворенню у високоефективну, конкурентоздатну, екологічно безпечну галузь. Першочергового значення при цьому набувають питання покращання біотехнологічними методами існуючих і створення нових високопродуктивних сортів культурних рослин та одержання корисних штамів мікроорганізмів.

ПЕРЕДМОВА

Визначальним фактором для розвитку цивілізації є стан біосфери, оскільки родючість ґрунтів, водний та повітряний басейни обумовлюють продуктивність всього рослинного покриву, тобто забезпечують планету органічними речовинами і киснем. Тому зростання аграрного і промислового виробництва при існуючих технологіях може призвести до незворотних порушень балансу в навколишньому середовищі, тобто до біосферної кризи. Інвайроментальна криза може мати великі планетарні наслідки, які призведуть до радикальних змін в прояві життя на планеті. Вирішення цієї проблеми можна досягнути тільки шляхом створення таких нових технологій, які дозволяють мати високий виробничий потенціал і не впливають на навколишнє середовище. До найбільш перспективних відносяться технології, що базуються на властивостях біологічних систем.

На новому етапі науково-технічної революції, спрямованої на багаторазове підвищення продуктивності праці, величезну економію ресурсів і поліпшення якості продукції підготовка фахівців повинна стати на рівень опанування науково-технічним процесом. Тому оволодіння теоретичною базою та практичними навиками роботи з культурою рослин *in vitro*, отримання стійких рослин до гербіцидів, патогенів і шкідників методами генетичної інженерії є необхідною умовою для формування висококваліфікованих спеціалістів в галузі екології. Сучасні спеціалісти, які працюють в сільському господарстві, в сфері АПК та інших галузях народного господарства повинні досконало володіти методами біотехнології і вміти використовувати їх для збільшення виробництва сільськогосподарської продукції, покращання її якості, захисту природи від забруднення і підвищення стійкості всього агропромислового виробництва.

До навчального посібника входять лабораторні роботи, які охоплюють основні розділи курсу біотехнології в агросфері. У кожній лабораторній роботі наведені мета і завдання дослідження, яким передують теоретичний матеріал, що значно розширює й поглиблює знання студента з цієї проблеми. В експериментальній частині наведено принцип методу, за яким виконується дослідження, хід роботи і формули для кількісних розрахунків. Виконання лабораторних робіт студентами буде сприяти кращому та більш глибокому засвоєнню теоретичного курсу. Наприкінці кожного розділу пропонуються контрольні запитання з даної теми. У навчальному посібнику запропоновані способи і довідковий матеріал з приготування окремих реактивів та буферних систем, міститься багато кольорових та чорно-білих ілюстрацій, значна більшість з яких виконана авторами.

Важливим є те, що в навчальному посібнику «Біотехнологія в агросфері» вперше наведені актуальні на даний час і на перспективу питання державного і світового значення про стандарти і стандартизацію в народному господарстві і, передусім, у біотехнологічних дослідженнях, що висвітлено у розділі «Перелік найуживаніших стандартів у біотехнологічній лабораторній практиці».

РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ – ЦЕНТРАЛЬНА ЛАНКА СУЧАСНОЇ НАУКИ

Біотехнологія – це наука про технології створення і використання біологічних об'єктів, що сприяють інтенсифікації виробництва або одержанню нових видів продуктів різного призначення на основі методів клітинної та генетичної інженерії. Біотехнологічне виробництво є складним комплексом біофізичних, біохімічних і фізико-хімічних процесів, в яких тісно взаємопов'язані виробництво і біологія. Застосування наукових досягнень у біотехнології тісно пов'язане з фундаментальними здобутками в області хімії, фізики, генетики, біохімії, фізіології рослин, молекулярної біології, мікробіології і здійснюється на найвищому рівні сучасної науки. Натепер визначилася іще одна важлива особливість розвитку окремих перспективних розділів біотехнології – необхідність тісного міжнародного співробітництва фахівців, учених і технологів. Яскравим прикладом є інтернаціональність найбільших міжнародних біотехнологічних компаній, заснованих за останні роки в світовій практиці.

Основні етапи розвитку біотехнології

Сучасна біотехнологія, як наука, виникла на початку 40-х років і почала інтенсивно розвиватись з 1953 р. після епохального відкриття Джеймса Уотсона і Френсіса Кріка хімічної структури і просторової організації подвійної спіралі молекули ДНК. Новий стратегічний її напрямок – генетична інженерія – виник у 1972 р., коли в лабораторії Поля Берга вперше була синтезована рекомбінантна молекула ДНК, що остаточно закріпило за біотехнологією і її центральною ланкою – біоінженерією - найважливіше місце в сучасній науці.

В 50-ті роки в біотехнології виник іще один важливий напрямок - клітинна інженерія, засновниками якого були П.Ф.Уайт (США) і Р.Готре (Франція). Генетична і клітинна інженерія визначили головні напрямки сучасної біотехнології, методи якої одержали широкий розвиток і застосування, починаючи з 80-тих років ХХ ст., і використовуються в багатьох галузях науки і виробництва в нашій країні і за рубежем.

Біотехнологія, як наука може розглядатись в двох часових і сутнісних вимірах: сучасному і традиційному, класичному. В традиційному, класичному розумінні біотехнологію можна визначити, як науку про методи і технології виробництва, транспортування, збереження і переробки сільськогосподарської та іншої продукції з використанням звичайних, нетрансгенних (природних і селекційних) рослин, тварин і мікроорганізмів в природних і штучних умовах. Людство використовувало біотехнологічні процеси ще багато тисяч років тому: займалися пивоварінням, пекли хліб, винайшли способи зберігання і переробки продуктів шляхом ферментації (виробництво сиру, оцту, соєвого соусу), навчилися робити мило з жирів, виготовляти найпростіші ліки і переробляти відходи.

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

Завдяки працям французького вченого Л. Пастера наприкінці XIX ст. були створені умови для розвитку прикладної (технічної) мікробіології, а також значною мірою й біотехнології. Було встановлено, що мікроорганізми відіграють ключову роль в процесах бродіння, а також різні їх види беруть участь в утворенні окремих продуктів. Це послужило на межі двох століть (XIX – XX) основою розвитку бродильного виробництва органічних розчинників (ацетону, етанолу, бутанолу, ізопропанолу) та інших хімічних речовин, де використовувалися різні види мікроорганізмів. Наступним важливим етапом у розвитку біотехнології господарсько-цінних речовин була організація промислового виробництва антибіотиків, основою якого стало відкриття в 1940 р. англійськими вченими А. Флемінгом, Х. Флорі та Э. Чейном хіміотерапевтичної активності пеніциліну. На сьогодні річний товарообіг в цій галузі становить близько 3,5 млрд. доларів.

В останні десятиліття широко застосовується переробка стоків в анаеробних умовах змішаною мікрофлорою, в результаті чого одночасно утворюється біогаз (він складається в основному з метану та CO₂). Цей спосіб енергетично високоефективний, дозволяє зберігати і концентрувати енергію, яка міститься в різних компонентах стоків (з газом регенерується більше 80% вільної енергії), а в сільській місцевості з його допомогою можна одержувати значну частину необхідної енергії. У розвинених країнах з високим споживанням енергії перетворення відходів у біогаз може покрити лише кілька відсотків енергетичних потреб. На окремих великих заводах з переробки відходів біогаз часто спалюють у теплових машинах, які пускають у хід електрогенератори. В останні роки створені також невеликі установки для переробки відходів сільського господарства.

Широке застосування одержало виробництво амінокислот в аеробних мікробіологічних процесах. В основному це глутамат натрію - підсилювач смаку (щорічне виробництво у світі становить близько 150 тис. т) і лізин (щорічне виробництво – 15 тис. т), який слугує харчовою добавкою. Щорічно у світі реалізується цієї амінокислоти на суму 1,75 млрд. доларів, більшу частину якої постачають японські виробники.

У промислових масштабах вже протягом багатьох десятиліть використовується здатність мікроорганізмів перетворювати рослинну біомасу з низьким вмістом білка в харчові продукти з високим його вмістом. Так, у Німеччині в період Першої світової війни вирощували дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, які додавали в ковбасу й супи, що компенсувало близько 60 % довоєнного імпорту харчових продуктів. Під час Другої світової війни здійснювали подібні процеси, але вже на основі харчових дріжджів *Candida arborea* і *Candida utilis*. В 60-х роках минулого століття деякі нафтові та хімічні компанії почали проводити дослідження з метою одержання з одноклітинних організмів білка, необхідного для додавання в їжу людині і тваринам. Деякою мірою це було пов'язано з нестачею в світі білкових продуктів. Як субстрати використовували нафту, метан, метанол і крохмаль. Найбільш

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

конкурентоздатними виявились технологічні процеси на основі метанолу й крохмалю. Основну масу отриманих продуктів додавали в корм тваринам.

Новітня сільськогосподарська біотехнологія – це наука про генно-інженерні і клітинні методи та технології створення і використання генетично трансформованих (модифікованих) рослин, тварин і мікроорганізмів з метою розширення їх різноманітності, інтенсифікації виробництва і одержання нових видів продуктів різного призначення. Вищим досягненням новітньої біотехнології є генетична трансформація - перенесення чужорідних (природних або штучно створених) донорних генів до клітин-реципієнтів вищих рослин, тварин і мікроорганізмів, одержання трансгенних організмів з новими або посиленими попередніми властивостями і ознаками. За своїми цілями і можливостями цей напрямок є стратегічним. Він дозволяє вирішувати принципово нові завдання зі створення рослин, тварин і мікроорганізмів з підвищеною стійкістю до стресових факторів середовища, високою продуктивністю і якістю продукції, оздоровленню екологічної обстановки в природі і всіх галузях виробництва. Для досягнення цієї мети необхідно подолати певні труднощі в підвищенні ефективності генетичної трансформації і, перш за все, в ідентифікації і клонуванні генів, створення їх банків, розшифруванні механізмів полігенної детермінації ознак і властивостей біологічних об'єктів, отриманні надійних векторних систем і забезпеченні високої стійкої експресії генів. У лабораторних умовах проводяться дослідження з одержання генетично модифікованих рослин, стійких до дії високих і низьких температур, засолення, впливу важких металів, гербіцидів, вірусів, а також рослин з підвищеним вмістом олій, незамінних амінокислот, удосконаленими декоративними характеристиками тощо. Більш ніж у 30 країнах світу проведено понад 3 тис. дослідів з генетично модифікованими рослинами, які належать до широкого спектра родин.

Клітинна біотехнологія, заснована на унікальній властивості клітин – їх тотипотентності, здатності до регенерації цілого організму, а також продукуванні ними найбільш важливих сполук вторинного синтезу, забезпечила прискорене одержання нових цінних форм і ліній сільськогосподарських рослин, які використовуються в селекції на стійкість, продуктивність і якість; розмноження цінних генотипів; оздоровлення рослин від вірусів і віроїдів, одержання біологічно препаратів харчового, кормового і медичного призначення. Потужний спалах біотехнологічних досліджень в світовій науці відноситься до 80-х років, коли нові методологічні і методичні підходи забезпечили перехід до ефективного їх використання в науці і практиці і виникла реальна можливість досягнення завдяки цьому великого економічного ефекту. У промисловому масштабі біотехнологія – це біоіндустрія (рис. 1.).

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

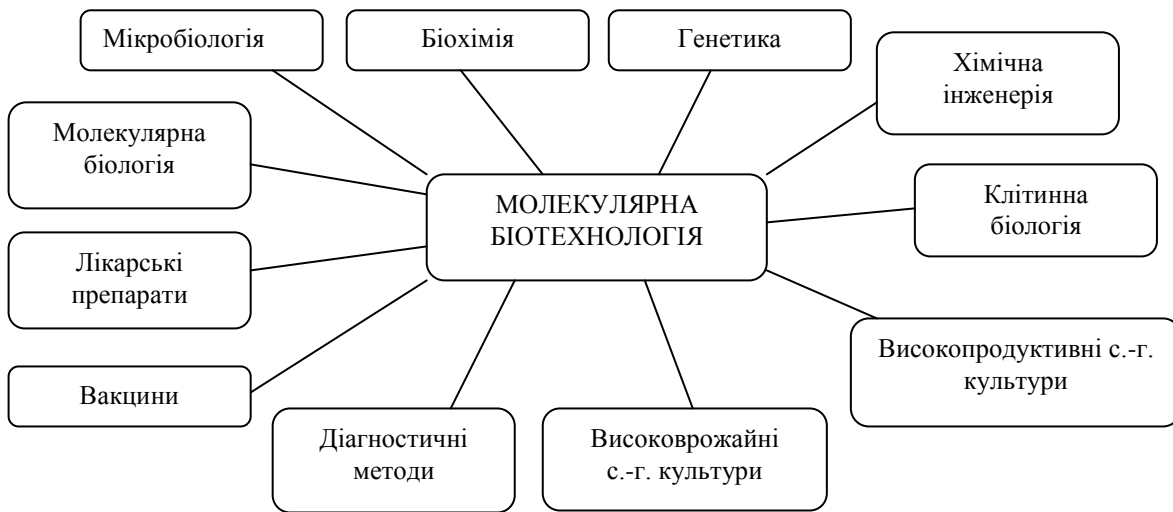


Рис. 1. Наукові основи та продукти біотехнології (за Б. Гліком та Дж. Пастернаком, 2002).

Основні напрямки розвитку біотехнології

Розширення сфер застосування біотехнології істотно впливає на підвищення рівня життя людини (рис. 2). Впровадження біотехнологічних процесів є найбільш результативним в медицині, але основний економічний ефект очікується у сільському господарстві та хімічній промисловості. Мікрочіпи, клітинні культури, моноклональні антитіла та білкова інженерія – це лише невелика частина сучасних біотехнологічних прийомів, що використовуються на різних стадіях розробки багатьох видів продукції. Розуміння молекулярних основ біологічних процесів дає можливість значно скоротити витрати на розробку й підготовку виробництва певного продукту, а також підвищити його якість. Наприклад, сільськогосподарські біотехнологічні компанії, що створюють стійкі до комах сорти рослин, можуть вимірювати кількість захисного білка в клітинній культурі і не витрачати ресурси на вирощування самих рослин; фармакологічні компанії можуть використовувати клітинні культури і мікрочіпи для перевірки безпеки й ефективності препаратів, а також для виявлення можливих побічних ефектів на ранніх стадіях одержання лікарських засобів.

При застосуванні біотехнологічних прийомів підвищується прибутковість виробництва і за рахунок скорочення процесу одержання продукту. Так, невеликий фрагмент ДНК, який використовується вченими для встановлення локалізації гена в геномі паразита рослини, згодом може виступати як компонент діагностичного набору, що виявляє присутність даного патогену, а моноклональні антитіла, синтезовані для ідентифікації терапевтичного білкового агента, надалі можна використати для пошуку, виділення й очищення необхідної сполуки.

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Інсулін, гормон росту людини, соматотропні гормони, стійкість до пестицидів, стійкість до гербіцидів, трансгенні тварини, трансгенні рослини, переробка нафти, вакцини і ін.



Рис. 2. Використання досягнень біотехнології в різних галузях народного господарства (за Д. Тейлором та ін., 2002).

Це свідчить про важливе значення біотехнології і широкі можливості її застосування в різних галузях народного господарства. Найбільш пріоритетними напрямками є:

1. Підвищення безпеки біотехнологічного виробництва для людини і навколишнього середовища. Потрібно створювати такі робочі системи, які будуть функціонувати тільки в строго контрольованих умовах. Наприклад, штами кишкової палички, які використовуються в біотехнології, позбавлені надмембранних структур (оболонки). Ці бактерії не здатні існувати поза лабораторними межами або спеціальними технологічними установками.

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

Підвищеною безпекою характеризуються і багатокомпонентні системи, кожна з яких нездатна до самостійного існування.

2. *Зниження відходів при виробничій діяльності людини.* До відходів виробництва відносяться побічні продукти, непридатні для використання людиною або іншими компонентами біосфери. Їх застосування є нерентабельним або сполучено з певними ризиками. Ці відходи накопичуються в межах виробничих приміщень (територій) або забруднюють навколишнє середовище. Для зміни співвідношення «корисний продукт/відходи» в сторону корисного продукту, по-перше, відходам необхідно знайти відповідне застосування. По-друге, їх можна використати для вторинної переробки, створивши замкнутий технологічний цикл або змінити саму робочу систему таким чином, щоб зменшити частку відходів.

3. *Впровадження енергозберігаючих технологій для зниження енергетичних затрат на виробництво продукту.* Цю проблему вирішують за рахунок використання відновлюваних джерел енергії. Для трансформації сонячної енергії у формі, доступній для сучасних силових установок, створюються (в тім числі методами клітинної інженерії) енергетичні плантації швидкоростучих рослин. Отримана біомаса використовується для виробництва целюлози, біопалива, а також біогумусу, що свідчить про всебічну раціональність застосування подібних технологій. Використання методів клітинної інженерії для постійного відновлення посадкового матеріалу забезпечує одержання в найкоротший термін великої кількості рослин, вільних від вірусів і мікоплазм; при цьому відпадає необхідність створення маточних плантацій. Знижується навантаження на природні насадження деревних рослин, які в значних обсягах вирубуються для одержання целюлози і палива. Зменшуються потреби у використанні екологічно несприятливого викопного палива, в результаті спалювання якого утворюються недоокислені речовини, тим часом як при використанні біопалива виділяються вуглекислий газ і водяні пари, які надходять в атмосферу та засвоюються рослинами на енергетичних плантаціях.

4. *Створення багатокомпонентних рослинних систем.* Якість сільськогосподарської продукції значно погіршується при застосуванні мінеральних добрив та отрутохімікатів, які завдають шкоди природним екосистемам. Ліквідувати негативні наслідки хімізації сільськогосподарського виробництва можна різними підходами. Насамперед необхідно відмовитись від монокультури (використання обмеженого набору сортів, порід, штамів. Монокультура чинить лише односторонній вплив на конкуруючі організми (бур'яни) та нестійка до патогенів і шкідників. Відбувається також вибіркоче винесення елементів мінерального живлення, що призводить до деградації ґрунтів. Протягом ХХ ст. вона підтримувалась за рахунок винятково високої інтенсивності виробництва. Тому, необхідно проводити планомірний перехід від монокультури до багатокомпонентних (поліклональних) композицій, які включають різні біотики культивованих організмів. Зокрема до їх складу

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

повинні входити організми з різним ритмом розвитку і неоднаковим ставленням до динаміки фізико-хімічних факторів середовища, конкурентів, патогенів та шкідників. У генетично гетерогенних системах виникають компенсаторні взаємодії однієї особини з різними генотипами, завдяки яким знижується рівень внутрішньовидової конкуренції і автоматично збільшується тиск культивованих організмів на конкуруючі організми інших видів (бур'яни). Стосовно патогенів і шкідників така гетерогенна екосистема характеризується колективним груповим імунітетом, що визначається взаємодією багаточисельних структурних і функціональних особливостей окремих біотипів.

Завдання біотехнології

У сучасній біотехнології використовуються біологічні системи всіх рівнів – від молекулярно-генетичного до біогеоценотичного (біосферного). При цьому створюються принципово нові біологічні системи, які не зустрічаються в природі. Біологічні системи, що застосовуються в біотехнології, разом з небіологічними компонентами (технологічне устаткування, матеріали, системи енергозабезпечення, контролю і керування) зазвичай називають робочими системами.

Першочерговими завданнями біотехнології є дослідження в області розробки та одержання:

- мікробіологічних засобів захисту рослин від хвороб і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин, підвищення родючості ґрунтів;
- нових, із заданими властивостями, високопродуктивних і стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів та гібридів сільськогосподарських рослин, отриманих методами генетичної й клітинної інженерії;
- цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів, ветеринарних препаратів й ін.), необхідних для підвищення продуктивності тваринництва;
- нових методів біоінженерії для ефективної профілактики, діагностики та терапії основних хвороб сільськогосподарських тварин;
- нових технологій одержання господарсько-цінних продуктів для використання в харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;
- технологій глибокої та ефективної переробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів; використання стічних вод і газоповітряних викидів для одержання біогазу та високоякісних добрив; виробництв дешевих та ефективних енергоносіїв (біопалива);
- нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів для медицини (інтерферонів, інсуліну, гормону росту людини, моноклональних антитіл та ін.), які підвищують якість життя людини і дозволяють здійснювати

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

ранню діагностику і лікування важких захворювань - серцево-судинних, онкологічних, спадкових, інфекційних, у тім числі вірусних.

До основних розділів сучасної біотехнології відносяться мікробіологічний синтез, клітинна інженерія, генетична інженерія.

Мікробіологічний синтез – це синтез різних речовин за допомогою мікроорганізмів. Натепер мікроорганізми застосовують у різних високих технологіях: для виробництва антибіотиків, кормового білка й амінокислот, біологічно активних сполук (вітамінів, гормонів, ферментів, стимуляторів росту) та ін. Перетворення одних речовин в інші за допомогою мікроорганізмів носить назву *біоконверсії*. При мікробіологічному синтезі, як мікроорганізми використовують прокаріоти (бактерії, актиноміцети) і гриби, а вихідною сировиною слугують різноманітні джерела вуглецю (природні вуглеводні, органічні відходи), мінеральні солі та атмосферний азот.

Застосовуючи методи генетичної та клітинної інженерії, сучасна біотехнологія здійснює широке конструювання генетично модифікованих організмів (ГМО), в тім числі мікроорганізмів, рослин і тварин. Надалі передбачається використання ГМО в природних умовах (у сільському господарстві, рибництві, для біологічної боротьби зі шкідниками сільського та лісового господарства та ін.). Однак перед генетичною інженерією виникає низка етичних і технологічних проблем, пов'язаних з їх впливом на живі організми. При потраплянні ГМО в навколишнє середовище вони можуть взаємодіяти з різними організмами, співтовариствами та екосистемами конкретних територій, тоді як процеси і результати таких взаємодій не завжди є прогнозованими. Зокрема, існує небезпека введення «штучних генів» у геном природних організмів в результаті схрещування ГМО і «диких» форм. Через можливі непередбачувані наслідки необхідно проводити дослідження, спрямовані на вивчення біобезпеки ГМО.

Біотехнологічні основи високих технологій

Сучасна біотехнологія розвивається настільки динамічно, що робить неможливим розробку єдиної класифікації її компонентів. Лише умовно (за аналогією із промисловими небіологічними технологіями) можна виділити наступні типи технологій: технології низького і високого рівня, екстенсивні та інтенсивні, безвідходні, безпечні, ресурсо- та енергозберігаючі, трудомісткі, наукомісткі, проривні. Сучасні біотехнології різних напрямків і різних рівнів нерозривно пов'язані між собою в єдину науково-виробничу систему.

Технології низького рівня – це традиційні технології, до яких відносяться технології біологічного очищення стічних вод, одержання біопалива, деякі види мікробіологічного синтезу. Вони характеризуються низькою наукоємністю, базуючись на використанні робочих систем, отриманих методами традиційної селекції і широко використовуються в сільськогосподарському виробництві (в рослинництві). Технології низького рівня з мінімальними затратами матеріальних ресурсів, енергії та людського фактору відносяться до

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

екстенсивних (наприклад, підвищення родючості ґрунтів шляхом вивозу на поля гною та торфу, заорювання пожнивних решток й/або сидератів - спеціально вирощених бобових рослин). Неefективність подібних технологій виявилась вже в першій половині ХХ ст. Так, при їх застосуванні продуктивність агроєкосистем майже не відрізнялась від продуктивності природних екосистем, що компенсувалось розширенням площ сільськогосподарських угідь. Вирубувались ліси (деревина використовувалась на паливо, для виробництва паперу), розорювались степи. Вирубка лісів та оранка степів неминуче супроводжувалась ерозією ґрунтів та збідненням водних ресурсів.

Більш ефективними виявились *інтенсивні технології низького рівня* і, в першу чергу, технології впровадження нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Якість сортів (порід, штамів) визначається їх підвищеною продуктивністю при збільшенні ручних затрат, сировинних та енергетичних ресурсів, більш активному впровадженню засобів механізації, автоматизації та хімізації виробництва. Поширення подібних технологій характерно для другої половини ХХ ст. Однак, в результаті застосування інтенсивних технологій низького рівня багаторазово підсилюється локальне навантаження на природні екосистеми, відбувається механічна ерозія ґрунтів, зростає забруднення їх мінеральними добривами і засобами захисту рослин. Збільшується і глобальне навантаження на біосферу, в першу чергу, за рахунок викидів вуглекислого газу. Так, кількість CO_2 , що утворюється при спалюванні викопного палива, у декілька разів більша, ніж кількість асимільованого CO_2 в процесі фотосинтезу в агроєкосистемах. Одним з істотних недоліків інтенсивних технологій низького рівня є різке погіршення якості продукції, яку часто називають екологічно брудною.

Виходом з цього становища постало використання *проривних технологій*, що базуються на найсучасніших досягненнях науки і техніки. У свій час такими стали технології мікробіологічного синтезу (наприклад, одержання антибіотиків), технології клітинної інженерії (наприклад, гібридизація соматичних клітин і клонування організмів), технології генетичної інженерії (зокрема одержання векторів переносу ДНК і створення трансгенних організмів).

Однак слід зауважити, що принципово нові технології можуть бути небезпечні для людини і навколишнього середовища, оскільки наслідки їх застосування є непередбачуваними. Впровадження таких технологій, як правило, супроводжується зазвичай появою нових видів продуктів і відходів. Будь-який новий харчовий або промисловий продукт повинен проходити всебічну перевірку на алергенність, канцерогенність та мутагенність, на сумісність з іншими продуктами, на безпеку для навколишнього середовища та ін.

На основі нових технологій створюються *біотехнології високого рівня* (або просто *високі біотехнології*). На протигагу технологіям низького рівня,

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

вони характеризуються високою наукоємністю, тобто використанням систем, отриманих найсучаснішими методами генетики, мікробіології, цитології, екології, молекулярної біології. Матеріали, що застосовуються у високих біотехнологіях, часто потребують або вимагають спеціальної підготовки, відповідного технологічного устаткування, висококваліфікованих фахівців, автоматизації і комп'ютеризації виробництва. Ці технології використовуються у сільськогосподарському виробництві, охороні здоров'я, у різних галузях науки, при плануванні і проведенні природоохоронних заходів.

Високі біотехнології, як і технології низького рівня, підрозділяють на екстенсивні та інтенсивні. *Екстенсивні високі біотехнології* характеризуються відносно низькими затратами сировинних та енергетичних ресурсів. До технологій подібного типу відноситься більшість мікробіологічних виробництв, технологічних процесів з підготовки і переробки промислової сировини, а також частина виробництва продукції на основі тканинно-клітинних культур. Ці технології частково інтенсифікуються за рахунок комп'ютеризації виробництва.

Інтенсивні високі біотехнології (на противагу екстенсивним) реалізуються із залученням фахівців найвищої кваліфікації, з використанням унікального устаткування і найсучасніших матеріалів. Ці біотехнології застосовують у медицині, а також для створення організмів із заздалегідь заданими властивостями. Слід зазначити, що інтенсифікація високих технологій, на відміну від інтенсифікації технологій низького рівня, полягає в підвищенні якості ресурсного та інформаційного забезпечення.

Технології різних рівнів нерозривно пов'язані між собою: з одного боку, високі технології базуються на технологіях низького рівня, тобто для їх здійснення необхідний певний ресурсний, енергетичний та інформаційний фундамент, з іншого боку - досягнення високих технологій використовуються на нижчих рівнях біотехнологічних виробництв. Високі технології є найбільшим досягненням інтелектуальних можливостей людини. Разом з тим за низкою параметрів вони не лише не перевершують технології низького рівня, але навіть поступаються їм. Зокрема, високі технології вимагають великого вкладу всіх видів ресурсів, вони не вирішують проблеми одержання екологічно чистої продукції, а саме біотехнологічне виробництво може нести загрозу для людини і навколишнього середовища.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Які науки внесли вклад у розвиток біотехнології?
2. Перерахуйте основні етапи розвитку біотехнології.
3. Які продукти одержують методами біотехнології і у яких галузях народного господарства вони знаходять застосування?
4. Зробіть перелік основних видів технологій.
5. Чим відрізняються екстенсивні та інтенсивні технології?

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

6. Що таке біотехнологія та яка її мета?
7. Назвіть пріоритетні для народного господарства напрямки біотехнології.
8. Виробництво яких продуктів біотехнології здійснюється з використанням мікробіологічного синтезу?
9. Першочергові завдання біотехнології.
10. Назвіть методи, які використовуються для одержання генетично модифікованих організмів.
11. Дайте визначення та назвіть сфери застосування технологій низького рівня.
12. Що таке інтенсивні технології? Наведіть приклади.
13. Розкажіть про проривні технології та їхні переваги, порівняно з іншими видами технологій.
14. Що ви знаєте про біотехнології високого рівня?
15. Дайте перелік відмінностей між екстенсивними та інтенсивними високими біотехнологіями.

Біотехнологічна лабораторія: структура та обладнання

Біотехнологічна лабораторія укомплектована спеціальними приміщеннями і обладнанням.

1. *Кімната для миття посуду* оснащена декількома раковинами із кислотностійкого матеріалу з гарячою та холодною водою і стелажми 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 дистиллятор. В кімнаті при можливості встановлюють миєчні машини, що значно дозволяє економити час і працю, які затрачаються на миття скляного посуду.

2. *Кімната для приготування живильних середовищ* і аналізу результатів забезпечена технічними, аналітичними, торзійними вагами, рН - метром, бідистиллятором, холодильними камерами, електроплитками, водяними банями, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду, полицями для розміщення хімічних реактивів, приладів тощо. В кімнаті можна розмістити машину для виготовлення ватних пробок.

3. *Приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду, матеріалів* оснащено горизонтальними або вертикальними автоклавами, сушильними шафами з режимом роботи 160-180°C, дистиллятором, столами та полицями для розміщення простерилізованих предметів і, по можливості, стерилізатором.

4. *Операційна (асептична) кімната* забезпечена ламінар-боксами і використовується для проведення стерильних робіт. Основна вимога, яка ставиться до неї – 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 ізолюваних тканин рослин та рослин-регенерантів. В цій кімнаті автоматично регулюється і підтримуються на постійному рівні освітленість, температура 25-26°C, вологість повітря 70-80%, 14-годинний фотоперіод, кондиційоване повітря. Кімната оснащена стелажми, які зручно розміщуються ярусами (один над другим). На стелажми встановлюють штативи з пробірками і культуральні колби таким чином, щоб вони не затіняли одна другу (рис.3). Джерела світла повинні забезпечувати спектр, сприйнятливий для протікання в рослинах основних біологічних процесів (400-700 нм), а інтенсивність випромінювання - бути в межах 1000-10000 лк. Освітлення в кімнаті повинно бути боковим або верхнім. Регулювання світлового режиму забезпечується за допомогою реле часу.



Рис. 3. Світлова культуральна кімната

6. *Центрифужна кімната* оснащена міні- та ультрацентрифугами для виділення білків і нуклеїнових кислот.

7. *Темнова культуральна кімната* з кондиційованим повітрям, температурою 25-26°C, відносною вологістю повітря 70-80%, оснащена установками ротаційного та шейкерного типу. Використовується для вирощування калюсних культур та клітинних суспензій.

8. *Лабораторне приміщення* оснащують обладнанням, необхідним для біохімічних, гісто – і цитологічних та інших досліджень, пов'язаних з основними роботами по вирощуванню рослинних тканин.

Посуд, інструменти і матеріали

Посуд, який використовують при роботі з культурою ізольованих тканин можна розділити на три групи.

1. Посуд для приготування і зберігання живильних середовищ.
Бутлі з темного скла на 20, 10 і 5 л з нижнім тубусом і без нього;
Колби Ерленмеєра на 5, 3, 2, 1, 0,5 л і 250 мл;
Колби плоскодонні на 5, 3, 2 л;
Колби мірні на 3, 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25 мл;
Циліндри мірні на 2, 1, 0,5 л, 250, 100, 50, 25, 10, 5 мл;
Стакани хімічні на 1, 0,5 л, 350, 250, 200, 100 мл;
Піпетки Мора на 15, 10, 5, 2, 1, 0,5 мл;

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

Піпетки градуйовані на 10, 5, 2, 1, 0,5 мл;

Мікропіпетки градуйовані (0,1-0,5 мл);

Автоматичні дозатори на 5, 2,5, 1, 0.5, 0.02, 0.005 мл;

Автоматичні піпетки (0,0001 – 5 мл).

Фільтри Зейтца (металеві) з прокладками із мембранних фільтрів “Синпор” або мембранні фільтри “Millipore”, “Sartorius” для фільтрування термолабільних компонентів середовища.

Скляні палички різних розмірів;

Скляні лійки різних розмірів.

2. Посуд для вирощування ізолюваних тканин.

Бутлі на 20, 10, 5, 3, 2, 1 л для глибинного культивування тканин і клітинних суспензій;

Колби Ерленмеєра широкогорлі на 1, 0.5 л, 250, 100 мл;

Пробірки біологічні розміром 23x200 мл, 23x150 мл, 40x150 мл;

Чашки Петрі (високі і низькі різного розміру, скляні і разові пластикові);

Скельця предметні без ямки і з ямкою;

Скельця покривні тонкі 24x24 мм;

Флакони пеніцилінові.

3. Посуд, який використовується при пересаджуванні тканин.

Чашки Петрі низькі з діаметром 10 см.

Стакани фарфорові для стерилізації інструментів.

Інструменти для ізолювання і висаджування ізолюваних тканин:

пінцети анатомічні різних розмірів (20, 25 і 30 см);

скальпелі анатомічні ланцетовидні, очні, черевні;

ножиці;

пробкові свердла різного діаметра;

металеві петлі;

голки анатомічні;

спиртівки.

Матеріали: фільтрувальний папір, негіроскопічна вата, марля, ватні пробки, алюмінієва фольга для виготовлення ковпачків на колби, целофан, пергаментний папір, нейлонова тканина різної щільності.

Вату використовують для протирання рук і робочої поверхні ламінар-боксу при стерилізації. Для фільтрування клітинної суспензії необхідна нейлонова тканина різної щільності. Із целофану роблять ковпачки для запобігання середовищ від висихання, які закріплюють гумовими кільцями. Алюмінієвою фольгою зручно закривати пеніцилінові флакончики, замість ватних пробок. Для загортання посуду при стерилізації в сухожаровій шафі використовують обгортковий або пергаментний папір. На фільтрувальному папері висушують рослинний матеріал після стерилізації.

ОСНОВНІ ВИМОГИ І ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Перед проведенням лабораторної роботи студенти зобов'язані теоретично підготуватися до відповідної теми, використовуючи рекомендовану літературу.

Працювати у лабораторії студент може тільки в присутності викладача або лаборанта .

У лабораторії слід дотримуватися тиші, чистоти, порядку розміщення обладнання, апаратури та реактивів. Забороняється виносити реактиви з приміщення, переносити їх з-під витяжної шафи.

Під час роботи в асептичному приміщенні необхідно щільно закрити вікна і двері та одягти стерильний халат, шапочку або пов'язку. Провести дезінфекцію рук 96% етиловим спиртом. Протерти 96% етиловим спиртом робочі поверхні столів ламінар-боксів, близько розташовані електророзетки, пальники.

Усі досліди з отруйними речовинами або сполуками, що мають неприємний запах, слід проводити під витяжною шафою.

Розігрівання живильного середовища необхідно проводити на водяній бані і розливати в колби, пробірки, пеніцилінові флакончики при температурі +45-50⁰С.

Під час роботи на магнітній мішалці не слід залишати магніт в колбі з живильним середовищем.

Рідину в пробірці необхідно перемішувати за допомогою скляної палички.

Уникати зайвих рухів над відкритими чашками Петрі. Проводячи висаджування рослинного матеріалу, посуд тримати під кутом, щоб уникнути прямого попадання пилу.

Посадку рослинного матеріалу проводять якнайшвидше, зменшуючи до мінімуму час, за якого культуральний посуд залишається відкритим.

Після закінчення роботи пробки культурального посуду накривають целофановими ковпачками. Бокові грані чашок Петрі заклеюють липкою стрічкою.

Під час роботи з концентрованими кислотами їх слід вливати у воду невеликими порціями, користуючись гумовими рукавичками.

Не слід пробувати реактиви на смак, втягувати піпеткою до рота розчин невідомої сполуки, оскільки вона може бути отруйною, вдихати глибоко виділені гази або випари.

Реактиви необхідно зберігати у закритому посуді з етикеткою, де зазначена назва, формула і концентрація речовини.

Забороняється виливати у раковини вмивальників залишки розчинів, що містять концентровані кислоти. Їх слід зливати у спеціальні ємності, які знаходяться під витяжною шафою або поряд із раковиною вмивальника.

РОЗДІЛ 1. Біотехнологія – центральна ланка сучасної науки

Працювати з реактивами, що подразнюють органи дихання або мають сильний запах, слід під витяжною шафою.

Сипкі реактиви треба набирати спеціальними ложечками або шпателем.

Під час роботи у лабораторії категорично забороняється залишати без нагляду установки, що працюють, а також електричні нагрівальні прилади.

Використані фільтри, папір, вату розбитий лабораторний посуд та уламки скла не викидати у раковини вмивальників. Необхідно користуватись ємностями, які знаходяться поряд з раковиною.

У разі виникнення пожежі необхідно: негайно вимкнути рубильники електромережі, прибрати у безпечне місце горючі речовини, вогнегасником загасити полум'я або засипати піском чи накрити азбестовим покривалом.

У разі виникнення пожежі в ламінар-боксі забороняється використовувати вогнегасник, полум'я необхідно загасити азбестовим покривалом або вологою ганчіркою.

Виходячи з лабораторії, обов'язково слід вимкнути електронагрівальні прилади, закрити водопровідний кран і витяжну шафу.

РОЗДІЛ 2. ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНИХ КОМПОНЕНТІВ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ НА РОЗВИТОК КЛІТИН

Мінеральні компоненти живильних середовищ

Всі хімічні сполуки поділяються на неорганічні та органічні. Більшість неорганічних хімічних речовин мають високу температуру плавлення, деякі можуть горіти, багато з них розчинні у воді й здатні проводити електричний струм. Однак, вони майже не розчиняються в органічних розчинниках. Реакції за участю неорганічних хімічних речовин практично завжди швидкоплинні.

В асептичних умовах іони мінеральних солей можуть надходити в рослини як з водної фази живильного середовища, так і в результаті обмінних процесів, які відбуваються на поверхні тканин, що контактують із середовищем. При надходженні у рослинний організм одні мінеральні елементи використовуються у формі вільних іонів, інші зв'язуються з органічними сполуками, або включаються в ці сполуки лише після ряду окисно-відновних перетворень.

У рослин зустрічаються всі елементи періодичної системи Д.І. Менделєєва. Мінеральні елементи прийнято умовно підрозділяти на дві групи, залежно від потреби в них рослинного організму, а також відповідно до їх змісту: макро- і мікроелементи. До першої групи відносяться сім основних хімічних елементів, які рослини одержують із живильних середовищ. Вони необхідні для будь-якого рослинного організму і входять до складу всіх прописів і комплексних добрив: *азот, кальцій, калій, фосфор, магній, сірка, кремній*. Вуглець, водень і кисень рослини одержують із водної фази живильного середовища та повітря.

До групи мікроелементів відносяться незамінні хімічні елементи, які необхідні рослинам у кількості 0,01 % і менше (розраховуючи на суху масу). Роль більшості мікроелементів визначена їх участю в активних центрах ферментів, тому дефіцит того чи іншого хімічного елемента може негативно позначатись вже на самих ранніх етапах онтогенезу рослин (табл. 1).

На сучасному рівні технологічного оснащення хімічних комбінатів по виробництву реактивів для використання в біотехнологічних процесах можна одержувати особливо чисті компоненти. Тому в умовах *in vitro* дуже яскраво проявляється нестача мікроелементів, які могли у вигляді домішок попадати в живильні середовища разом з іншими сполуками. Однак деякі мікроелементи входять до складу хімічних сполук у вигляді таких домішок, від яких дуже важко позбутися. В такому разі фірми-виробники зазвичай вказують на їх присутність на супровідному ярлику реактиву.

Макроелементи

Азот — один з найважливіших елементів, необхідних для нормального росту і розвитку рослин. Азот входить до складу амінокислот (білків),

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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).

Таблиця 1.
Середній вміст елементів у тканинах рослин (за Медведєвим, 2004)

Елемент	Вміст, в розрахунку на суху масу		Кількість атомів щодо молібдену (прийнятий за 1)
	мкМ/г	% (або млн.)	
Елементи, що одержуються з вуглекислоти і води			
водень	60 ТОВ	6	60 000 000
вуглець	40 ТОВ	45	40 000 000
кисень	30 000	45	30 000 000
Макроелементи			
азот	1 000	1,5	1000 000
калій	250	1,0	250 000
кальцій	125	0,5	125 000
магній	80	0,2	80 000
фосфор	60	0,2	60 000
сірка	30	0,1	30 000
кремній	30	0,1	30 000
Мікроелементи			
хлор	3,0	100	3 000
залізо	2,0	100	2 000
бор	2,0	20	2 000
марганець	1,0	50	1 000
натрій	0,4	10	400
цинк	0,3	20	300
мідь	0,1	6	100
нікель	0,002	0,1	2
молібден	0,001	0,1	1

При дефіциті азоту спостерігається хлороз листків, пригнічення росту й уповільнення загальних темпів розвитку рослини. Встановлено, що в

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 організмі. Унікальна функція фосфору – його участь у фосфорилуванні білків за допомогою ферментів протейнокіназ. 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).

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Кальцій відіграє важливу роль у метаболізмі клітин, шляхом зв'язування побічних токсичних продуктів білкового обміну у вигляді солей щавлевої кислоти - оксалату кальцію ($\text{Ca}_2\text{C}_2\text{O}_4$). 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 вводить у вигляді хлориду кальцію (CaCl_2), нітрату кальцію ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) або складного фосфату кальцію ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). 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 зрівноваженого 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 листових пластинок: їх кінчики спочатку біліють, а потім відмирають.

Сірка вводить до складу живильних середовищ у вигляді сульфатів різних елементів і поглинається кореневою системою рослин тільки в окисленій формі (у вигляді іона SO_4^{2-}). 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 (ліпоева 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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Магній входить до складу молекул хлорофілу, який надає зеленого забарвлення рослинам. У насінні більша частина магнію знаходиться у вигляді

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 вводить 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 запасується 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 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Для оптимізації доступності заліза для рослин, його вводять разом з Na_2EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Мідь. В живильні середовища мідь додають в основному у вигляді сульфату ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). 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

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 листових 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 ($MnSO_4 \cdot H_2O$).

Молібден надходить у рослини у вигляді аніона MoO_4^{2-} і локалізується в молодих ростучих органах, особливо в надземній частині. В листках він знаходиться в основному в хлоропластах. Молібден бере безпосередню участь у процесах перетворення азоту в аміачні форми, які добре засвоюються рослинами, тому його іноді називають мікроелементом азотного обміну. При нестачі молібдену в тканинах рослин у великій кількості накопичуються нітрати.

В живильні середовища для культури тканин додають молібдат натрію ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$). Передозування цього мікроелемента в культурі *in vitro* може бути вкрай токсичним. При закисненні живильних середовищ доступність молібдену знижується, що може призводити до зміни морфології пагонів і пригнічувати їх ріст майже до повного припинення.

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

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 листових 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 ціанокобаламіну (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, листові 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

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 опанувати 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 флоєми. 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 officinarum* L.) або цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.), які є 100% чистою її формою.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 ще 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-манніт - 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.

Сорбіт 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.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 відрізнитись 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

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 В₁; C₁₂H₁₇C₁N₄OS) 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 тiazолу.

Рибофлавін (вітамін В₂, вітамін G; C₁₇H₂₀N₄O₆) - 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 В₃, вітамін Р, вітамін РР; C₆H₅NO₂) - 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 В₄, 6-амінопурін; C₅H₅N₅) - 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 (AdSO₄; (C₅H₅N)₂ • H₂SO₄ • 2H₂O) і використовується в основному як стимулятор адвентивного пагоноутворення.

D-пантотенова кислота (вітамін В₅, C₉H₁₆NO₅) - водорозчинний вітамін, який є частиною молекули коензиму А. Введення вітаміну В₅ 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

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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 прімідинів.

Фолієва кислота (вітамін B_9 , вітамін M ; $C_{19}H_{19}N_7O_6$) синтезується в листках та інших рослинних тканинах. Її дія подібна до інших вітамінів групи B . 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 автоклавованні 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.

***n*-Амінобензойна кислота** (пара-амінобензойна кислота (ПАБК), вітамін B_x ; $C_7H_7NO_2$) іноді використовується в середовищах як антисептик. Ця сполука також бере участь в обміні фолієвої кислоти.

Інозитол (міо-інозитол, мезо-інозит, $C_6H_{12}O_6$) - цукровий спирт комплексу вітамінів групи B . В тканинах рослин у формі фосфату входить до складу різних мембран, особливо таких органодів, 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 C , $C_6H_8O_6$) - 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 автоклавованні середовища. Тому

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

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.

Холін ($C_5H_{15}NO_2$) - алкалоїд, який проявляє лужні властивості і може взаємодіяти з комплексом вітамінів групи В. Цей процес відбувається зазвичай в лецитині, який хімічно пов'язаний з жирами, містить фосфор та азот. Хлорид холіну ($C_5H_{14}NOCl$) іноді рекомендують використовувати в прописах живильних середовищ.

(+)- α -Токоферол (вітамін Е, $C_9H_{50}O_2$) застосовується в культурі тканин і рослин при депонуванні (довготривалому зберіганні) та підтримання в суспендованому стані культур клітин. При відсутності вітаміну Е в суспензійній культурі клітинні агрегати збільшуються в розмірах, що є неприпустимим для клітинної суспензії.

Регулятори росту (гормони) - не відносяться до поживних речовин, однак опосередковано впливають на процеси росту й формоутворення рослин. Ці сполуки синтезуються ендогенно, їх основна функція - забезпечення загальної й часткової координації процесів розвитку рослинного організму. Зазвичай в рослинних тканинах *in vitro* гормони не утворюються в достатній кількості, що спонукає до їх введення в культуральні середовища.

Гормональна система рослин менш спеціалізована, порівняно з тваринами, у яких гормони утворюються в спеціальних ендокринних залозах і проявляють специфічний дистанційний вплив на метаболічні процеси. Крім того, у тварин більш широкий спектр гормонів, досконаліша система їх транспорту і регулювання активності. Фітогормони також синтезуються в одних тканинах рослинного організму й транспортуються в інші, що призводить до функціональних змін цих органів і тканин. Проте на відміну від

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

тварин, гормони рослин можуть бути активними безпосередньо в тому місці, де вони утворюються.

Як регулятори росту в культурі *in vitro* найбільш широко використовуються гормони, які належать до груп ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, абсцизінів, а також етилен і мають мембранний механізм дії. Відомо, що цитокініни ініціюють клітинний поділ, тоді як ауксини підтримують ріст клітин розтягненням. Це досить спрощена схема, реалізація якої тією чи іншою мірою залежить від співвідношення концентрацій регуляторів росту в рослинних тканинах. Крім того, ефект дії гормонів зумовлюється також низкою фізичних факторів, зокрема таких як температура і світло.

Процеси диференціації, дедиференціації тканин, формування органів рослин тісно пов'язані із синтезом, наявністю, розподілом і співвідношенням ендогенних фітогормонів. Так, у процесах індукції ризогенезу головна роль належить ауксинам. Однак специфіка гормональної дії в рослинних тканинах визначається переважно типом клітин, на які впливають фітогормони. Слід наголосити, що кожний гормон має поліфункціональну дію (стимулятора або інгібітора росту) і здатний впливати на різноманітні фізіологічні процеси, при цьому дія кожного з них відрізняється специфічністю. Разом з тим, в регулюванні одного і того ж процесу можуть брати участь декілька фітогормонів. Вони проявляють здатність до утворення неактивних комплексів, які зберігаються у тканинах протягом тривалого часу. Фізіологічні ефекти, що виникають під дією фітогормонів залежать від їх концентрації і умов зовнішнього середовища у яких перебуває рослина.

Тип морфогенезу в культурі *in vitro*, незалежно від мінерального складу живильного середовища, визначається співвідношенням у балансі екзогенних гормонів цитокінінової і ауксинової природи. Проте на практиці використання такого балансу ускладнюється невизначеністю окремих моментів механізму дії цього процесу. Достовірно встановлено, що ефективність дії ауксину при укоріненні значною мірою залежить від концентрації цитокінінів, які використовуються в живильних середовищах на етапі мікророзмноження рослин-регенерантів. Адже загальновідомо, що корінь – це багатофункціональний орган, діяльність якого не слід розглядати окремо від функціонування рослини в цілому.

На прикладі ізольованих ділянок кореня показана необхідність додавання солей, гормонів, вітамінів, амінокислот для їх нормального росту. Особливе значення мають цитокініни, які синтезуються в корені. Вони обумовлюють закладання бруньок, листкових примордіїв, стабілізують вміст хлорофілу, РНК і полісом у надземних частинах рослини. Від якісного й кількісного вмісту гормонів залежить процес фотосинтезу і співвідношення маси кореня й надземної частини. Активність гормонів кореневої системи впливає на перехід до періоду спокою у деревних рослин. В разі посухи або засоленості ґрунту знижується пересування цитокінінів із кореня вгору по рослині, що негативно

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

впливає на інтенсивність процесів транспірації, фотосинтезу й забезпечення кореневої системи фотоасимілятами.

Систему процесів росту й розвитку рослин можна розглядати як результат поляризації гормонів. У надземній частині локалізуються ІОК, етилен, абсцизова кислота (АБК), гумат калію. Ауксин (ІОК) відіграє роль головного гормону верхівки, домінуючого центру пагона, яка в свою чергу, слугує домінуючим центром для утворення цитокінінів. Взаємодія цих двох центрів покладена в основу координації функціональної активності й морфогенезу рослини в цілому. Всі класи фітогормонів беруть участь в регулюванні стану спокою й проростання пазушних бруньок. При цьому важливим є встановлення причинних зв'язків між вмістом ауксинів в апексі і рівнем інгібіторів у пазушних бруньках.

Гормональна теорія регулювання диференціації і морфогенезу *in vitro* виявляється неспроможною за цілою низкою причин. По-перше, фітогормони в цьому процесі не мають специфічності. Так, одні й ті ж регулятори росту (ауксини, цитокініни, меншою мірою гібереліни й етилен) - це речовини, які регулюють і поділ клітин при недиференційованому рості калюса, і поділ, пов'язаний з диференціацією аж до формування органа. Диференціація включає зміни в експресії генів на рівні транскрипції, що передбачає існування й інших специфічних речовин, які визначають компетентність клітини до даної обробки екзогенними гормонами. По-друге, є системи, що не реагують на гормональну обробку. Клітини таких тканин не здатні до дедиференціювання, проліферації в умовах *in vitro* або, навіть за умов проходження проліферації *in vitro*, не можуть досягти такого стану, який дозволив би їм проявити тотипотентність. Зрештою відомо, що в клітин *in vitro* здатність до тотипотентності обумовлена цілим рядом факторів. Іншими словами, ефект екзогенного фітогормону залежить від клітин. В першу чергу морфогенетична здатність штаму або клону визначається генотипом.

Фітогормони, які відіграють важливу роль в індукції поділів у клітинах експлантату, а також в утворенні калюсу та в процесі морфогенезу, мають зазвичай велике значення і для процесу клонального мікророзмноження рослин. На сьогодні немає загальних правил щодо концентрацій і співвідношень гормонів в культурі *in vitro*, які можна було б застосовувати як постулат. Зрозуміло тільки те, що створення оптимального рівня екзогенних регуляторів росту є необхідною умовою для одержання калюсу, органів рослин, ембріодів і регенерації рослин (у тім числі в культурі пилку і пиляків). Середовище, розроблене для індукції диференціації та органогенезу тканин одного виду, не обов'язково буде індуктивним в культурі тканин іншого. Ймовірно, що однією з головних причин такої варіабельності у відповіді тканин на зовнішні гормональні фактори є їх різна здатність до синтезу власних ендогенних фітогормонів.

Ауксини – ключові рослинні фітогормони, які підтримують ріст клітини розтягненням, ініціюють утворення коренів, адвентивних бруньок і можуть

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

впливати на додаткове формування зародків. Ауксини, які утворюються в тканинах, відіграють важливу роль в регулюванні пересування пластичних речовин в рослинному організмі, оскільки клітини, збагачені ауксинами, проявляють атрагувальну здатність. Крім того, ауксини регулюють полярність у тканинах і органах рослин, перебуваючи як у вільній формі, так і у вигляді різних комплексів. Ауксини можуть утворювати сполуки з білками та нуклеїновими кислотами і в такій формі зберігатись або транспортуватись по рослині. У дводольних рослин головним місцем синтезу ауксинів є апікальна меристема. Доведено, що вони активно синтезуються також в зародках насіння. Транспорт ауксинів в рослині активно здійснюється в основному в базипетальному напрямку, тому видалення апексів призводить до загального зниження їх концентрації і тимчасового уповільнення ростових процесів.

Наразі замість ІОК і зеатину в культурі *in vitro* часто використовують їх синтетичні аналоги, що зумовлено цілою низкою причин. Сутність головної із них полягає в тому, що в живильне середовище додають оптимальне для розвитку кожної конкретної культури співвідношення фітогормонів. Проте перепасировані тканини містять певну кількість ендогенних гормонів, внаслідок чого на початку періоду культивування створюється надлишок регуляторів росту. В подальшому, по мірі інактивації регуляторів росту, їх концентрація поступово знижується і до завершення культивування стає нижчою за оптимальну. Тому у будь-якій культурі майже завжди відмічається коливання концентрацій регуляторів росту протягом періоду культивування, що негативно впливає на швидкість росту. Чим інтенсивніше інактивується гормон, тим вище амплітуда таких коливань. Синтетичні аналоги гормонів в рослинних організмах інактивуються набагато повільніше, що обумовлює значне скорочення амплітуди коливань концентрацій фітогормонів і позитивно позначається на рості культур рослинних тканин *in vitro*. Як пролонговані джерела ауксинів іноді використовують кон'югати ІОК менш чутливі до ІОК-оксидаз. Поступово розпадаючись, вони на довгий період забезпечують клітини ІОК.

В другій половині минулого сторіччя були розпочаті інтенсивні роботи з пошуку і синтезу аналогів ауксинів. Найбільш перспективними виявились похідні нафталінової кислоти і фенолу: α -нафтилоцтова, фенілоцтова, феноксиоцтова та інші кислоти. Ці групи речовин та їх похідні проявляють також високу фізіологічну активність і наразі широко застосовуються в практиці рослинництва.

Транспорт синтетичних ауксинів відбувається *базисно-і акропетально*, залежно від способу введення, але найбільш інтенсивно вони рухаються в акропетальному напрямку. Це пересування ауксинів носить пасивний характер і здійснюється в процесі транспірації з потоком водних розчинів. Синтетичні регулятори росту, які поглинаються кореневою системою або нижньою частиною рослини, надходять в надземні органи по судинах ксилеми, а відтак переміщуються в латеральному напрямку по паренхімі стебла.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Ауксини зазвичай використовуються в середовищах або в комбінаціях із цитокінінами (на стадії мультиплікації), або без них (при укоріненні рослини). Раніше в якості ауксину застосовували в основному ІОК, потім перевагу почали надавати НОК і 2,4-Д у концентрації 10^{-6} - 10^{-5} М.

β-Індолілоцтова кислота (ІОК, індоліл-3-оцтова кислота, $C_{10}H_9NO_2$) часто застосовується для укорінення мікрочеренків *in vitro* (надалі може пригнічувати коренеутворення). На світлі проявляє нестабільність, тому препарат потрібно зберігати в темному місці. В культурі *in vitro* використовується значно рідше, ніж синтетичні ауксини, оскільки клітини і тканини, як правило, зберігають здатність до утворення ендогенної ІОК в достатній кількості. Міститься у всіх частинах рослини, особливо молодих. Найбільш інтенсивно синтез ІОК відбувається в апікальних меристемах і молодих листках. На ювенільних етапах розвитку основним джерелом ІОК є ендосперм і сім'ядолі, які забезпечують гормонами надземну і підземну частини рослини. У сполученні з гіберелінами ІОК індукує мітози в тканинах рослин. Основний попередник синтезу ІОК у рослинних тканинах – амінокислота триптофан. Виявлено близько 50 ауксинрегулюючих генів, експресія яких активується (або пригнічується) концентрацією ІОК.

β-індолілмасляна кислота (ІМК, індоліл-3-масляна кислота, $C_{12}H_{13}NO_2$) - гормон укорінення. Синтезується в рослинах природним шляхом, однак існує і штучний аналог. У складі культуральних середовищ структурно більш стійка, ніж ІОК, тому *in vitro* переважно застосовується для індукції коренеутворення.

α-Нафтилоцтова кислота (НОК, 1-нафтилоцтова кислота, $C_{12}H_{10}O_2$) - черговий промотор коренеутворення, який часто використовують для підтримання стабільного росту калюсу (в подальшому може пригнічувати коренеутворення).

2,4-Дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д, $C_8H_6Cl_2O_3$) - синтетичний ауксин, який найбільш широко застосовується на практиці для активізації клітинного поділу і підтримання стабільного росту культури. Ця сполука використовується при розмноженні *in vitro* для ініціації росту калюсу. Однак у деяких випадках може проявляти інгібуючу дію на утворення тих або інших вторинних сполук у калюсах. Відомо, що 2,4Д роз'єднує процеси окислювального фосфорилування, що призводить до порушення забезпечення мітозу енергією.

Дикамба (3,6-дихлор-2-метоксибензойная кислота, $C_8H_6Cl_2O_3$) - синтетичний регулятор росту типу ауксину, що використовується як гербіцид. В асептичній культурі необхідний для ініціації калюсоутворення.

Цитокініни - речовини, які активно стимулюють ріст тканин за допомогою поділу клітин, мультиплікацію пагонів і проліферацію пазушних бруньок. Вони затримують процеси старіння рослинних тканин і впливають на транспорт ауксинів. Важливу роль відіграють в стимулюванні процесів формування мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджи і рибосом клітин. Впливають на активність синтезу білка у чутливих до них

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

рослинних об'єктах, змінюючи функціональну активність рибосом. Цитокініни сприяють збільшенню розміру листкових пластинок у етиольованих рослин, стимулюють ріст адвентивних бруньок, в результаті чого послаблюється ефект апікального домінування.

Додавання цитокінінів до живильних середовищ сприяє формуванню більш коротких пагонів із міцними стеблами, що відіграє важливу роль при адаптації рослин-регенерантів і висадження їх в субстрат. Особливо важливе значення цитокініни мають для індукції калюсу при одночасному використанні ІОК.

Зеатин ($C_{10}H_{13}N_5O$) – домінуючий вид цитокінінів в рослинних тканинах. Знаходиться в рослинах в формі рибозидів, риботидів або глікозидів, які є транспортною або запасною формою гормону.

6-Бензиламінопурин або *бензиладенін*; 6-бензиламінопурин (БАП, $C_{12}H_{11}N_5$) використовується значно частіше, ніж інші цитокініни як промотор пробудження пазушних бруньок. В культуру тканини вводиться синтетична сполука, оскільки цю речовину в рослині важко ідентифікувати. Одна з форм 6-бензиламінопурину - рибозид ($C_{17}H_{19}N_5O_4$). Наявність БАП в живильному середовищі необхідна для процесів клонального мікророзмноження, однак перешкоджає нормальному коренеутворенню. Тому часто практикують проміжне культивування на середовищах зі зниженою концентрацією БАП, після чого рослини-регенеранти переводять на середовища для укорінення.

БПА, або *ПБА* (N-бензил-9-(2-тетрагідропіраніл) аденін; $C_{17}H_{19}N_5O$) — синтетичний регулятор росту цитокінінового типу, який іноді використовують для збільшення об'єму калюсної маси або ініціації пазушних бруньок.

2-іР (N^6 -(2-ізопентил)аденін, $C_{10}H_{13}N_5$) – синтетичний компонент прописів багатьох середовищ для культури тканин вищих рослин. Ініціює активний поділ клітин і їх наступний нерегульований ріст.

Кінетин (6-фурфуриламинопурин, $C_{10}H_9N_5O$) - регулятор росту виділений з ДНК. Часто використовується в середовищах як промотор поділу клітин (збільшує частоту мітозів в меристемах). В низьких концентраціях ця речовина скорочує тривалість інтерфази.

Гібереліни - група природних сполук, які регулюють ріст клітин розтягненням і відповідальні за ріст стебел рослин. Подовження стебел під дією гіберелінів досягається внаслідок різкої активації процесів поділу та розтягнення клітин інтеркалярних меристем. Ауксини на цей процес не впливають. В свою чергу, гібереліни не діють або майже не впливають на ріст ізольованих міжвузлів, які активно реагують на обробку ауксином. Ідентифіковано більше 110 гіберелінів. Деякі з них містяться в насінневих зародках рослин та ініціюють перетворення крохмалю в більш прості вуглеводи, стимулюючи при цьому низку ферментів. Один з гіберелінів - гіберелову кислоту ($ГК_3$) - використовують в комплексі з ауксинами і цитокінінами як регулятор росту в культуральних середовищах. $ГК_3$ пригнічує утворення антоціанів і лігніну, але стимулює біосинтез проантоціанідинів.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Абсцизова кислота (АБК) синтезується у всіх органах рослини. В клітинах мезофілу біосинтез АБК відбуваються головним чином в цитозолі, але накопичується фітогормон переважно в хлоропластах. Концентрація активної форми АБК визначається процесами її синтезу, метаболізму, компартаменталізації і транспорту. Встановлено, що АБК пригнічує ріст і синтез розчинних фенольних сполук та лігніну в клітинах, а також ріст коренів на світлі і їх геотропічну реакцію. Фітогормон виявлено в кореновому чохлаку, який проявляє підвищену чутливість до світла і дії гравітації. Пересуваючись з кореневого чохлака в базипетальному напрямку АБК накопичується в меристематичних тканинах кореня, і разом з ІОК бере участь в регулюванні метаболічних процесів. При додаванні в середовище АБК нормалізується ембріогенез, оскільки утворення *in vitro* соматичних ембріодів часто відбувається з різними морфологічними відхиленнями. В рослинному організмі АБК виступає як антагоніст ІОК, цитокінінів і гіберелінів. Основні шляхи інактивації АБК в рослинах – окиснення і кон'югація з вуглеводами. Гальмування росту, спричинене АБК, супроводжується пригніченням синтетичних процесів і прискоренням старіння тканин.

Інші регулятори росту вивчені менш детально.

Ancymidol ($C_{15}H_{16}N_2O_2$) - ретардант з цитокініновим ефектом, відомий як комерційний препарат під назвою A-Rest. Іноді його використовують в культурі *in vitro* для скорочення кількості небажаних бічних пагонів або ініціації росту бруньок у деяких культур.

Пара-хлорфеноксиоцтова кислота ($C_8H_7ClO_3$) - ауксиноподібний регулятор росту.

Етилен (C_2H_4) - ненасичений вуглеводень, який утворюється в рослинному організмі в процесах його росту й розвитку. Попередником етилену є метіонін. В останні роки значно зріс інтерес до етилену. Довгий час цю сполуку не відносили до гормонів, вважаючи, що викликані ним ефекти опосередковані ауксинами. Етилен впливає на багаточисельні життєво важливі процеси в рослинному організмі (листопад, цвітіння, плодоносіння). Хоча етилен не входить до складу живильних середовищ, при культивуванні в асептичних умовах необхідно враховувати активне продукування етилену рослинами *in vitro*, що може мати небажані наслідки, враховуючи відносну замкнутість посудин для культивування. Відомо, що вітрифіковані культури виділяють значно більше етилену. Оскільки синтез етилену індукується в стресових умовах (*in situ* - критичні температури, патогени, посуха, аноксія; *in vitro* - тривалі пасажі), його іноді називають стресовим гормоном. Етилен здатний пригнічувати процес полярного транспорту ауксину і таким чином впливати на динаміку вмісту ауксинів у тканинах.

Paclobutrazol (DL,-1,2,4-триазол-3-аланін) - ретардант із цитокініновим ефектом. Додається до культуральних середовищ на останній стадії вирощування для оптимізації адаптації пробіркових рослин.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Phloroglucinol (1,3,5-триоксибензол) - проявляє бактерицидні властивості та підтримує ріст окремих культур. Крім того, може використовуватись як антиоксидант, а також при обробці вітрифікованих рослин.

TIBA (2,3,5-трийодобензойна кислота) – основні функції - уповільнення утворення небажаного калюсу, підтримання росту деяких культур та блокування транспорту ауксинів в рослинних тканинах.

Фузікокцин - метаболіт фітопатогенного гриба *Fusicoccum amygdali* Del., відомий як регулятор росту рослин. За хімічною природою - це глікозид карботрициклічного дитерпена з елементною формулою $C_{36}H_{56}O_{12}$. Крім основної сполуки (фузікокцин А), гриб продукує низку споріднених речовин, які розрізняються за ступенем ацетилювання, положенням ацетильних груп або меншим ступенем окиснення агліконової частини молекули.

Фузікокцин активно проникає через плазматичні мембрани клітини, викликаючи низку змін, в результаті чого індукується проростання насіння. При цьому його дія на насіння у стані спокою перевищує ефект гіберелінів. Особливо фузікокцин стимулює проростання світлочутливого насіння у темряві та ріст зародків, діючи при цьому більш ефективно, ніж гібереліни та БАП.

Амінокислоти - мономери білка. Деякі з них при поєднанні з нуклеїновими кислотами утворюють нуклеопротеїди. Відомо 20 основних амінокислот, які є L-ізомерами. Деякі амінокислоти зазвичай входять до складу культуральних середовищ і можуть бути єдиним або додатковим джерелом азоту.

L-Аланін ($C_3H_7NO_2$) може сприяти збільшенню кількості ембріодів для деяких культур.

L-Аргінін ($C_6H_{14}N_4O_2$) стимулює ріст окремих культур.

L-Аспарагін ($C_4H_8N_2O_3$) в комплексі з проліном і деякими іншими амінокислотами може стимулювати ембріогенез бобових. Іноді використовується в клітинній культурі.

Гліцин ($C_2H_5NO_2$) рідко застосовується в культуральних середовищах (зокрема, при культивуванні *Begonia* і в клітинній культурі *Poinsettia*).

L-Глутамін ($C_5H_{10}N_2O_3$) стимулює соматичний ембріогенез.

L-Лізин ($C_6H_{14}N_2O_2$) в комплексі з проліном може підвищувати якість і збільшувати кількість ембріодів.

L-Пролін ($C_5H_9NO_2$) часто використовується в комбінації з іншими амінокислотами в культурі ембріодів.

L-Серин ($C_3H_7NO_3$) застосовується при культивуванні мікроспор для одержання гаплоїдних рослин.

L-Тирозін ($C_9H_{11}NO_3$) - ефективний промотор пагоноутворення. Крім того, може слугувати додатковим джерелом азоту.

L-Цистеїн ($C_3H_7NO_2S$) - сірковмісна амінокислота, яку іноді вводять до складу середовищ у вигляді хлоргідрату ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl$).

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Антибіотики – природні (утворені рослинами або мікроорганізмами), чи синтетичні сполуки, які пригнічують ріст інших мікроорганізмів або спричиняють їх загибель. Зазвичай антибіотики не використовуються для позбавлення від інфекцій, що виявляються після чергового пасажу або невдалої стерилізації, оскільки за їх допомогою, як правило, не можна повністю позбутися від небажаних мікроорганізмів. Однак вони можуть слугувати ефективним додатковим стериліантом при введенні експлантатів в культуру *in vitro*. Виявлено, що антибіотики можуть впливати на генотип рослин, викликаючи мутації в хромосомах.

Ампіцилін успішно використовується в культурі протопластів *Petunia* в концентраціях 100-400 мг/л.

Карбеніцилін разом з *еугментином* в концентраціях 500 і 250 мг/л застосовується в деяких генетичних експериментах для підвищення ефективної роботи (управління) з окремими штамми *Agrobacterium*.

Цефотаксим використовується при виділенні деяких ендоефітних бактерій із вищих деревних рослин. Слід зауважити, що комбінація розчину, який складається із 25 мг/л цефотаксиму, 6 мг/л *тетрацикліну* і 6 мг/л *рифампіцину* є термічно нестабільною.

Сульфат гентаміцину - антибактеріальний препарат, стійкий до автоклавування. Компанія "Sigma" рекомендує застосовувати гентаміцин у концентрації 50 мг/л. Для культури протопластів його використовують в розчинах ферментів разом з ампіциліном (400 мг/л) і тетрацикліном (10 мг/л).

Methylolurea (оксиметилсечовина) – комерційна назва препарату UF-85. Сполуку синтезують з продуктів сечовиноформальдегідних реакцій і використовують для боротьби з деякими штамми дріжджових клітин. Підлягає автоклавуванню.

Поліміксин В - антибіотик, який використовується в суспензійній культурі клітин.

Стрептоміцин застосовується в клітинній селекції в концентраціях 20-100 мг/л, ефективний навіть після автоклавування.

Віразол - антивірусний препарат широкого спектру дії. Особливо ефективний проти деяких вірусів картоплі.

Антибіотики *бацитрацин*, *мікостатин*, *ністатин*, *пеніцилін*, *фосфоміцин* і *терапіцин* не проявляють антибактеріальної дії в культурі *in vitro*.

Органічні компоненти середовищ.

Агар - суміш високомолекулярних полісахаридів з екстрактів декількох різновидів червоних водоростей. Складається із двох полісахаридів - агарози і агаропектину. Використовується для загущування рідких живильних середовищ, надаючи їм желеподібного стану. В такому вигляді культуральне середовище може витримувати на своїй поверхні рослини і не перешкоджати вільному пересуванню живильних речовин до поглинальних зон. Агар не засвоюється рослинами, однак в разі застосування синтетичного агару,

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

необхідно враховувати присутність у ньому слідової кількості домішок, які можуть впливати на результат. В агарі можуть міститись хлориди, сульфати, іони кальцію, магнію і заліза. Концентрація домішок змінюється залежно від джерела морських водоростей і методу виробництва агару. У продажу є очищені агари, які цілком придатні для культури тканини рослин. При виконанні роботи з новим типом агару, потрібно спочатку встановити його кількість, необхідну для приготування гелю певної концентрації. Як правило, ці дані надає виробник. Зазвичай це значення становить 6-10 г/л середовища, проте зустрічаються агари з оптимальною концентрацією 12-16 г/л. Крім того, слід враховувати, що при закисленні середовища агарозний гель дещо розріджується. Це відбувається після автоклавування та при культивуванні окремих видів рослин, які виділяють в культуральне середовище специфічні сполуки.

На консистенцію гелю впливає концентрація живильного середовища та його кислотність: чим нижче значення рН, тим м'якше гель. Поверхня гелю повинна бути достатньо стійкою при одночасному збереженні м'якості для того, щоб на його поверхні можна було вільно розміщувати рослини-регенеранти (або їх частини) без утруднення доступу до них живильних речовин. На поверхні середовища не повинно бути конденсату. Слід наголосити, що надмірно тверде живильне середовище перешкоджає доступу живильних речовин до рослин, а надмірно м'яке - викликає вітрифікацію. Іноді застосовують поліакриламідні гелі, кульки з пірексу та кварцовий пісок, що мають деякі переваги. Однак, порівняно із традиційними способами культивування на агарі, у них відмічається низка недоліків. Натепер доступні кілька синтетичних замінників агару таких, як *gelrite*, *gellan* і *phytagel*. Середовище, в якому використовують ці замінники, надзвичайно прозоре (не має домішок) і не проявляє негативного впливу на рослинні культури (в окремих випадках може спостерігатись вітрифікація). Собівартість середовищ з замінниками агару значно нижча, ніж агаровмісних.

Активоване вугілля часто додають до культуральних середовищ для укорінення на останньому етапі клонального мікророзмноження рослин. Позитивно впливає на проростки тропічних видів рослин практично на всіх етапах їх культивування *in vitro*. Активоване вугілля зв'язує інгібітори фітогормонів, у результаті чого стимулюється ембріогенез. Позитивний ефект активованого вугілля пов'язують з його комплексним впливом на розвиток ювенільних рослин *in vitro*. Крім того, даний компонент полегшує доступ повітря до частин рослин, розташованих у товщі середовища і впливає на формування маси кореневої системи.

Гумат натрію активізує ферментативні процеси в рослині і підвищує проникність клітинних мембран. В умовах нестачі кисню стимулює інтенсивність дихання і сприяє посиленню ростових процесів. Крім того, за його дії підвищується мітотична активність меристематичних клітин і накопичення ДНК у ядрах.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Гідролізат казеїну – це суміш амінокислот, яка в культурі *in vitro* виконує функцію додаткового джерела органічного азоту.

Кокосове молоко - рідка частина ендосперму кокосового горіха (*Cocos nucifera*). Ця добавка широко використовувалась іще на початку етапу формування мікроклонального розмноження рослин *in vitro*, як окремого напрямку біотехнологічних досліджень. Проявляє цитокінінову дію. Ріст тканин рослин багатьох видів стимулюється при додаванні до живильного середовища від 5 до 20% кокосового молока. Різноманітність активних речовин, які входять до складу кокосового молока, і синергізм їх дії дозволяють припустити, що його активність загалом залежить від взаємодії цих речовин. Кокосове молоко термостабільне і не втрачає активності при автоклавуванні.

Екстракт ендосперму зерен кукурудзи застосовують рідко. Припускають, що позитивний ефект досягається внаслідок наявності в ньому зеатину.

Кукурудзяний екстракт (“*corn steep water*”) одержують як побічний продукт при виробництві кукурудзяного крохмалю і використовують в основному для культивування незрілих зародків кукурудзи.

Кукурудзяний крохмаль застосовується в культурі *in vitro* як частковий замітник агару сумісно із штучним заміником агару *gelrite* у пропорції 50,0 і 0,5 г відповідно на 1 л середовища.

Картопляний екстракт з успіхом використовують для культивування деяких видів орхідних (*Cymbidium*, *Laeliá*) та *Agrobacterium tumefaciens*. Іноді його додають до живильних середовищ для ініції андрогенезу пиляків вищих рослин.

Дріжджовий екстракт - природне джерело вітамінів. Препарат продається у вигляді порошку. Активною складовою частиною дріжджового екстракту є вітаміни, нуклеїнові сполуки та амінокислоти. Оптимальна доза екстракту – 7-15%. Автоклавування знижує його активність приблизно на 40%. Дріжджовий екстракт проявляє синергічну дію по відношенню до багатьох стимуляторів росту (2,4-Д, солоду і ауксинів).

Солодовий екстракт (солод) – джерело вітамінів, головним чином групи В. Застосовується при культивуванні незрілих зародків, пиляків та пилку.

Кокосове молоко, солод, дріжджовий екстракт успішно застосовуються для активування первинного росту ізольованих із рослин тканин. Однак при подальшому перепасированню культури їх можна повністю замінити синтетичним середовищем.

Екстракти із стебел і листків. Проявляють стимулюючу або пригнічувальну дію, яка залежить великою мірою не тільки від виду рослини, типу органу і тканини, із яких його одержують, але й від фізіологічного стану даної рослини та балансу метаболітів в її тканинах, активних по відношенню до росту ізольованої тканини.

Екстракти із пухлинних тканин. Застосовують екстракти із галової пухлинної тканини томатів, тагетусів і хризантем. Невисокі їх дози стимулюють, а високі - інгібують ріст галових пухлин, спричинених дією

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Agrobacterium rhizogenes. Спостерігається синергізм екстрактів пухлинних тканин з кокосовим молоком.

Березовий сік і пасока інших рослин. Пасока берези (ксилемний сік) *Betulla pendulla* L., зібрана навесні у період активного соковиділення, містить деякі регулятори росту, вітаміни і вуглеводи в доступній для рослин формі. Сприяє покращанню розвитку насінневих зачатків і стимулює ріст калюсної тканини. Додавання цього інгредієнта до складу культуральних середовищ (10-12 %) дає позитивний результат при вирощування представників Bromeliaceae Juss. В помірній кліматичній зоні у період активного соковиділення у *B. pendulla* цей компонент можна заготовлювати в необхідній кількості, а надлишки зберігати в холодильнику.

Морквяний сік (свіжоприготовлений) у концентрації 10-15 % активно стимулює розвиток деяких представників тропічних орхідних роду *Laelia*.

Томатний сік стимулює ріст тканини ендосперму кукурудзи, пиляків, галових пухлинних тканин. Спостерігається синергізм томатного соку із 2,4-Д, ІОК та ІМК. Томатний сік із зрілих плодів має більшу стимулюючу дію, ніж екстракт із недозрілих. Останній в високих концентраціях проявляє пригнічувальну дію. Максимальне стимулювання спостерігається при застосовуванні соку із зрілих плодів в концентрації 5-10%. Активні фактори томатного соку термостійкі, однак при кімнатній температурі його активність повністю втрачається протягом місяця.

Апельсиновий сік проявляє стимулюючу дію на процеси калюсоутворення.

Гомогенат банану (Musa hybr.) дуже ефективний при вирощуванні низки тропічних орхідних (представники *Cattleya*, *Laelia*). Однак цей ефект досить вибіркового. Так, на додавання даного інгредієнта в культуральне середовище негативно реагують деякі види *Paphiopedilum* (*P.insigne*, *P.delenatii* і їх гібриди), *Odontoglossum*, *Dendrobium*, *Laelia lobata*.

Таким чином, аналізуючи дію рослинних екстрактів на ріст ізольованих тканин, можна зробити декілька загальних висновків:

- найбільшою стимулюючою дією характеризуються недозрілі ендосперми насіння низки рослин, що обумовлюється особливістю ролі ендосперму в процесі росту й розвитку зародку. Активність ендоспермів залежить від цілої системи речовин, які діють синергічно і визначають інтенсивність росту;
- екстракти із молодих ростучих органів і частин рослин проявляють, зазвичай, стимулюючий ефект, а екстракти із дозрілого насіння і органів, які перебувають в стані спокою, пригнічують ріст культури тканин;
- зміна складу активних метаболітів цілої рослини під впливом умов зовнішнього середовища (якості світла, інтенсивності освітлення, тривалості дня) визначає характер дії екстракту на ріст культури тканин;
- при вивченні механізму росту рослинної тканини і впливу на її метаболізм різних компонентів живильного середовища, небажано

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

використовувати рослинні екстракти будь-якого походження, в зв'язку з великою невизначеністю їх складу.

Оптимізація живильних середовищ. Математичне планування експерименту.

Натепер слабкою ланкою в мікроклональному розмноженні рослин залишається підбір живильних середовищ і умов культивування. Одним із шляхів вирішення цієї важливої проблеми є застосування методів математичного планування експерименту. Ці методи дозволяють швидко при невеликому об'ємі експериментів визначити оптимальні умови, які забезпечують високу швидкість розмноження, вивчити залежність мікророзмноження від сукупності факторів, що діють на процес, а також встановити наявність і оцінити ефекти багатофакторних взаємодій.

В останні роки багатофакторні експерименти почали широко використовувати для оптимізації культивування калюсних тканин рослин. Встановлено, що однією із основних переваг оптимізованого середовища є цитогенетична стабільність популяції культивованих клітин. При математичному плануванні не завжди можливо чітко виділити фактори першочергової важливості. На результати експерименту суттєво впливають невраховані фактори, що може призвести до невірної уявлення про вплив того чи іншого фактора на процес. Іншою обставиною, яка ускладнює проведення експериментів і оцінку результатів, є ушкоджуюча дія стерилізуючого розчину, який завжди токсичний для рослинних тканин і тією чи іншою мірою пригнічує ріст експлантатів. Правильний вибір стерилізуючого агента, його дози і часу стерилізації забезпечують задовільні результати. При постановці і проведенні багатофакторних експериментів необхідно враховувати неоднорідність вихідного рослинного матеріалу і гетерогенність культивованих тканин.

Склад живильного середовища і умови клонального мікророзмноження значною мірою залежать від особливостей культивування тканин і органів на попередньому етапі мікророзмноження. Вплив цього фактору можна зменшити двома способами:

- культивувати тканини, органи, які пройшли декілька пасажів, на стандартному середовищі. В якості стандартного краще використовувати оптимальне середовище попереднього етапу;
- органи і тканини, одержані із одного експерименту, рівномірно розподілити між різними варіантами нового експерименту.

На другому етапі враховують загальну кількість розвинених пагонів, ембріодів, яка відображує ефективність розмноження. Критерієм оптимізації третього етапу є довжина кореневої системи. При цьому необхідно враховувати висоту і загальний стан рослини, а також ступінь виживання і ріст її при пересаджуванні в землю. Завдяки проведенню багатофакторних експериментів було показано, що мінімальні середовища, які не містять вітамінів, рослинних екстрактів, аденіну, цитокінінів, з низькою концентрацією мінеральних солей,

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

сахарози, ауксинів сприятливо впливають на укорінення і закалювання рослин-регенерантів.

Таким чином, методи математичного планування є ефективним засобом оптимізації культивування рослинних тканин *in vitro* і клонального мікророзмноження рослин.

Тема 1. Принципи та методи вирощування ізолюваних клітин і тканин рослин

Метод культури клітин і тканин - це культивування *in vitro* ізолюваних клітин та тканин на штучних живильних середовищах при відповідних умовах. Культивування ізолюваних клітин і тканин рослин в умовах *in vitro* – метод збереження і розмноження органів і їх частин, ділянок тканин і окремих клітин поза організмом. Клітини і тканини, які вирощуються *in vitro* – біологічна модель, на якій в контрольованих умовах, близьких до природних, надається можливість вивчення механізмів міжклітинних взаємодій, їх регуляторної ролі, в тім числі за дії стресових факторів навколишнього середовища.

В культурі *in vitro*, в строго контрольованих умовах можна оцінити потенціал ізолюваних тканин, клітин, органів та можливих змін їх метаболізму і структури в залежності від дії різних фізичних і хімічних факторів. Вивільнення клітини із-під впливу кореляційних зв'язків і залежностей материнського організму є науковою основою методу вивчення її різноманітних потенційних можливостей.

Практично всі методичні прийоми культури тканин *in vitro* базуються на трьох основних принципах:

- ізолюванні експлантату (клітина, шматочок тканини, органи) від основного материнського організму;
- розміщенні експлантату в контрольовані, ретельно підібрані умови;
- дотриманні стерильності вирощуваного матеріалу.

На сучасному етапі метод культури клітин та тканин *in vitro* широко використовується при створенні рослин із заданими господарсько-цінними ознаками та для вирішення багатьох фундаментальних питань фізіології, цитології і генетики рослин.

Лабораторна робота 1

Методи стерилізації ламінар-боксу, посуду, живильних середовищ та рослинного матеріалу

Інфекція, що спостерігається в культурах рослинних тканин може бути систематичною і випадковою. В першому випадку необхідно проаналізувати всі операції підготовки, стерилізацію середовищ, тканин, приміщення та ізолювання і пересадження тканин для пошуку помилки, яка визначає цю систематичну інфекцію.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Стерилізація – це повна інактивація здатності до розмноження всіх форм мікроорганізмів. Дія стерилізуючих агентів базується на інактивації процесів, які обумовлюють ріст і репродукцію клітин і, перш за все, денатурацію ферментів та інактивацію геному.

До агентів, що забезпечують стерильність відносять:

- тепло, включаючи пар (автоклавування, тиндалізація, кип'ятіння, пастеризація);
- гаряче повітря (нагрівання за допомогою гарячого повітря у спеціальних шафах при температурі +120 – 180⁰С);
- токсичні хімічні сполуки;
- фізичні фактори: іонізуюче опромінення, головним чином γ -промені, оскільки ультрафіолетове опромінення не завжди є ефективним.

Основною умовою успішного культивування ізольованих клітин, тканин, органів рослин є стерильність приміщення, ламінар-боксу, живильного середовища, посуду, допоміжних матеріалів, інструментів, посадкового матеріалу.

Стерилізація приміщення:

1. Підлогу кімнати миють водою з будь-яким миючим засобом.

2. Проводять стерилізацію кімнати ультрафіолетовим опроміненням, використовуючи лампи ПРК-7 (потужність 1000 Вт) або ПРК-4 (потужність 500 Вт) протягом 1,5-2 годин, в залежності від потужності ламп. Працювати в кімнаті можна тільки через 2 години після виключення ламп.

Стерилізація ламінар-боксу: ламінар-бокси, як правило, обладнані УФ лампами, які можна залишати на ніч ввімкнутими для стерилізації внутрішньої поверхні. Безпосередньо перед роботою в ламінар-боксі його робочу поверхню протирають 96% етиловим спиртом.

Стерилізацію рук проводять за допомогою 96% етилового спирту після попередньо їх миття мильним розчином.

Стерилізація інструментів: ножиці, ланцети, пінцети, голки прожарюють в сушильній шафі протягом 2-3 годин при температурі 160-180⁰С. Перед роботою інструменти стерилізують 96% спиртом, обпалюють над полум'ям спиртівки, після чого кладуть на підставку для охолодження. Використовують стерильні інструменти тільки для однієї маніпуляції. Перед повторним використанням інструментів, стерилізацію їх повторюють в полум'ї спиртівки.

Стерилізація посуду. Обов'язковою умовою успішного культивування рослинних тканин є чисто вимитий стерильний посуд. Існує два методи миття посуду кислотний і лужний. Самим поширеним і надійним методом підготовки скляного посуду, особливо нового, є кислотний – замочування посуду на 4-6 год. у хромовій суміші (розчин біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$) в концентрованій сірчаній кислоті). Потім посуд багаторазово промивають теплою проточною водою і ретельно ополіскують два рази дистильованою і один раз бідистильованою водою. Використаний посуд звільняють від залишків

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

середовища і ретельно миють з застосуванням звичайних мийних засобів (лужний метод) і ополіскують проточною та дистильованою водою. Вимитий посуд висушують і стерилізують в сушильній шафі при температурі 160-180°C протягом 2-2,5 годин. Крім сухоповітряного способу, посуд можна стерилізувати автоклавуванням протягом 20-25 хв. при 1-1,2 атм, попередньо загорнувши його в пергаментний папір. Стерильний посуд зберігають у закритих шафах, захищених від проникнення пилу, в чистоті, не допускаючи забруднення навіть слідами хімічних речовин.

У випадку інфікування культуральних рослин або клітин, перед їх знищенням і наступним миттям посуду, пробірки чи флакони з рослинним матеріалом автоклавують протягом 50-60 хв. при тиску 2 атм.

Стерилізація допоміжних матеріалів. Вату, марлю, ватні та силіконові пробки, целофан, папір, фольгу стерилізують автоклавуванням протягом 25 хв. при 1-1,2 атм.

Стерилізація живильних середовищ. Тверді (агаризовані) і рідкі середовища автоклавують в пробірках, колбах або іншому скляному посуді. Час стерилізації залежить від об'єму середовища (табл.2).

Складові живильних середовищ, що розкладаються чи коагулюють під час автоклавування (амінокислоти та їх аналоги, ферменти, антибіотики, мутагени) стерилізують механічним методом – через бактерицидні фільтри. Скляні фільтри після їх використання промивають концентрованою сірчаною кислотою і декілька разів проточною водопровідною та дистильованою водою.

Таблиця 2.

Режим автоклавування живильних середовищ

Об'єм середовища, мл	Час стерилізації (121°C, 1 атм) хв
20-50	15
75	20
150-500	25
1000	30
2000	40

Стерилізація рослинного матеріалу. Одержання стерильного (асептичного) рослинного матеріалу - складне завдання, тому що необхідно нейтралізувати мікрофлору, не пошкодивши при цьому рослинну тканину. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини (стериланти), які не проникають у тканину і легко змиваються водою.

Враховуючи, що в природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, їх спор, бактерій, рослинний матеріал попередньо занурюють в 70% етиловий спирт: насіння на 2-3 хв., листки, корені на 0,5-1 хв.

Для подальшої стерилізації використовують такі препарати:

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

1. Препарати з активним хлором; 0,5-5% гіпохлорит натрію NaClO ; 9% гіпохлорит кальцію $\text{Ca}(\text{ClO})_2$; хлорамін, комерційний препарат "Білизна".
2. Ртутні препарати: 0,2-0,5% розчин сулеми HgCl_2 , діюцид, фапосепт.
3. 5-20% розчин перекису водню H_2O_2 .
4. 1% бромна вода Br_2 .
5. 0,5-2% азотнокисле срібло AgNO_3 .

Для підвищення стерилізуючого ефекту в розчині необхідно додавати незначну кількість емульгатору твін-80 або твін-200 (1 крапля на 100 мл розчину). Час стерилізації визначається експериментально і залежить від вибраної стерилізуючої речовини та об'єкту, який підлягає процесу стерилізації. Для видалення із тканин стерилізуючої речовини, проводять промивання експлантату чотири рази з періодом експозиції 15 хвилин. При порушенні такого режиму відбувається отруєння культури, що призводить до заторможеного ростових процесів або повної загибелі рослин.

У випадку значного зараження досліджуваного матеріалу при введенні в стерильну культуру необхідно застосовувати **антибіотики**, розчини яких стерилізують через мембранні фільтри. Серед них до одного із найбільш ефективних відноситься клафоран. Простерилізований та відмитий матеріал занурюють на 3 год. у водний розчин клафорану (500 мг/л), а потім висаджують на агаризоване живильне середовище, яке містить 500 мг/л клафорану і 50 мг/л канаміцину.

Перед відкриванням колби чи пробірки зі стерильним живильним середовищем, їх протирають ватою, змоченою в 96% етиловому спирті, а горловину посудини обпалюють над полум'ям спиртівки.

При висадженні експлантатів колбу треба тримати під кутом поблизу полум'я спиртівки. Після закінчення посадки ковпачок із фольги або ватну пробку обпалюють над полум'ям спиртівки і швидко закривають колбу чи пробірку.

Розділення рослинного матеріалу на фрагменти (експлантати) зручно проводити в низьких чашках Петрі, на стерильних салфетках із фільтрованого паперу.

Лабораторна робота 2

Приготування маточних розчинів для середовища Мурасиге і Скуга

Мета роботи: Приготувати маточні розчини макро- і мікросолей, вітамінів, фітогормонів, Fe-хелату.

Матеріали і обладнання: NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 96% етиловий спирт, 1N HCl і 1N KOH , ваги, магнітний змішувач, електроплитка, лопатки (шпателі), лабораторний посуд - стакан або колба об'ємом 1 л, мірні циліндри місткістю

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

500 мл, 100 мл, мірні піпетки - 5 мл, 1 мл, пляшки з темного скла - 1 л, 100 мл, 50 мл, 25 мл.

Для розчинів макросолей і вітамінів бажано використовувати стерильний посуд.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати розчини макро- і мікросолей (концентрація речовин вказана в г/л).

Макро МС — 1 л розчину солей

NH_4NO_3 1650

KNO_3 1900

CaCl_2 440

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370

KH_2PO_4 170

Мікро МС - 100 мл розчину солей (концентрація речовин вказана в мг/л).

H_3BO_3 6,2

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3

$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,6

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 *розчиняти окремо*

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025

2. Приготувати розчин Fe-хелат. На 100 мл розчину

$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 557 мг

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 745 мг

Наважки розчинити окремо у бідистильованій воді, злити і довести до кипіння.

3. Приготувати розчини фітогормонів: 2,4-Д і кінетин. Концентрація 1 мг/мл.

4. Приготувати розчини вітамінів B_1 , B_6 і РР. Концентрація 1 мг/мл.

Лабораторна робота 3

Стерилізація рідких середовищ пропусканням через бактеріальний фільтр (холодна стерилізація)

При приготуванні середовищ з термолабільними компонентами (рослинні екстракти/амінокислоти, вітаміни, антибіотики, деякі стимулятори росту), що руйнуються при автоклавуванні необхідно розчини цих речовин стерилізувати пропусканням через бактеріальні фільтри (холодна стерилізація). Холодна стерилізація використовується для приготування ферментних сумішей при виділенні ізольованих протопластів, середовищ з біологічно активними компонентами, рідких середовищ тощо. Для цього використовують стерильні бактеріальні фільтри Зейтца або Беркефельда, свічі Шамберлана, мембранні фільтри.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Мета роботи: оволодіти навиками стерилізації середовищ через бактеріальні фільтри. Навчитися складати і стерилізувати фільтри.

Матеріали і обладнання: маточні розчини макро- і мікросолей, вітамінів, Fe-хелату, ваги, шпателі, сахароза, мезоінозит, рН-метр, фільтр Зейтца, колба Бунзена, автоклав, ламінар-бокс, насос Камовського, стерильні колби закриті фольгою, пробірки, мірні піпетки.

ХІД РОБОТИ

1. Скласти фільтр Зейтца.

1.1. Розгвинтити металевий корпус фільтра.

1.2. В нижню частину корпусу закласти металеву сітку, потім однакового діаметру з корпусом кільце з тонкої гуми, диск із фільтрувального паперу, ультрафільтр, другий диск фільтрувального паперу і гумове кільце.

Мембранний ультрафільтр має блискучу і матову поверхні, тому при складанні його необхідно розмістити матовою поверхнею в сторону сітки.

1.3. Накласти верхню частину корпусу і пригвинтити її до нижньої (не до упору).

2. Складений фільтр Зейтца за допомогою гумової пробки вмонтувати в колбу Бунзена. На бічний відросток колби одягнути вакуумний шланг. Для запобігання забруднення з повітря у шланг вставити з'єднану з насосом скляну трубку з ватним тампоном.

3. Складений і з'єднаний з колбою фільтр Зейтца загорнути в цупкий обгортковий папір або целофан.

4. Простерилізувати фільтр в автоклаві протягом 30 хв. при 1 атм.

5. Після автоклавування гвинти, які з'єднують обидві частини корпусу, туго загвинтити і для забезпечення більшої герметичності залити місця з'єднання пробки з колбою і фільтром розплавленим парафіном.

6. Приготувати 100 мл рідкого (без агару) середовища МС (робота 4). Профільтрувати середовище з використанням вакууму (насосу Камовського або водострумного насосу).

Краплини фільтрату повинні скапувати повільно. Швидке стікання свідчить про порушення цілісності фільтра.

Після закінчення фільтрування повільно запускають повітря в колбу. В протилежному разі ватний тампон засмокчеться всередину і фільтрат буде інфіковано.

В подальшому всі операції необхідно проводити у ламінар-боксі, підготувавши його до роботи.

7. У полум'ї спиртівки акуратно від'єднати фільтр Зейтца від колби Бунзена.

8. Обпалити горло колби у полум'ї спиртівки.

9. Перелити фільтрат із колби Бунзена у стерильну колбу для подальшого зберігання.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

10. Обпалити горло колби у полум'ї спиртівки і закрити стерильною фольгою.

Лабораторна робота 4.

Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин

Живильне середовище - основний фактор успішного культивування ізольованих органів, тканин і клітин рослин. Середовища по консистенції бувають тверді або агаризовані і рідкі в залежності від мети досліджень. Для приготування твердих живильних середовищ використовують агар-агар – полісахарид, який отримують із морських водоростей. Желатинові середовища непридатні для культури тканин, оскільки желатина є токсичною для рослинних тканин.

Основними компонентами живильних середовищ є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), джерело вуглеводневого живлення (зазвичай сахароза або глюкоза), вітаміни і регулятори росту. Іноді до живильних середовищ включають комплексні органічні добавки (гідролізат казеїну, дріжджовий екстракт, кокосове молоко, ендосперм кукурудзи, екстракти із різних органів рослин тощо). Живильні середовища готують на дистильованій або бідистильованій воді.

Середовище Мурасіге і Скуга – найбільш універсальне і багатоцільове середовище, яке сприйнятливим для рослинних клітин багатьох видів рослин. Дає позитивні результати при калюсоутворенні та підтриманні неорганізованого калюсного росту клітин і викликає індукцію морфогенезу у більшості дводольних видів рослин.

Середовище Гамборга і Евеленга (середовище В-5) - використовується при культивуванні клітин і тканин бобових рослин і злаків.

Середовище Уайта – слугує для укорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації.

Середовище Нічей та китайські середовища – рекомендують для індукції андрогенезу в культурі пиляків, а також для індукції морфогенезу у злаків.

Середовище Као і Михайлюка – для культивування одиничних (або з малою густиною висіву) ізольованих протопластів і клітин.

Мета роботи: Приготувати маточні розчини мікро-, макросолей, вітамінів, регуляторів росту, Fe-хелату та живильні середовища Мурасіге-Скуга, Уайта, Гамборга, Міллера для подальшого культивування на них ізольованих тканин, клітин та органів рослин.

Матеріали і обладнання: макро- та мікро солі, вітаміни, регулятори росту, спирт, ваги, шпателі, плитка, лабораторний посуд, 1N HCl і 1N KOH, магнітний змішувач.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

ХІД РОБОТИ

1. Для зручності приготування живильних середовищ в мірних колбах готують згідно прописам маточні розчини макроелементів, концентрація яких в 10 разів перевищує робочу. Зважують і розчиняють окремо кожен наважку солі в новій порції дистильованої або бідистильованої води. Зберігають маточні розчини в холодильній камері при температурі +4°C протягом шести місяців. При попередньому автоклавуванні їх можна зберігати при кімнатній температурі в темному місці.

2. Маточні розчини мікроелементів готують в концентраціях, які в 100 разів перевищують необхідну згідно пропису. Зберігають в холодильній камері при температурі +4°C в посуді з темного скла протягом 6 місяців.

3. Розчини фітогормонів готують таким чином:

— *ауксини*: 2,4-Д, ІОК, ІМК, НОК, піклорам - розчиняють 100 мг речовини в 0,5-2мл етанолу, підігривають, додають води до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);

— *цитокініни*: Кін, Зеа, БАП - розчиняють 100 мг речовини в 2 мл 0,5N HCl, підігривають, доводять водою до 100 мл.

— *гібереліни*: ГК₃ - розчиняють 100 мг речовини у 100 мл води (концентрація 100 мг/л);

— *абсцизини*: АБК - розчиняють в 3 мл 70% етанолу, доводять водою до потрібного об'єму.

Всі розчини регуляторів росту зберігають у холодильній камері при температурі +4°C.

Скорочення:

2,4-Д - дихлорфеноксіоцтова кислота; НОК - нафтилоцтова кислота;

ІОК - індолілоцтова кислота; ІМК - індолілмасляна кислота;

Кін - кінетин; Зеа - зеатин; БАП - бензиламінопурин;

АБК - абсцизова кислота; ГК₃ - гіберелова кислота.

4. Розчини вітамінів готують наступним чином:

тіамін HCl (B₁), піридоксин (B₆), ніотинову кислоту (PP), аскорбінову кислоту (C), фолієву кислоту (B₉), біотин (H), параамінбензойну кислоту, Са-пантотенат, ціанокобаламін (B₁₂), рибофлавін (B₃) - розчиняють в воді (концентрація 1 мг/мл або 0,1 мг/мл). Розчини вітамінів заморожують в невеликих за об'ємом флаконах і зберігають в морозильній камері при температурі -18°C.

На сучасному етапі для культивування клітин, тканин і органів використовують різноманітні модифікації живильних середовищ, стосовно до окремих випадків культивування тканин і органів різних видів рослин. В табл. 3 наведений склад деяких живильних середовищ.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Таблиця 3.

Склад деяких живильних середовищ (концентрація речовин в г/л)

Компоненти	Мурасіге-Скуга (МС)	Гамборга	Уайта	Міллера
<i>Макросолі:</i> NH ₄ NO ₃	1650	-	-	10000
KNO ₃	1900	2500	80	10000
CaCl ₂ •2H ₂ O	440	150	-	-
MgSO ₄ •7H ₂ O	370	250	360	350
KH ₂ PO ₄	170	-	-	3000
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	-	150	16,5	-
(NH) ₃ SO ₄	-	134	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	200	3470
KCl	-	-	65	650
Na ₂ SO ₄	-	-	200	-
<i>Мікросолі:</i> H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5	16,0
MnSO ₄ •4H ₂ O	22,3	10,0	4,5	44,0
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,025	0,025	-	-
ZnSO ₄ •7H ₂ O	8,6	2,0	1,5	15,0
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,25	0,25	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,8
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,025	0,025	-	-
FeSO ₄ •7H ₂ O	28	28	28	17,8
Na ₂ EDTO•2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,2
<i>Вітаміни:</i> B ₁	0,1	10	0,1	-
B ₆	0,5	1,0	0,1	-
PP	0,5	1,0	0,5	-
<i>Сахароза</i>	30000	20000	20000	-
<i>Агар</i>	0,8 %	0,8 %	0,8 %	-
pH	5,6-5,8	5,5	5,6-5,8	5,6-5,8

Схема приготування живильного середовища:

1. Наважку агару переносять в термостійку склянку, заливають половинним об'ємом (від об'єму середовища) бідистильованої або дистильованої води, залишають для набухання на 20 хвилин і нагрівають на електроплитці до 80-100°C.

2. В мірний циліндр наливають 100-150 мл бідистильованої або дистильованої води, додають точно відміряну кількість розчинів макро- і мікроелементів, вітамінів, сахарозу та інші складові частини середовища.

3. Додають раніше приготовлений розчин агар-агару.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

4. Середовище доводять до потрібного об'єму бідистилятом (дистилятом)

5. Доводять рН середовища до потрібного значення, використовуючи розчин 1N КОН.

6. Розливають тепле середовище у колби Ерленмейєра або біологічні пробірки до 1/2-2/3 об'єму, закривають фольгою або ватними пробками.

7. Середовища стерилізують автоклавуванням протягом 20-25 хв. при тиску 1 атм.

8. При використанні термолабільних компонентів, їх стерилізують фільтруванням через мембранні фільтри (холодна стерилізація).

Після закінчення стерилізації середовища в автоклаві треба повільно зменшувати тиск в апараті і відкривати кришку тільки після того, як внутрішній тиск буде дорівнювати зовнішньому (на манометрі стрілка буде на 0). Інакше, через різку зміну тиску може статися змочування середовищем пробок і навіть їх виштовхування.

Лабораторна робота 5

Стерилізація насіння для отримання стерильних проростків

Мета роботи: отримання стерильних проростків сої для подальшого використання їх як тест-системи на цитокініни та отримання калюсної тканини.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, пінцети, розчин стерилізатора ("Білизна"), насіння сої, стерильні: фільтрувальний папір, дистильована вода, лабораторний посуд (чашки Петрі, стакани хімічні), живильні середовища, 70% розчин етанолу.

ХІД РОБОТИ:

1. Готують розчин стерилізатора у співвідношенні: 1 частина "Білизни" і 3 частини стерильної дистильованої води.

2. Насіння сої поміщають в марлевий мішок, попередньо промивши його мильним розчином.

3. Роботу проводять в ламінар-боксі. Соєві боби занурюють в 70% розчин етанолу на 1-2 хв, а потім насіння переносять у склянку із стерилізатором і залишають на 15-20 хвилин. Три рази по 10 хвилин промивають стерильною дистильованою водою, обсушують на фільтрувальному папері і розміщують в чашки Петрі на живильне середовище.

Склад живильного середовища:

Макросолі по МС	50 мл
Мікросолі по МС	0,5 мл
Fe-хелат	2,5 мл
Вітаміни по МС	0,5мл
Сахароза	20 г
Вода	930 мл
рН 5,6-5,8 до автоклавування	

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

4. Чашки Петрі закривають парафільмом і поміщають в термостат для пророщування насіння і отримання стерильних проростків (регульована температура +23 - 25°C, абсолютна темрява) (рис.4). Через 3-4 доби перевіряють чистоту посіву. Результати досліджень заносять в табл.4.

Таблиця 4.

Насіння	Концентрація розчину "Білизни"	Тривалість стерилізації (хв)	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння через 7 діб		Схожість насіння		Ефективність стерилізації (%)
				штук	%	штук	%	

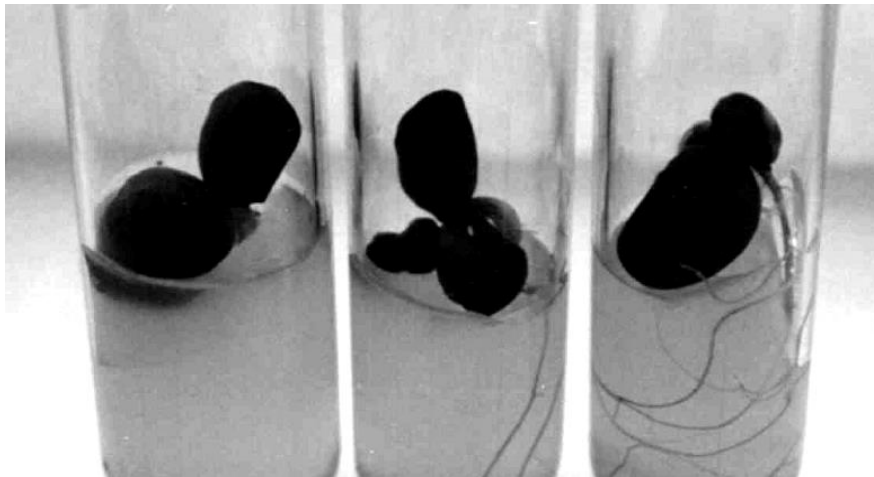


Рис.4. Сім'ядольні листки сої, отримані в культурі *in vitro*

Лабораторна робота 6

Стерилізація коренеплодів моркви та бульб картоплі і введення їх в культуру *in vitro*

Мета роботи: Отримання калусної тканини моркви та картоплі і використання її для подальшого субкультивування.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети, пробкові свердла), спирт етиловий 96%, фарфорові склянки, мильний розчин та стерильні: чашки Петрі, пеніцилінові флакони з живильним середовищем, дистильована вода.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

ХІД РОБОТИ

1. Використовують здорові, не пошкоджені бульбо- та коренеплоди, які зберігались при температурі +4°C. Їх ретельно миють мильним розчином за допомогою щітки, промивають проточною водою, споліскують дистиллятом, очищують.

2. Подальшу роботу проводять в ламінар-боксі. Коренеплід або бульбу наколюють на стерильний ланцет і опускають у фарфорову склянку з 96% етиловим спиртом, потім обпалюють в полум'ї спиртівки.

3. За допомогою стерильного свердла з них виймають циліндри тканин, поміщають у чашку Петрі, відсікають обпалені краї і розділяють на диски шириною 1,5-1,2 мм.

4. Ізольовану тканину переносять у пеніцилінові флакони на калюсогенне живильне середовище, склад якого:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe - хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Гідролізат казеїну	500 мг
Мезо-інозит	100 мг
Кінетин	2 мг
ІОК	2мг
Сахароза	20 г
Агар	8г
Вода	880 мл

pH 5,6-5,8 автоклавування

5 крапель 1N КОН

5. Пеніцилінові флакончики із ізольованими тканинами поміщають у термостат (абсолютна темрява, температура +25-26 °C) для отримання калюсів. Через 3-4 доби перевіряють чистоту культури.

Лабораторна робота 7

Дослідження явища фізіологічної полярності

Полярність — це фізіологічна нерівноцінність протилежних полюсів певної клітини, органа або цілої рослини. У рослин вона виникла як наслідок нерівномірного впливу факторів навколишнього середовища на їх різні частини. Полярність властива всім рослинним організмам, але найбільшого розвитку досягає у вищих рослин. Найбільш яскраво полярність виявляється при укоріненні живців. При цьому на верхньому кінці живця розвиваються бруньки, а на нижньому - утворюються корені, незалежно від положення живця в просторі. Калюс утворюється більш інтенсивно на боці експлантату, який на

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

материнській рослині обернений до кореня. Тому при отриманні калюсу на фрагментах стебла, шматочках кореня моркви, експлантати поміщають на живильне середовище апікальною стороною. У разі ізолювання експлантата із бульб (топінамбур, картопля) полярність не має суттєвого значення. Для повного виключення впливу полярності, експлантати бульб можна поміщати на середовище тангентально. Крім того, якщо шматочок тканини досить великого розміру, його необхідно помістити в середовище апікальним кінцем. При невеликих розмірах експлантата дотримання умов полярності стає менш важливим.

Мета роботи: ознайомитись із явищем фізіологічної полярності при культивуванні рослинних тканин *in vitro*.

Матеріали і обладнання: коренеплоди моркви, картоплі, чашки Петрі зі стерильним калюсогенним середовищем, інструменти (пінцети, ланцети, пробкові свердла), ламінар-бокс, парафільм, етанол.

ХІД РОБОТИ

1. Простерилізувати коренеплоди моркви (робота б).
2. Стерильним пробковим свердлом вичленити циліндр тканини. В разі гладенького зрізу - апікальний кінець, а надіраного - базальний.
3. Циліндр тканини скальпелем розділити на диски товщиною 1,5-2 мм.
4. Частину дисків поміщають на середовище для калюсогенезу апікальною стороною донизу, а другу частину - базальною стороною.
5. Чашки Петрі з рослинним матеріалом культивують у термостаті з регульованою температурою +25-25 °С (абсолютна темрява).
6. Через 5-6 тижнів порівнюють частоту калюсоутворення на експлантатах моркви та картоплі у першому і другому варіантах досліду. Результати занотовують. Частоту калюсоутворення визначають як відсоток експлантатів, які утворили калюс від загальної кількості висаджених експлантатів.

Тема 2. Культура калюсної тканини

Відомо декілька типів культур клітин і тканин рослин залежно від способу їх одержання, умов культивування і походження. При культивуванні тканин на щільній поверхні живильного середовища утворюються калюсні тканини. Калюс («мозоль») може утворюватись як на ізолюваних шматочках тканини (експлантатах) в умовах *in vitro*, так і на рослині при пораненні.

Калюсна культура - це неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих клітин, в які перетворюються спеціалізовані і меристематичні клітини при їх культивуванні на специфічних живильних середовищах *in vitro*. Клітини калюсу мають велике ядро і високий вміст нуклеїнових кислот (РНК і ДНК). Деякі клітини здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Відомий вчений-ботанік Н.Кренке більше 50 років тому присвятив частину своїх робіт вивченню ролі калюсної тканини і встановив, що в інтактній рослині калюсна тканина виконує наступні функції:

- захисні (захищає місця ушкоджень);
- запасні - запасання живильних речовин, синтез вторинних речовин;
- регенераційні (регенерацію втрачених органів – коренів, пагонів).

Калюсну тканину в умовах *in vitro* можна індукувати із будь-якого органа живої тканини рослин (успіх залежить від виду рослини чи тканини і використання відповідних методичних прийомів). Обов'язковою умовою дедиференціації рослинних клітин і перетворення їх в калюсні є присутність у живильних середовищах представників двох груп фітогормонів: ауксинів і цитокінінів. Ауксини викликають процес дедиференціації клітин, а цитокініни – проліферацію (поділ) дедиференційованих клітин. Якщо на безгормональне живильне середовище помістити шматочок стебла, листка, кореня (без верхівки) або будь-якого іншого рослинного експлантату - поділ клітин не відбувається і калюсна тканина не утворюється, що пов'язано з нездатністю диференційованих клітин до поділу.

Кожна клітина проходить три фази росту: поділ, розтягнення, диференціювання. Характерною рисою заключної фази росту є потовщення вторинної клітинної оболонки і втрата клітиною здатності до поділу. Для того щоб диференційовані клітини знову набули здатності до поділу, повинна відбутись їх дедиференціація, тобто, клітинам необхідно повернутись в меристематичний стан.

Для індукування калюсної тканини стерильні листки, черешки, сегменти стебла розділяють на смужки і переносять на відповідне живильне середовище. При цьому клітини рослин, які знаходяться на кінцевій стадії диференціації, під дією індукторів клітинного розмноження (ауксинів та цитокінів, у співвідношенні 10:1) переходять в дедиференційований стан і відновлюють меристематичну активність, яку вони втратили в процесі диференціації. Розмноження дедиференційованих клітин призводить до неорганізованого росту, у результаті чого утворюється калюсна тканина.

Калюсна тканина *in vitro* в основному буває білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого кольору. Дуже рідко вона може мати інтенсивне зелене або червонувате забарвлення, що залежить від виду рослин, типу експлантату, умов культивування. Темно-коричневе забарвлення часто виникає при старінні калюсних клітин і пов'язане з нагромадженням в них окислених фенольних сполук (хінонів). Для запобігання цього процесу або зниження його активності в живильні середовища вносять антиоксиданти.

Калюсна тканина має вигляд аморфної маси тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури (рис.4).



Рис. 4. Типи калюсних тканин вищих рослин (за Т.А. Егоровою та ін., 2003)

За класифікацією Р.Г. Бутенко існує три типи калюсних тканин:

- пухка, що складається із сильно обводнених клітин і легко розпадається на окремі дрібні агрегати;
- середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;
- щільна, у якій диференціюються елементи камбію і провідної системи.

Будь-який тип щільності калюсної тканини можна перетворити в інший при використанні для цього певних прийомів: замінюючи один ауксин на інший (наприклад, ІОК – на 2,4-Д); змінюючи концентрацію ауксину в живильному середовищі; збільшуючи або зменшуючи концентрацію солі хлориду кальцію в живильному середовищі; додаючи в живильні середовища ферменти (у випадку одержання калюсної тканину пухкого типу).

Для запобігання старіння, втрати здатності до поділу і загибелі калюсних тканин, первинний калюс, який виникає на експлантаті через 4-6 тижнів переносять (пасирують) на свіже культуральне середовище. При регулярному пасеруванні здатність до поділу може підтримуватись протягом десятків років.

Ростова крива калюсних клітин має S-подібну форму і включає п'ять фаз, які легко можна виявити у суспензійних культурах калюсних клітин. Під час першої, *латентної*, або *лаг-фази*, збільшення числа або маси клітин не відбувається, проте проходять фізіологічні зміни, спрямовані на активний поділ клітин. Друга фаза – *логарифмічна*, або фаза *експоненціального росту* – характеризується найбільшою мітотичною активністю, збільшенням маси калюсної культури і прискоренням росту клітин. Третя фаза – *лінійна*, під час проходження якої швидкість росту клітин залишається постійною. Четверта фаза – *уповільненого росту* характеризується різким зниженням мітотичної активності клітин. У п'ятій фазі – *стаціонарній*, ростова крива виходить на плато, тобто число клітин, які діляться, є еквівалентним числу відмерлих. В цей

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

період починається деградація клітин, яка врівноважується зростанням числа клітин за рахунок їх поділу. Загалом швидкість наростання клітинної маси дорівнює нулю. Після стаціонарної фази настає *загибель* (деградація) клітин, під час якої число і маса живих клітин зменшується.

Калюсні клітини і тканини вищих рослин зберігають багато фізіолого-біохімічних особливостей, властивих нормальним спеціалізованим клітинам материнської рослини. Зокрема таких, як морозостійкість, стійкість до абіотичних стресів (температури, засолення, осмотично активних речовин, фотоперіодичної реакції, пов'язаної зі збереженням фітохрому) та здатності до синтезу вторинних метаболітів. Разом з тим у калюсних тканинах виникають окремі властивості, що відрізняють їх від нормальних, а саме здатність до довготривалого культивування *in vitro*, утворення специфічної популяції соматичних клітин (нестатевих), фізіологічна асинхронність і генетична гетерогенність.

Перехід клітин *in vitro* із диференційованого стану до дедиференціації і активного клітинного поділу зумовлений зміною активності генів (епігеномною мінливістю). Активування одних генів і репресія інших призводить до зміни в білковому складі клітин. В калюсних тканинах виникають специфічні білки і одночасно зникають або кількісно зменшуються білки, характерні для фотосинтезуючих клітин листка. У дводольних рослин процес репресії і дерепресії генів, покладений в основу дедиференціації, відбувається легше, ніж у однодольних.

Фізіологічна асинхронність – найважливіша стійка властивість популяції соматичних (калюсних) клітин, яка полягає в тому, що клітини одночасно перебувають у різних фазах росту: поділу, росту, старіння. Тому загальний фізіологічний стан такої популяції оцінюють за станом більшості клітин. Якщо за допомогою специфічних впливів синхронізувати проліферацію клітин популяції, то вже через три-чотири поділи вона знову стане асинхронною. Виникнення асинхронності клітин обумовлюється різними причинами:

- особливостями виду, сорту, генотипу індивідуальної рослини, а також особливостями експлантату;
- стресами культивування, наприклад, застосування неоптимального живильного середовища для даного виду клітин;
- зміною балансу в середовищі концентрації ендогенних і екзогенних гормонів протягом вирощування культури;
- генетичною гетерогенністю клітин і клонів;
- аномаліями мітотичного циклу клітин *in vitro*;
- фізичними факторами (температура, світло, аерація).

Генетична гетерогенність – це нестабільність геному та генетична гетерогенність клітин соматичної популяції. В калюсних і суспензійних культурах зустрічаються клітини з диплоїдним набором хромосом, властивим вихідній рослині, а також поліплоїдні клітини, які містять 3, 4, 5 і більше

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

хромосомних наборів. Поряд з поліплоїдією в культурі калюсних тканин нерідко спостерігається анеуплоїдія (збільшення або зменшення хромосомного набору на декілька хромосом). Крім зміни плоїдності культивування калюсних клітин і тканин *in vitro* викликає появу хромосомних аберацій і генних мутацій, які виявляються за зміною морфології і фізіолого-біохімічних властивостей клітин. Генетично стабільними вважаються такі тканини, як верхівкові меристеми і камбій. Однак генетична гетерогенність є необхідною умовою існування популяції клітин і основою для їх адаптації до різних умов культивування.

Поява генетичної гетерогенності обумовлена:

- генетичною гетерогенністю вихідного матеріалу, різною плоїдністю диференційованих клітин. Диплоїдними є тільки меристематичні клітини, які активно діляться;
- порушенням корелятивних зв'язків при ізолюванні ділянок тканин (експлантатів) рослин і їх розміщення на живильному середовищі;
- дією компонентів живильного середовища. Екзогенні гормони і стимулятори росту, що входять до складу живильних середовищ можуть спричинювати мутагенний вплив. Найбільш активним мутагенним препаратом є 2,4-Д, який входить до складу більшості живильних середовищ, цитокініни - сприяють поліплоїдизації клітин;
- тривалим субкультивуванням, при якому накопичуються генетично змінені калюсні клітини.

За постійних умов культивування після п'яти-шести перепасирувань новий каріотип клітинної популяції, як правило, стабілізується. Зміна фізичних або трофічних факторів призводить до нових генетичних змін.

Генетична різноманітність калюсних клітин дозволяє використовувати їх для клітинної селекції на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів і підвищену продуктивність. Однак генетична гетерогенність популяцій калюсних клітин в культурі *in vitro* не впливає на збереження в їх геномі основних властивостей виду і рослини-донора.

Гормонезалежність. Калюсні тканини в переважній більшості вищих рослин здатні до дедиференціації і проліферації тільки при наявності гормонів у живильному середовищі. Виняток становлять незрілі зародки пшениці і сім'ядолі соняшнику. Перші утворюють калюсну тканину на живильному середовищі з 2,4-Д, але без цитокінінів, другі, навпаки – на середовищі, що містить тільки цитокініни. Очевидно, така специфічність пов'язана з ендогенним вмістом фітогормонів і з компетентністю клітин.

Необхідно відзначити, що при тривалому культивуванні у калюсних тканин може виникати специфічна властивість гормонезалежності, тобто, вони набувають здатності рости без гормонів і стають автономними по відношенню до ауксинів і цитокінінів. В результаті цього виникає їх подібність до пухлинних клітин, які різко відрізняються від нормальних калюсних тканин. Клітини, які в процесі культивування набули автономності в

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

гормональному середовищі, одержали назву «звиклих». Тканини, утворені «звиклими» клітинами, називають «хімічними пухлинами». За зовнішніми ознаками (забарвлення, консистенція та ін.) гормонезалежні тканини не відрізняються від калюсних. Основною їх відміною є набування здатності до інтенсивного синтезу гормонів. Ця властивість є загальною, як для «звиклих», так і пухлинних клітин.

Окрім «звиклих» клітин або «хімічних пухлин», існують пухлини рослинного походження. Генетичні пухлини виникають на міжвидових гібридах рослин. Пухлини бактеріального або вірусного походження, найчастіше утворюються при інфікуванні рослин агробактеріями. Так, *Agrobacterium tumefaciens* викликає утворення корончатих галлів - пухлин, найбільш поширених у природі, *A. rhizogenes* – бородатих коренів, *A. rubi* – стеблових галлів, подібних до корончатого гала. Перетворення рослинних клітин у пухлинні пов'язано із проникненням у них ДНК бактеріальної клітини, а саме Ті – плазмиди (Т-ДНК), що значно змінює властивості клітини, у тому числі експресію генів, які контролюють синтез ауксинів і цитокінінів.

«Звиклі» тканини, як і пухлинні, в більшості випадків не здатні до нормальної регенерації рослин, і утворюють тільки *тератоми* (химерні органоподібні структури). Однак в окремих випадках при варіюванні складу живильних середовищ у тканин вдається запобігти наближенню порогу «звикання» клітин і домогтися одержання рослин-регенерантів після все більш довготривалого пасирування тканинних культур. Отже, як би довгостроково не вирощувалися клітини в ізольованій культурі, у них зберігається генетична «пам'ять» своє походження. Гормонезалежність «звиклих» клітин пов'язана зі зміною активності генів, відповідальних за синтез ферментних білків, що беруть участь у побудові молекул гормонів, тобто, «звиклим» тканинам і рослинним пухлинам однаковою мірою властива гормонезалежність. Але, якщо в рослинних пухлинах ця здатність виникає при перенесенні чужорідного гена із бактеріальної клітини в рослинну, то в клітинах «хімічних» пухлин («звиклих» тканинах) - вона відбувається, головним чином, за рахунок епігенетичних змін, пов'язаних з депресією генів, які відповідають за синтез гормонів або їх мутаціями.

Таким чином, клітини вищих рослин *in vitro* – це унікальна клітинна популяція, у якій кожна клітина є окремим організмом, здатним до автономного розвитку. При регулярному перепасируванні здатність клітин до поділу і розмноження може зберігатись протягом тривалого часу. Відомі калюсні тканини, які підтримуються в культурі *in vitro* до 60 – 70 років.

Лабораторна робота 8.

Отримання і культивування калюсної тканини сої

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Калюсна тканина утворюється із первинної або вторинної меристеми, а також із паренхіми, яка прилягає до цих меристем та вторинних судинних тканин. Цей процес залежить від розмірів експлантату та клітин, що входять до його складу. Первинний експлантат, зазвичай, має розмір 5-10мм³ і масу 20-100мг. У великих за розміром експлантатів, які відрізняються різноманітними наборами клітин виникають більш складні взаємовідносини між основною тканиною фрагменту та клітинами, що започатковують ріст калюсу. Ініціація калюсу із паренхімної або камбіальної тканини активується наявністю в експлантаті зрілої судинної тканини.

Мета роботи: Отримання калюсної тканини сої для подальшого її субкультивування і використання як тест-системи на цитокініни.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, чашки Петрі, інструменти (пінцети, ланцети), стерильні проростки сої, пеніцилінові флакони з калюсогенним живильним середовищем.

ХІД РОБОТИ

1. Використовують попередньо отримані сім'ядолі сої (робота 5).
2. Роботу проводять в ламінар-боксі. Сім'ядолі сої в чашках Петрі розділяють стерильним ланцетом на сегменти однакового розміру.
3. Експлантати сім'ядолей поміщають в пеніцилінові флакончики на калюсогенне живильне середовище, яке містить:

Макросолі по Міллеру	100 мл
Мікросолі по Міллеру	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни за Уайтом	1 мл
Гліцин	2 мг/л
Кінетин	0,5 мг/л
ІОК	2 мг/л
Сахароза	20 г
Агар	6 г
pH	5,6-5,8 до автоклавування.

4. Флакони з експлантатами сої переносять в термостат (температура +25°C, абсолютна темрява) для отримання калюсної тканини.

5. Отримані калюси замальовують і описують.

Лабораторна робота 9.

Перенесення (пасаж) калюсної тканини на свіже

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

живильне середовище

Калюсну тканину можна підтримувати в культурі *in vitro* протягом необмеженого часу, при періодичному поділі на фрагменти і пересаджуванні (перепасируванні) на нове живильне середовище. В процесі перепасирування тканин калюс переносять із колби, пробірки або пеніцилінового флакончика в стерильну чашку Петрі. Після асептичного видалення старих некротичних ділянок та шматочків агарози попереднього середовища, калюсну тканину розділяють на рівні частини і переносять на свіже живильне середовище.

Мета роботи: перенесення калюсної тканини на свіже живильне середовище.

Матеріали і обладнання: культура калюсної тканини соняшника, ріпаку, пшениці, цукрових буряків, пеніцилінові флакони із стерильним живильним середовищем, стерильні пінцети, скальпелі та чашки Петрі.

ХІД РОБОТИ:

1. Первинний калюс перенести із пеніцилінового флакону в стерильну чашку Петрі.
2. Відокремити ланцетом старі некротизовані ділянки та шматочки агаризованого середовища.
3. Калюсну тканину розділити на рівні шматочки (експлантати).
4. Шматочки калюсу перенести у пеніцилінові флакони із стерильним калюсогенним живильним середовищем, вдавлюючи їх пінцетом в агар.
5. Флакони помістити в термостат при температурі +25°C та вологості повітря 60% і культивувати протягом 3 – 4 тижнів.
6. Провести визначення ростових характеристик утворених калюсних тканин і результати занести в лабораторний журнал.

Лабораторна робота 10.

Отримання калюсної тканини з листків тютюну

В біотехнології найчастіше використовують види рослин, які в звичайних умовах легко укорінюються, регенерують, утворюють калюс. На живильних середовищах з високим вмістом ауксинів (2,4-Д) клітини експлантату дедиференціюються і втрачають попередню будову і функції. Процес дедиференціації клітин залежить від генетичних особливостей експлантату і починається із збагачення їх елементами цитоплазми, а саме мікротрубочками, мембранами ендоплазматичного ретикулуму і комплексу Гольджі, рибосомами. При цьому зникають хлоро- і хромoplastи, продукти їх життєдіяльності, спостерігається багатоядерність клітин, збільшення числа хромосом та укрупнення розміру вакуолей.

Клітини тютюну легко дедиференціюються і переходять до поділу, утворюючи швидкоростучу калюсну тканину, що робить тютюн зручною

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

моделлю для вивчення особливостей метаболічних процесів калюсних тканин. Розроблено багаточисельні методи отримання та культивування калюсу практично з будь-якої частини рослини тютюну. Для культивування калюсів із листків тютюну використовують середовище Мурасіге-Скуга (МС) при доповненні його ауксинами (2,4-Д).

Мета роботи: освоєння методу приготування живильного середовища для отримання калюсної культури тютюну.

Обладнання та матеріали: чашки Петрі з стерильним середовищем МС для індукції калюсогенезу, «Білизна», колби зі стерильною дистильованою водою, стерильні ланцети та пінцети.

Об'єкт дослідження: рослини тютюну, вирощені в польових або тепличних умовах залежно від пори року

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильні середовища МС з додаванням:
 - а) 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП
 - б) 1,0 мг/л ІОК + 0,2 мг/л БАП
2. Листки тютюну піддати стерилізації (розчин «Білизни» 1:3) протягом 10 хв і три рази по 5 хв. промивають стерильною дистильованою водою.
3. Стерильним скальпелем вичленити елементи стебла біля основи довжиною 1,2-2см і шириною 1см. Для покращення калюсогенезу зробити насічки по всій довжині сегменту.
4. Експлантати помістити на живильні середовища в пеніцилінові флакончики (перед кожним етапом інструменти повторно обпалюють в полум'ї спиртівки).
5. Експлантатами культивують в термостаті при температурі +25°C в умовах абсолютної темряви.
6. Через 2-4 тижні замальовати та провести порівняльну оцінку, отриманих на різних середовищах калюсів (рис.6).

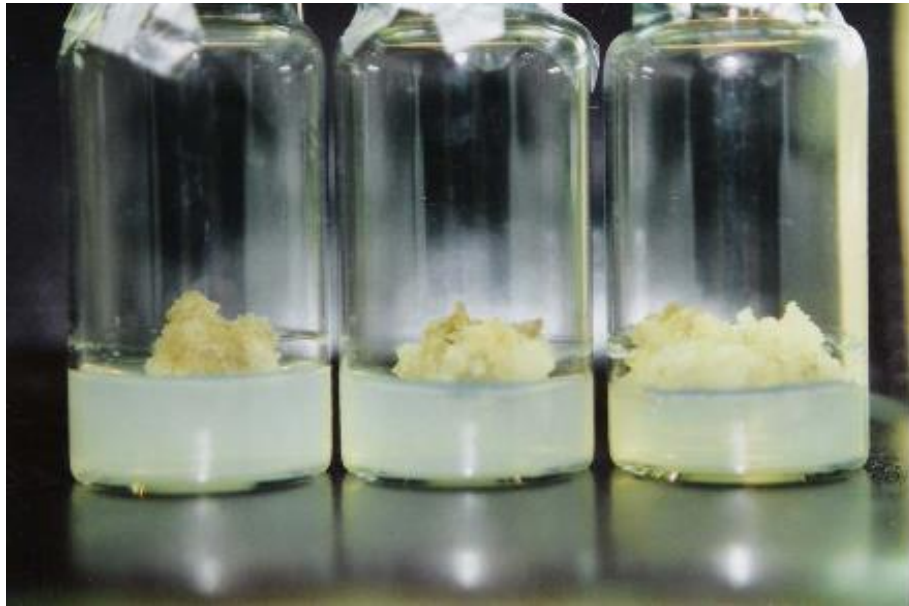


Рис. 6. Калюсні тканини тютюну, отримані на середовищах з різними концентраціями регуляторів росту.

Лабораторна робота 11.

Отримання калюсів з незрілих зародків і вузлів кущів пшениці

Калюсні тканини пшениці можна використовувати для вивчення солестійкості, стійкості до температурного стресу, отримання суспензій і протопластів. Вперше калюси з різних органів пшениці на штучних живильних середовищах були отримані у 1968 р. Для індукції калюсогенезу зазвичай використовують стерильні рослини, вирощені із зародків на безгормональних середовищах. Особливістю живильних середовищ для індукції та культивування калюсних тканин у злаків є високий рівень регуляторів росту ауксинового типу, в основному 2,4-Д і НОК (до 10 мг/л).

Мета роботи: отримання калюсів із незрілих зародків і вузлів кущів пшениці.

Обладнання та матеріали: ламінар-бокс, пробірки з живильним середовищем МС, «Білизна», стерильна дистильована вода, препарувальні голки, пінцети, скальпелі, стерильний папір, флакони з 96% спиртом, спиртівка.

Об'єкт дослідження: рослини на стадії молочної зрілості, вирощені в тепличних умовах і пробіркові рослини пшениці.

ХІД РОБОТИ

1. Незрілі зернівки пшениці ізолюють на 12 добу від початку цвітіння і зберігають в холодильній камері при температурі +4⁰С.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

2. Ізольовані незрілі зернівки поміщають в дезінфікуючий розчин (розчин «Білизни» 1:2) на 10 хв і промивають три рази по 10 хв стерильною дистильованою водою.

3. Зернівки переносять в стерильні чашки Петрі і препарувальною голкою вичленяють зародки та поміщають у пробірки на безгормональне живильне середовище. Культивують у світловій культуральній кімнаті при температурі +25°C.

4. Пробіркові рослини пшениці виймають за допомогою пінцету з довгими кінцями і поміщають на стерильні паперові матраси. Розділяють скальпелем на невеликі фрагменти по 5-10 мм і виділяють міжвузля з ділянками листової піхви. Переносять експлантати на живильне середовище, склад якого

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe - хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Гідролізат казеїну	500 мг
Мезо-інозит	100 мг
2,4-Д	4 мг
Сахароза	20 г
Агар	8г
Вода	880 мл
рН	5,6-5,8 автоклавування
5 крапель 1N КОН	

5. Культивують в світловій культуральній кімнаті при температурі +25°C.

6. Через 2 тижні, утворені калюсні тканини поміщають на столик мікроскопа і розглядають при невеликому збільшенні (x10). Замальовують і роблять висновки про їх морфологічні особливості.

Лабораторна робота 12.

Отримання калюсів із корінців квасолі

Для багатьох тканин вихідних експлантатів властива фізіологічна полярність. Тому калюс краще утворюється на стороні експлантата, яка знаходиться ближче до апікальних меристем кореня. Кінчики кореня легко утворюють калюс при їх горизонтальному розміщенні на живильних середовищах, а сегменти стебла – при вертикальному. Найкращим експлантатом для культивування на живильних середовищах є стерильні корінці, отримані при пророщуванні насіння в стерильних умовах.

Мета роботи: отримання калюсу із корінців квасолі.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Обладнання та матеріали: чашки Петрі з живильними середовищами для індукції калюсогенезу, стерильні чашки Петрі, 6%-й розчин хлораміну, препарувальні голки, пінцети, скальпелі, флакони з 70% спиртом і стерильною дистильованою водою.

Об'єкт дослідження: насіння квасолі.

ХІД РОБОТИ

1. Насіння квасолі поміщають в чашки Петрі (по 15 насінин на чашку), додають розчин хлораміну до повного його занурення в рідину, залишають на 20 хв і промивають насіння стерильною дистильованою водою три рази по 15 хв.

2. Стерильне насіння заливають стерильною дистильованою водою і залишають для набрякання на 24 год.

3. Насіння з пошкодженою шкіркою видаляють, а життєздатне - повторно стерилізують 6%-м розчином хлораміну протягом 20 хв. Промивають насіння стерильною дистильованою водою три рази по 5 хв. і переносять в стерильні чашки Петрі (по 5 насінин на чашку).

4. Притримуючи стерильним пінцетом насінину, скальпелем надрізають оболонку. Стерильним скальпелем і препарувальною голкою ізолюють корінці довжиною 2-3мм і переносять для промивання в чашки Петрі зі стерильною дистильованою водою (по 15 корінців в чашку).

5. Корінці за допомогою стерильної препарувальної голки поміщають на поверхню агаризованого середовища, злегка вдавлюючи в агар для забезпечення кращого контакту з живильним середовищем, склад якого:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe - хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Гідролізат казеїну	500 мг
Мезо-інозит	100 мг
2,4-Д	2 мг
Кінетин	0,2мг
Сахароза	20 г
Агар	8г
Вода	880 мл
рН	5,6-5,8 автоклавування
5 крапель 1N КОН	

6. Культивують при температурі +25°C в термостаті (абсолютна темрява).

Тема 3. Облік ростових характеристик калюсної культури

Відомо, що окремі калюси одного варіанту досліду відрізняються за консистенцією, забарвленням, здатністю до позеленіння на світлі і характеризуються різною інтенсивністю росту. Така варіабельність зумовлюється тим, що інокулюми для досліджень беруть як з різних ділянок вихідної калюсної тканини, так і з різних калюсів. Тому окремі варіанти дослідів з калюсними культурами необхідно проводити в шестикратній повторності.

Для обліку параметрів росту калюсних тканин використовують якісні та кількісні критерії. Якісну оцінку проводять при вивченні процесів органогенезу в недиференційованій культурі тканин і кореляцій між органами, за умови їх утворення, а кількісну - при вивченні дії на ріст культури різних екзогенних факторів. З цією метою визначають:

1. Збільшення сирої маси в кінці досліду, або динаміку росту калюсних тканин (через кожні 7 днів протягом всього періоду культивування) за формулою: $W_t - W_0$.

Величину приросту маси калюсних тканин можна також визначати у відсотках:

$$\frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

2. Приріст маси калюсної тканини за певний проміжок часу розраховують за формулою:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \text{ де}$$

ΔW — приріст (сирої або сухої) за певний проміжок часу,

W_t — кінцева маса калюсної культури, г,

W_0 — початкова маса, г.

3. Таким же чином при необхідності проводять облік результатів накопичення маси сухої речовини за загальноприйнятими методиками. Зразки беруть із середньої проби.

4. Площу поверхні калюсної маси за загальноприйнятими методиками.

5. Кількість клітин, використовуючи метод Брауна (робота 13).

Лабораторна робота 13.

Підрахунок клітин за методом Брауна

Ріст калюсних тканин відбувається шляхом поділу клітин або їх розтягнення. Підрахунок клітин дає можливість визначити, які процеси

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

переважають при збільшенні калюсної маси тканин. Це дає можливість також розрахувати середню масу однієї клітини.

Мета роботи: підрахунок кількості клітин і визначення середньої маси однієї клітини.

Матеріали і обладнання: мікроскопи, ваги, камера Фукса-Розенталя, предметне скло, покрівельні скельця, калюсна тканина гвоздики, топінамбуру, хімічні стакани (0,1-0,05 л), скляні палочки.

ХІД РОБОТИ

1. Беруть три наважки калюсних тканин по 0,25 г або по 0,5 г, поміщають в пробірки і додають 5 мл розчину для мацерації.

2. Проводять мацерацію калюсних тканин топінамбура, гвоздики протягом 8-10 годин, підбираючи час інкубації для кожної культури експериментальним шляхом, застосовуючи одну із сумішей:

- суміш 5% хромової і 5 % соляної кислот;
- 5-10% соляна кислота.

3. Перед підрахунком клітин ретельно струшують вміст пробірки для одержання їх рівномірної суспензії. Для попереднього визначення розміру клітин краплю суспензії скляною паличкою наносять на предметне скло, накривають покрівельним скельцем і розглядають під мікроскопом (x30). В разі дрібного розміру клітин, отриману суспензію розводять в 2 рази.

4. Краплю суспензії поміщають на лічильну сітку камери Фукса-Розенталя, накривають покрівельним скельцем, притираючи його до бічних граней сітки до появи кілець Ньютона. Під мікроскопом при великому збільшенні (від x30 до x100) проводять підрахунок клітин у чотирьох великих квадратах, розташованих по діагоналях сітки лічильної камери (рис. 7).

5. Для повторного підрахунку клітин камеру промивають дистильованою водою, висушують фільтрувальним папером і заповнюють суспензією. Операцію повторюють три рази для кожної проби.

6. Кількість клітин в 1 г калюсної тканини обчислюють за формулою:

$$N = \frac{N \cdot V \cdot 10^3}{d \cdot 0,2}, \text{ де}$$

N – кількість клітин в 1 г тканини; n – кількість клітин в одному великому квадраті; d – наважка, г; 0,2 – об'єм камери; 10 – перерахунок; V – об'єм суспензії, мл.

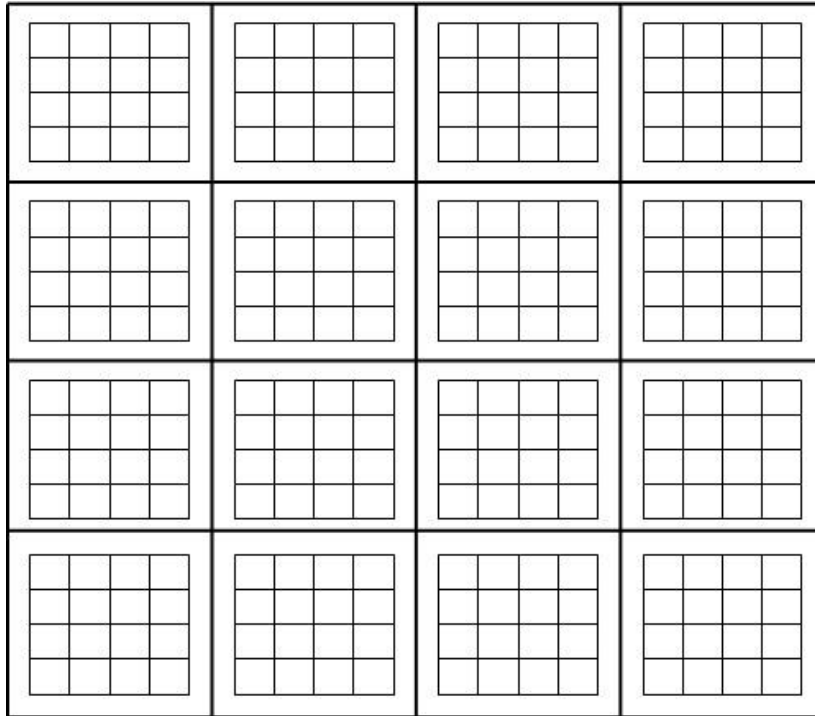


Рис 7. Сітка лічильної камери Фукса-Розенталя.

Лабораторна робота 14.

Пересаджування калюсної тканини на свіже живильне середовище з різним складом гормонів

Калюсні тканини можна вирощувати в культурі *in vitro* протягом тривалого часу. Для цього необхідно проводити періодичне пересаджування (пасаж) невеликої частини утворених клітин на свіже живильне середовище через кожні 3-4 тижні (в залежності від інтенсивності росту). Найбільш «старим» вважають штаб клітин, одержаний французьким вченим Р.Готре з коренеплоду моркви іще в 1938 році, який і дотепер вирощують в лабораторіях багатьох країн світу. У Франції створено музей калюсних культур.

Мета роботи: визначення динаміки росту калюсних тканин в залежності від гормонального складу живильного середовища.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), чашки Петрі, стерильні калюсні тканини, пеніцилінові флакони з живильними середовищами різного складу.

ХІД РОБОТИ

1. Готують середовище з різним вмістом гормонів (табл.5) і автоклавують 25 хв при 1атм.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

2. На кожний варіант середовища в пеніцилінові флакони висаджують калюси томатів, топінамбура, картоплі, гвоздики.

Таблиця. 5

Склад живильного середовища	Живильні середовища			
	№1	№2	№3	№4
Макросолі МС	100мл	100мл	100мл	100мл
Мікросолі МС	1мл	1мл	1мл	1мл
Вітаміни МС	1мл	1мл	1мл	1мл
Гідролізат казеїну	500мг	500мг	500мг	500мг
Інозит	100мг	100мг	100мг	100мг
БАП	0,2мг			
ГК ₃		0,2мг		
ІОК			0,2мг	
НОК				0,2мг
Fe-хелат	5мл	5мл	5мл	5мл
H ₂ O	865мл	865мл	865мл	865мл
Сахароза	20г	20г	20г	20г
Агар	8г	8г	8г	8г

3. Калюсні культури вирощують в термостаті при регульованій температурі +23-26 °С, абсолютній темряві і вологості повітря 70-80%.

4. Через кожні 7 днів визначають сиру масу калюсу. Отримані дані заносять в таблицю.

Таблиця 6.

Назва культури	№ живильного середовища	Сира вага, г				
		на 1-й день	7-й день	14-й день	21-й день	28-й день

5. На основі одержаних результатів будують графіки динаміки росту калюсних тканин в залежності від дії тих чи інших регуляторів росту. Для цього на горизонтальній осі відкладають номери калюсів, на вертикальній - масу калюсу, мг.

Тема 4. Морфогенез і регенерація в культурі калюсних тканин. Одержання рослин – регенератів

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Розвиток багатоклітинних організмів - одна із найбільш складних проблем біології. У вищих рослин молекулярні і клітинні функції пов'язані з організменним контролем і нормами реакції на зовнішні умови. При вивченні онтогенезу рослин можна вибрати різні підходи.

1. Вивчення розвитку рослини, вважаючи її єдиною складною, саморегулюючою системою.

2. Детальне вивчення молекулярних, біохімічних і фізіологічних функцій різних органів і тканин.

3. Моделювання процесів за допомогою більш простих систем, якими є органи, тканини, клітини та ізольовані протопласти *in vitro*.

Великого поширення набув підхід моделювання процесів онтогенезу на більш простих системах. Перевага цього підходу полягає в тому, що немає необхідності постійно враховувати результати взаємодії органів у цілісній системі рослинного організму. Крім того, експериментатор сам може вибирати і контролювати умови культивування об'єктів *in vitro*, без вивчення процесів у відповідності з послідовно діючою «життєвою програмою» рослини. Найбільш важливим при цьому є можливість використання тотипотентності рослинних клітин поза організмом, що дозволяє вивчати перепрограмування клітини і її перетворення в рослину. Тотипотентність – це здатність окремої соматичної клітини повністю реалізувати свою програму розвитку і дати початок цілому рослинному організму. Синонімом тотипотентності *in vitro* є термін «поліпотентність». Обидва ці терміни означають, що перепрограмування клітини *in vitro* може проходити різними способами і викликати диференціювання в різних напрямках.

Так, розвиток калюсної клітини після завершення дедиференціації може відбуватися трьома шляхами.

Перший шлях – можливе диференціювання на рівні клітин, тканин, органів, що призводить до вторинної регенерації цілої рослини.

Другий шлях – це втрата клітиною здатності до вторинного диференціювання і регенерації рослини, стійка дедиференціація і набуття здатності до росту на безгормональному середовищі, тобто перетворення в «хімічну» пухлину. Такі властивості часто характерні для клітин старих пересаджуваних культур.

Третій шлях – це нормальний цикл розвитку калюсної клітини, який завершується її старінням і відмиранням. Тобто, клітина проходить вторинне диференціювання і призупиняє поділ (стаціонарна фаза росту). Таке диференціювання закріплює за клітиною властивості старої калюсної клітини і не призводить до морфогенезу.

У культурі калюсних тканин морфогенезом називають виникнення організованих структур з неорганізованої маси клітин. Тому найбільший інтерес викликає перший шлях, що фактично представляє морфогенні процеси. Вторинне диференціювання калюсної клітини може завершитись утворенням у ній окремих диференційованих клітин, які мають відповідну будову і

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

виконують специфічні функції. Наприклад, утворення *епібластів* – клітин, в яких запасуються вторинні метаболіти. Необхідно зазначити, що це найбільш простий тип диференціації калюсної клітини. Більш складне гістологічне диференціювання завершується утворенням в калюсі різних тканин: волокон, трихом, елементів ксилеми (трахеї і трахеїди) і флоєми (ситовидні трубки та клітини-супутниці). До найскладніших видів вторинної диференціації відносяться *органогенез* (утворення органів) і *соматичний ембріогенез* (утворення з соматичних клітин ембріодів – біполярних зародкоподібних структур).

Всі типи диференціації здійснюються тільки завдяки властивості тотипотентності, оскільки будь-яка рослинна клітина містить повний набір генів, характерний для донорного організму, з якого вона була виділена. Тобто, потенційні можливості всіх клітин рослин є однаковими, і кожна клітина в певних умовах може дати початок цілому організму. Однак, слід наголосити, що реально детермінується тільки одна з 400-1000 клітин, що, очевидно, пов'язано з компетентністю і фізіологічним станом клітини. Так, в експлантатах стеблового походження компетентність до дії екзогенних фітогормонів (а, отже, і здатність до морфогенезу) проявляють тільки клітини епідермальних та субепідермальних тканин. Клітини можуть набувати компетентності в процесі культивування калюсної тканини в умовах індукуючого морфогенезу, протягом часу, який змінюється в широких межах. Крім того, істотна роль в процесі диференціації належить генотипу рослини-донора, умовам і фізичним факторам культивування.

Детерміновані калюсні клітини, здатні до вторинного диференціювання (*клітини-ініціали*), характеризуються загальними рисами. Відокремлюючись від інших калюсних клітин вони утворюють потовщену клітинну стінку, мають більший розмір ядра, менші розміри вакуолей та інтенсивно накопичують запасні речовини. У клітинах-ініціалах відбувається синтез відповідних білків, інтенсифікується пентозофосфатний шлях розщеплення гексоз, а між клітинами, які формують меристематичні осередки, відновлюються плазмодесми, практично відсутні в масі калюсних клітин.

Гістогенез. Головну роль у перетворенні калюсних клітин в судинні елементи відіграють фітогормони, в основному ауксини. При вивченні впливу апікальної меристеми пагона (місця синтезу ауксинів) на гістогенез у калюсній тканині, встановлено, що нижче місця апексу в калюсній тканині починають утворюватись судинні елементи. Цей же ефект спостерігається також при екзогенному нанесенні на калюс розчину ауксину з сахарозою. При підвищенні концентрації сахарози утворювались елементи флоєми, а в разі її зниженні – елементи ксилеми. Причому таку властивість до сумісної дії з ауксином проявляла тільки сахароза, що свідчить про її можливу регуляторну роль. При додаванні до гормону інших вуглеводів індукція гістогенезу не відбувалась. У деяких випадках стимуляторами гістогенезу, крім ауксинів, можуть бути й інші

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

фітогормони. Так, відмічено, що в калюсних тканинах сої цей процес починається під впливом гіберелової кислоти та етилену.

В культурі *in vitro* існує два основних типи морфогенезу. *Органогенез* - утворення монополярної структури (окремих органів) – кореневої, стеблової, рідше флоральної (квіткової) або листкової, і *соматичний ембріогенез* - утворення біполярних зародкоподібних структур із соматичних клітин. В процесі органогенезу спочатку регенерують окремі органи, а потім – цілі рослини (виключення становить кореневий органогенез). При соматичному ембріогенезі, на відміну від органогенезу, спочатку утворюється зародок, що має як меристему кореня, так і верхівкової бруньки, з якої надалі розвивається ціла рослина.

Відомо, що будь-яка рослинна клітина має однакові потенційні можливості і містить весь набір генів, а, отже, зберігає властиву зиготі програму розвитку. При отриманні калюсу із клітин пелюсток квітки, або із клітин серцевинної паренхіми стебла, чи із клітин будь-якої іншої тканини, кожна така клітина може регенерувати цілу рослину. Однак властивість тотипотентності не завжди реалізується, тому що потенційні можливості клітин різних типів проявляються неоднаково. У деяких з них гени більшою мірою репресовані, внаслідок чого прояв тотипотентності стає обмеженим.

Клітинну основу морфогенезу становить *цитодиференціювання*, при якому диференційовані клітини знову набувають структуру та спеціалізовані функції. Регенерація рослини починається з вторинної диференціації клітин.

Роботами низки авторів показана пряма залежність *органогенезу* в калюсних тканинах від співвідношення фітогормонів – ауксинів та циклінінів. Перевага концентрації ауксинів над вмістом цитокінінів в живильному середовищі викликає диференціювання клітин, що призводить до утворення кореневої системи без регенерації цілої рослини. Збільшення концентрації цитокінінів та зменшення ауксинів ініціює стебловий органогенез та утворення пагонів. Однак при пересаджуванні пагонів на свіже живильне середовище з підвищеною концентрацією ауксинів спостерігаються утворення коренів і регенерація цілої рослини.

Доведено, що для проходження органогенезу дуже велике значення мають приналежність рослини-донора до класу дводольних чи однодольних, її генотип, а також тип експлантату. Крім того, морфогенез можна індукувати тільки за умов підбору оптимального живильного середовища, певних фізичних факторів, при балансі відповідних фітогормонів, наявності сигнальних білків та білків-акцепторів у клітинах.

Серед компонентів, що входять до складу живильних середовищ, істотну роль відіграють іони NH_4^+ та NO_3^- . Присутність амонійного азоту є важливою для початку морфогенезу, а додавання нітратного азоту сприяє росту і розвитку утворених морфогенетичних структур. Фітогормони, що використовуються для стимулювання органогенезу, не обмежуються тільки ауксинами та цитокінінами. В живильні середовища вводять й інші класи фітогормонів:

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

абсцизини, гібереліни, етилен. Встановлено також вплив типу експлантату на морфогенез. Наприклад, експлантати, виділені з верхніх міжвузлів рослин, можуть утворювати калюс, здатний до флорального морфогенезу, тим часом експлантати з нижніх міжвузлів дають початок тільки вегетативним органам. Необхідно відзначити, що всі морфогенетичні зміни активуються і/або контролюються спеціальними генами.

Соматичний ембріогенез. При соматичному ембріогенезі клітина-ініціал дає початок зиготі, із якої розвивається зародок. Рослина-регенерант, яка утворилась із соматичного зародку, повністю сформована і не потребує затрат на укорінення, порівняно з пагонами, отриманими в процесі органогенезу. Крім того, соматичні ембріоїди більш точно відтворюють генотип вихідної рослини. Соматичні зародки представляють також практичний інтерес, оскільки їх можна використовувати для одержання штучного насіння.

Соматичний ембріогенез дуже важливий для розвитку фундаментальних наук тому, що дозволяє вивчати механізми ембріогенезу. Майже всі його фази, у рослині та у культурі *in vitro* співпадають, за винятком першої. Найбільш рання з вивчених фаз детермінації клітини за ембріональним шляхом розвитку полягає в набуванні нею властивостей полярності. Передбачається, що морфогенні клітини можуть підтримувати полярність за рахунок активного базипетального транспорту ендогенного ауксину, градієнту біоелектричних потенціалів та іонів кальцію.

Соматичний ембріогенез не залежить від додавання в живильне середовище екзогенних фітогормонів. Зазвичай ембріогенні зони виникають у калюсній тканині на живильному середовищі, склад якого використовують для калюсоутворення. Розвиток соматичних зародків у калюсній тканині починається при видаленні дедиференціюючого фактора з живильного середовища (2,4-Д та інших ауксинів). В зародку, який розвивається, синтезуються ендогенні фітогормони, що не потребує введення в середовища екзогенних гормонів. Таким чином, сам процес ізолювання клітини стимулює реалізацію її тотипотентності, тобто перехід до морфогенезу.

Основними стимулами морфогенезу в культурі калюсних тканин є зміни співвідношень гормонів у живильному середовищі і процес ізоляції рослинної клітини від організму, а додатковим – наявність у живильному середовищі нітрату срібла, нітрату амонію, деяких амінокислот (проліну, тирозину, іноді серину), поліамінів (путресцину і спермідину). У ряді випадків процес морфогенезу стимулюється доповненням культурального середовища вуглеводами маннітом і сорбітом, гібереловою кислотою, яка сприяє росту зачатків стебла та абсцизовою, що стимулює прискорення диференціювання органів соматичних зародків. Іони NO_3^- впливають на розвиток морфогенетичних структур, що виникають у калюсній тканині, індукцію яких стимулюють іони NH_4^+ .

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

На регуляцію процесу морфогенезу суттєво впливає якість світла. Так, морфогенний калюс частіше утворюється на синьому, ніж на білому або червоному світлі.

Зміни, що відбуваються на рівні індивідуальних білків при реалізації морфогенетичної програми в культурі тканин, дозволяють говорити про існування білків розвитку, хоча відсутність специфічних тестів на ці білки робить їх визначення проблематичним.

Для перебудови та підготовки клітин - ініціалей до наступних швидких поділів при морфогенезі, необхідна лаг-фаза, після проходження якої клітини діляться за типом дроблення, утворюючи сферичну масу дрібних ізодіаметричних клітин. Масу клітин, утворену в процесі органогенезу прийнято називати *меристематичними осередками*, а соматичного ембріогенезу – *глобулярним проембрію*. Меристематичні осередки або проембрію можуть виникати на периферії або всередині калюсної тканини. Однак в їх локалізації, зазвичай, спостерігається відсутність певної закономірності. В меристематичних осередках диференціюються зачатки стебла, кореня, листка або квіткової бруньки та відбувається, відповідно, стебловий, кореневий, листовий або флоральний органогенез. З глобулярного проембрію розвивається біполярна ембріодна структура. Виділяють кілька послідовних стадій формування соматичних ембріодів з калюсної клітини: *глобулярну, сердечка, торпедовидну, соматичного зародка*.

Спонтанний або індукований морфогенез відбувається на перших етапах культивування тканин. В більшості випадків здатність до органогенезу втрачається в процесі субкультивування. У тканин, ізольованих від верхівки до основи стебла та при багаторазових перепасируваннях калюсу в більшості випадків здатність до органогенезу поступово зменшується, тоді як до коренеутворення - протягом більш тривалого часу. Рослини-регенеранти, отримані із багаторазово пересаджених тканин зазвичай слабо ростуть і розвиваються. При цьому змінюється число хромосом, що призводить до ауплоїдії та анеуплоїдії і виникнення різнобічних хромосомних аберацій.

Лабораторна робота 15.

Індукція органогенезу в калюсній тканині картоплі

Для індукції органогенезу калюс пересаджують на середовище з високим вмістом цитокінінів. Прискорене утворення пагонів відбувається на середовищі з підвищеним вмістом ауксинів. Індукція морфогенезу та регенерація рослин - складний багатостадійний процес. Для калюсної культури картоплі можна виділити декілька стадій: індукцію зелених меристематичних зон; появу бруньок *de novo*; формування мікропагонів з подальшим їх укоріненням.

Мета роботи: проведення індукції органогенезу в калюсній тканині картоплі.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Обладнання та матеріали: ламінар-бокс, плоскодонні колби ємністю 50 мл зі стерильним живильним середовищем (МС без гормонів), колби із середовищами для органогенезу і ризогенезу, стерильні препарувальні голки, пінцети, флакони з 96%-м спиртом, спиртівка.

Об'єкт дослідження: стерильна калюсна тканина картоплі.

ХІД РОБОТИ

1. Стерильним пінцетом переносять калюс в стерильну чашку Петрі. Розділяють на шматочки величиною 5×5 мм і поміщають за допомогою стерильної препарувальної голки в колби з живильними середовищами:

- а) МС без гормонів;
- б) МС + 2 мг/л 6-БАП + 1 мг/л НОК.

2. Колби переносять в культуральну кімнату, де підтримується температура +25°C, вологість повітря 70% , інтенсивність освітлення 3 Клк.

3. Через тиждень фіксують появу структурованих осередків, через три - п'ять тижнів - меристематичних зон яскраво-зеленого кольору. Іще через один-два тижні відмічають виникнення апексів, які при подальшому культивуванні перетворюються в мікропагони (рис.8).

4. На одному експлантаті може диференціюватись до декількох десятків пагонів. При досягненні висоти 10мм, пагони відокремлюють від калюсної тканини в стерильних умовах і переносять на живильні середовища для індукції коренеутворення:

- а) МС без гормонів;
- б) МС + 2 мг/л ІМК + 1 мг/л ГК.



Рис. 8. Стебловий органогенез в калюсній культурі картоплі

5. Колби поміщають на 20 днів в умови темряви при температурі +25°C. Через 7-14 днів відмічають виникнення коренів.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

6. Проводять облік кількості утворених апексів, що з'явилися на кожному калюсі. На основі одержаних даних роблять висновки про вплив різних гормонів на органогенез калюсної тканини картоплі.

Лабораторна робота 16.

Індукція стеблового органогенезу в культурі калюсної тканини томатів. Одержання рослин-регенератів (непрямий морфогенез)

Мета роботи: отримання із калюсної тканини рослин-регенератів.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (ланцети, пінцети), спиртівка, чашки Петрі, пеніцилінові флакони з живильним середовищем, калюсна тканина томатів.

ХІД РОБОТИ

1. Одержану стерильну калюсну тканину томатів в чашці Петрі розділяють на декілька експлантатів.
2. Експлантати висаджують на регенераційне живильне середовище, склад якого:

Макросолі по Уайту	100 мл
Мікросолі по Уайту	1 мл
Вітаміни по Уайту	1 мл
Fe - хелат	5мл
Кінетин	0,25 мг
ІОК	2 мг
Сахароза	20 г.
Агар	8г
Вода	870 мл

3. Калюс культивують при температурі +23-26°C, інтенсивності освітлення 2000 лк, 14-годинному фотоперіоді.

4. На основі одержаних результатів зробити відповідні висновки.

Лабораторна робота 17.

Індукція соматичного ембріогенезу в калюсній тканині листків люцерни

Найбільш компетентними для індукції соматичного ембріогенезу є молоді тканини рослин. Крім того, перші пасажі калюсних культур мають більш високий морфогенетичний потенціал, який поступово втрачається при тривалому культивуванні.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Мета роботи: отримання соматичних ембріодів та їх подальше культивування.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (ланцети, пінцети), спиртівка, стерильні чашки Петрі, пеніцилінові флакони з живильним середовищем, калюсна тканина люцерни.

ХІД РОБОТИ

Робота складається з декількох етапів.

1. Індукція проембріогенної калюсної маси, під час якої проходить формування соматичних зародків.

Калюсну тканину люцерни висаджують на живильне середовище складу

Макросолі Уайта	100 мл
Мікросолі Уайта	1 мл
Вітаміни Уайта	1 мл
Гліцин	2 мг
Fe-хелат	37мл
Кінетин	0,5 мг
ІОК	2 мг
Сахароза	100 г.
Агар	8г
Вода	790 мл

Умови культивування: температура +23-26°C, інтенсивність освітлення - 1000 лк, фотоперіод 14 годин.

2. Розвиток ембріодів.

Проембріогенні клітини висаджують на живильне середовище, яке містить:

Макросолі Уайта	100 мл
Мікросолі Уайта	1 мл
Fe - хелат	5мл
Вітаміни Уайта	1 мл
Глютамін	800 мг
НОК	0.1 мг
Сахароза	60 г
Агар	8г
Вода	825 мл

Культивують при температурі +25°C, інтенсивності освітлення 1000 лк, фотоперіоді 16 годин.

3. Проростання ембріодів та формування рослин.

Ембріоди висаджують на регенераційне середовище складу:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe - хелат	5 мл

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Вітаміни МС	1 мл
Гідролізат казеїну	500 мг
Кінетин	2 мг
Сахароза	20 г
Агар	8г
Вода	865 мл

Культивують при 14-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 2000 лк та температурі +22-25°C.

4. Спостерігають за формуванням соматичних ембріодів, їх проростанням, утворенням рослин-регенерантів і роблять висновки.

Тема 5. Суспензійна культура клітин

Суспензійні культури – це одиночні клітини або їх групи клітин в рідкому середовищі, які утворюють гомогенну популяцію, що піддається впливу хімічних речовин.

Суспензію клітин одержують шляхом перенесення в рідке середовище калюсної тканини, одержаної при попередньому вирощуванні на твердому агаризованому живильному середовищі. Первинна калюсна тканина, що використовується як посівний матеріал, повинна бути пухкою і легко розпадатись на окремі клітини. Для відділення великих агрегатів, клітинну масу перед висіванням фільтрують або відстоюють, а потім поміщають у рідке середовище з автоматичним перемішуванням.

У лабораторних умовах клітинні суспензії вирощують у колбах на установках шейкерного типу із швидкістю обертання 100–120 об/хв. За таких умов забезпечується аерація тканин, а утворена маса клітинних агрегатів розпадається на окремі фрагменти. Для одержання 100 мл клітинної суспензії потрібно 2–3 г свіжої калюсної тканини. Суспензійну культуру можна одержувати і безпосередньо з первинного експлантату (листки, стебла, корінь, тощо) при застосуванні ферментів пектиназ. Спочатку на поверхні експлантату утворюється калюсна тканина, а надалі від неї відокремлюються клітини і клітинні агрегати, при перенесенні яких в культуральне середовище отримують клітинну суспензію.

Рослинні клітини ростуть і розмножуються значно повільніше, ніж клітини тварин або мікроорганізмів. Подвоєння їх відбувається протягом від однієї до трьох діб. При суспензійному культивуванні стаціонарна фаза росту клітин, за якої культура досягає максимального накопичення сухої біомаси спостерігається зазвичай через два-три тижні. В разі виснаження культурального середовища і нагромадження продуктів життєдіяльності клітин, виникає необхідність його поновлення або пересівання культури на свіже середовище.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Обов'язковою умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування або струшування середовища, оскільки в нерухомому стані поділ суспензійних клітин призводить до утворення калюсної тканини. Постійний поділ суспензійних клітин підтримується наявністю в середовищі ауксинів і цитокінінів, тобто гормонів, необхідних для індукції та росту типових калюсних клітин, із яких складаються суспензійні культури. Виключення з поживного середовища іонів кальцію та додавання в поживне середовище ферменту пектинази для руйнування пектату кальцію клітинних стінок, сприяють отриманню суспензійності культури.

При промисловому культивуванні суспензійних культур застосовують закриті або відкриті системи з періодичним чи проточним режимом вирощування клітин. У закритій системі клітинна суспензія позбавлена припливу свіжого живильного середовища до кінця вирощування (періодична культура), а при безперервному режимі вирощування у відкритій системі живильне середовище періодично замінюється свіжим. Як при періодичному, так і при проточному режимах вирощування суспензійних культур у відкритій системі клітини залишаються в живильному середовищі і не видаляються навіть при його заміні. Однак у відкритих системах культивування при заміні живильного середовища разом з ним відбирається і частина суспензійних клітин.

Клітинні суспензії характеризуються низкою ознак: життєздатністю, щільністю клітин, ступенем агрегації, швидкістю росту. Життєздатність клітин визначають за допомогою барвників, зокрема метиленової сині або синій Еванса. На живі клітини барвники не діють, внаслідок непроникності клітинних мембран, а мертві клітини стають легкопроникними і забарвлюються в синій колір. Одним із основних показників стану клітинної суспензії є щільність клітинної популяції. Число клітин визначають у лічильних камерах Фукса-Розенталя або Горяєва під мікроскопом після мацерації суспензійної культури 10 – 20% розчином хромової кислоти, під впливом якої відбувається гідроліз серединних пластинок, що з'єднують клітини.

Клітинна суспензія, як і калюсна культура має S-подібну криву росту. Зазвичай тривалість пасажу становить 14-16 днів. При цьому щільність клітинної популяції зростає від 5×10^4 до 5×10^6 кл/мл. Суспензію для субкультивування беруть наприкінці експоненціальної фази. Основними критеріями росту суспензійних культур є збільшення числа клітин, їх сирої і сухої маси.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегації клітин, згідно якого виділяють:

- *дрібноагреговану* суспензійну культуру, яка складається з поодиноких клітин (40%) і дрібних агрегатів (60%, що містять не більше 10–12 клітин);
- *середньоагреговану* суспензійну культуру до складу якої входять 40% одиночних клітин, 40% дрібних агрегатів і 20% великих агрегатів, що містять більше 12 клітин;

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

- *крупноагреговану* суспензійну культуру, яка складається із дрібних (40%) і великих (60%) агрегатів. Для позбавлення від великих агрегатів, суспензії фільтрують (фракціонують) через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє звільнитись від залишків експлантату або щільних шматочків калюсної тканини. Основними ознаками суспензійної культури є високий ступінь дезагрегації (5 – 10 клітин у групі), морфологічна однорідність клітин (невеликі розміри, сферична або овальна форма, щільна цитоплазма) і відсутність диференціації (зокрема, трахеєподібних елементів).

Для вирощування клітинних суспензій використовують переважно живильні середовища для культивування калюсних культур. Найбільш поширеними способами вирощування клітинних суспензій є:

1. Вирощування калюсу на містках-підтримках із фільтрувального паперу.

2. Накопичувальне культивування - культура клітин, занурених в рідке живильне середовище на качалках ротаційного або шейкерного типу.

3. Безперервне культивування - вирощування клітин в рідкому поживному середовищі в культиваторах і ферментерах, шляхом барботажу в поєднанні з механічним переміщенням.

В процесі субкультивування клітини проходять послідовно наступні фази росту:

1. латентну або лаг-фазу;
2. експоненціальну (логарифмічну) фазу;
3. лінійну фазу;
4. стаціонарну фазу;
5. фазу загибелі клітин.

Суспензійні культури використовують як модельні системи для вивчення механізму вторинного метаболізму, індукції ферментів та інших продуктів вторинного метаболізму, експресії генів, деградації чужорідних сполук. Перевагою суспензійних культур при отриманні продуктів метаболізму є відсутність у більшості з них пігментів хлорофілу і каротиноїдів, а також відносна гомогенність популяції клітин, які легко піддаються дії хімічних речовин і здатні до росту у контрольованих стерильних умовах.

Лабораторна робота 18.

Отримання суспензійної культури з калюсної тканини жень-шеню, моркви, топінамбуру, гвоздики, томатів

Одним із основних способів отримання суспензійних культур є занурення шматочків калюсу в рідке середовище, яке постійно переміщується. В окремих випадках використовують експлантати тканин, стерильні проростки, які в рідкому середовищі дедиференціюються і утворюють калюс, що в кінцевому

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

результаті розпадається на окремі клітини. Культивують суспензійні культури на качалках ротаційного чи шейкерного типу зі швидкістю 100-120 об/хв., яка забезпечує її аерацію і перемішування.

Мета роботи: отримання клітинної суспензії із калюсних тканин.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (ланцети, пінцети), спиртівка, чашки Петрі, живильне середовище, калюсні тканини жень-шеню, моркви, топінамбура, гвоздики, томатів.

ХІД РОБОТИ

Для отримання високодиспергованої суспензійної культури використовують калюсну тканину рихлого типу. Роботу проводять в ламінар-боксі.

1. Шматочок калюсу поміщають в колбу з рідким живильним середовищем (2-3 г/100мл), яке складається:

Макросолі Гамборга	100 мл
Мікросолі Гамборга	1 мл
Fe - хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Гідролізат казеїну	500 мг
Кінетин	2 мг
Сахароза	20 г
Агар	8г
Вода	865 мл

2. Культуру клітин, занурених в рідке живильне середовище, вирощують на качалках ротаційного або шейкерного типу (швидкість 130-150 об/хв, температура культивування +23-24°C, абсолютна темрява). Типи клітин в суспензійній культурі представлені на рис.9.

3. Через 10-14 днів середовище з клітинною суспензією фільтрують через нейлонову тканину.

4. Фільтрат розділяють на 3 порції, які розливають в плоскодонні колби. До клітинної суспензії додають свіже середовище і доводять об'єм до 100 мл.

5. Колби з клітинною суспензією поміщають на шейкерну качалку і проводять субкультивування через кожні 14-18 діб.

6. Спостерігають за ростом клітинних суспензій різних видів рослин і роблять висновки.



Рис. 9. Отримання клітинних суспензій на качалках шейкерного типу.

Лабораторна робота 19.

Визначення параметрів росту клітинної суспензії

Ріст суспензійних культур клітин оцінюють за наступними параметрами: об'єм осаджених клітин, число клітин, сира і суха маса, вміст білка або ДНК, провідність середовища, життєздатність клітин.

Мета роботи: дати оцінку життєздатності клітинної суспензії.

Матеріали і обладнання: міні-центрифуга, бакет-ротатор, центрифужні пробірки, мікроскоп, камера Фукса-Розенталя, фільтрувальний папір, чашки Петрі.

ХІД РОБОТИ

1. Визначають об'єм осаджених клітин. Для цього 10 мл суспензійної культури переносять в центрифужну пробірку об'ємом 15мл. Центрифугують в бакет-роторі протягом 5 хв при 2000 об/хв. Визначають об'єм одержаного осаду і виражають у відсотках.

2. Підраховують число клітин за методом Брауна (робота №13).

3. Визначають сиру та суху масу клітин. Для цього суспензію фільтрують через попередньо зволожений і зважений фільтрувальний папір. Клітини промивають дистильованою водою і знову зважують разом з фільтром. Одержана різниця між другим і першим зважуванням буде складати сиру масу клітин. При визначенні сухої маси клітин попередньо зважують сухі фільтри. Клітини з сухим фільтром висушують в термостаті при температурі + 60°C до постійної маси, зважують, і за різницею визначають масу сухої речовини клітин.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

4. Для визначення життєздатності клітин суспензії використовують барвник - синій Еванса. В чашку Петрі переносять 1 мл суспензії і додають 1-2 краплі барвника, поміщають під мікроскоп і при невеликому збільшенні (x30) підраховують кількість живих незабарвлених клітин (вибірковість мембрани живих клітин) полі зору мікроскопу.

Лабораторна робота 20.

Визначення щільності суспензійної культури та оцінка її ростової активності

За щільністю суспензії можна охарактеризувати не тільки стан клітинної популяції, але й виявити час субкультивування (відбору інокулята та пересаджування на свіже живильне середовище). В більшості випадків суспензію для субкультивування відбирають в кінці експоненціальної фази (через 14-16 днів після початку культивування). Для побудови кривої динаміки росту суспензійної культури визначення показників проводять через добу. Щільність суспензії за 2-3 тижні культивування зростає в середньому у 20 разів. Кількість клітин суспензії підраховують у лічильних камерах Фукса-Розенталя або Горяєва. Об'єм вибірки повинен бути не менше 1000 клітин. Підрахунок клітин може ускладнюватись в разі переважання в суспензії фракції клітинних агрегатів. В таких випадках до 1 об'єму культури додають 2 об'єми 8% оксиду хрому і нагрівають колби на електроплитці до +70° С протягом 2-15 хвилин і після охолодження культури, струшують для розпадання агрегатів. Повне руйнування агрегатів забезпечується додаванням у суспензію ферменту пектинази в кількості 0,25 % від її об'єму.

Мета роботи: оволодіння навиками визначення щільності суспензійної культури для вивчення характеру її росту.

Матеріали і обладнання: мікроскоп, центрифуга, стерильна піпетка, предметне скло, покривне скельце, камера для підрахунку клітин Фукса-Розенталя або Горяєва, фільтрувальний папір.

Об'єкт дослідження: суспензійна культура.

ХІД РОБОТИ

1. Колбу з суспензійною культурою струшують і відбирають піпеткою декілька мілілітрів суспензії.

2. 1 мл суспензії змішують із 2 мл 8% оксиду хрому і поміщають в термостат на 15 хв при температурі +70°С.

3. Одержану суміш пропускають 3 рази через шприц з товстою голкою.

4. Камеру Фукса-Розенталя або Горяєва заповнюють суспензією, притираючи покривне скельце до появи кілець Ньютона, а залишки рідини прибирають фільтрувальним папером.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

5. Підраховують кількість клітин під мікроскопом при невеликому збільшенні (x30). Підрахунок клітин проводять в 5 великих квадратах (в чотирьох по діагоналі та в одному – в будь-якому верхньому чи нижньому в куті сітки).

6. Щільність суспензії, тобто число клітин в 1 мл, розраховують за формулою

$$X = \frac{M \times N \times 1000}{3,2}, \text{ де}$$

X – число клітин в 1 мл; M – середнє число клітин в камері; N – розведення; 3,2 – постійна величина.

7. Показники знімають через добу в процесі всього періоду культивування клітинної суспензії.

8. За отриманими експериментальними даними побудувати криву росту клітинної суспензії.

Лабораторна робота 21.

Визначення ступеня агрегації і життєздатності клітинної суспензії

В залежності від мети досліджень, умови культивування і склад живильного середовища підбирають таким чином, щоб в суспензії переважала певна фракція клітин. Зазвичай в суспензії розрізняють чотири основні фракції: одиночні клітини, невеликі агрегати, середні та крупні агрегати. Агрегати не повинні мати більше 10-13 клітин. Ступінь агрегації визначають, підраховуючи не менше 1000 клітин в декількох полях зору мікроскопу на тимчасових препаратах при збільшенні x30.

При роботі з суспензією необхідно враховувати її життєздатність. Про яку можна судити за рухом цитоплазми, ступенем проникності клітинної стінки для барвників, активністю ферментів. Прижиттєві барвники (метиленовий синій) не проникають через мембрани живих клітин в цитоплазму. Суспензія вважається життєздатною у випадку відсутності забарвлення у 70% одиночних клітин в синій колір, а в разі клітинних агрегатів - при забарвленні менше 50% клітин.

Мета роботи: визначення ступеня агрегації та життєздатності суспензійної культури.

Матеріали і обладнання: мікроскоп, 0,1% розчин метиленового синього, дистильована вода, предметні і покрівельні скельця, стерильні піпетки, марлеві салфетки, фільтрувальний папір.

ХІД РОБОТИ

1. Струшують клітинну суспензію в колбі і стерильною піпеткою відбирають невелику кількість суспензії.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

2. Поміщають краплю суспензії на предметне скло, додають краплю барвника, накривають покрівельним скельцем, прибираючи залишки рідини фільтрувальним папером.

3. Препарат поміщають на столик мікроскопу і при невеликому збільшенні $\times 30$ підраховують кількість клітин і агрегатів в трьох полях зору (продивитись не менше трьох препаратів).

4. Один з препаратів замальовують та роблять опис морфології клітин суспензії (форми, величини, забарвлення).

5. Зробити висновок про ступінь агрегації (які фракції переважають за кількістю, %) і життєздатності суспензії (кількість незабарвлених клітин, %).

Лабораторна робота 22.

Висів клітинних суспензій на тверде агаризоване середовище

для отримання одноклітинних клонів

Для клонування використовують клітини суспензійної культури переважно в експоненціальній фазі росту, однак придатними є клітини і в стаціонарній фазі.

Мета роботи: одержання колоній-клонів.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, стерильні піпетки, чашки Петрі з живильним середовищем, клітинні суспензії.

ХІД РОБОТИ

1. Стерильною піпеткою відбирають 0,5мл життєздатної клітинної суспензії, отриманої із листків гвоздики, бульб топінамбуру і картоплі.

2. Висівають суспензію в чашки Петрі на живильне середовище, склад якого:

Макросолі Гамборга	100мл
Мікросолі Гамборга	1мл
Fe-хелат	2мг
Вітаміни по Уайту	1мл
Мезоінозит	100мг
Гідролізат казеїну	500мг
Кінетин	0,25мл
НОК	2мл
Сахароза	20 г
Агар	20 г
H ₂ O	860мл
pH	5,6-5,8

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

3. Для отримання одноклітинних клонів (рис. 9) суспензію культивують в термостаті при регульованій температурі +23-26°C в умовах абсолютної темряві.

4. Аналізують одержані результати і роблять висновки.



Рис. 10. Одноклітинні клони топінамбура

Тема 6. Застосування методу культури тканин у селекції рослин (нетрадиційний метод селекції)

Успіхи, досягнуті в області культивування рослинних клітин відкривають нові потенційні можливості використання рослинного матеріалу для вирішення фундаментальних питань експериментального мутагенезу і селекції нових форм сільськогосподарських культур. Вихідним матеріалом для мутагенезу та селекції можуть слугувати калюсні і суспензійні культури, ізольовані протопласти, соматичні або андрогенні ембріоїди, сегменти листків і меристем.

Для відбору мутантів використовують такі прийоми:

1. Пряма або позитивна селекція, при якій виживають тільки мутантні клітини певного типу.

2. Непряма (негативна) селекція, заснована на вибірковій загибелі клітин дикого типу, які діляться, і виживанні метаболічно неактивних клітин, що потребує додаткової ідентифікації у них мутаційних змін.

3. Тотальна селекція, при якій індивідуально тестуються всі клітинні клони.

4. Візуальна селекція і неселективний відбір проводяться в разі, коли варіантна лінія може бути ідентифікована серед популяції візуально або при використанні біохімічних методів.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Найбільш широко застосовується метод прямої селекції, головним чином для виділення рослин-регенерантів, стійких до гербіцидів, антибіотиків, токсинів, важких металів, солей та інших антиметаболітів.

Для проведення робіт з клітинної селекції рослин в умовах *in vitro*, як об'єкти дослідження можуть бути використані калусні, суспензійні культури або ізольовані протопласти. Вибір об'єкта залежить від наявності розроблених технологій для різних видів рослин, а також від кінцевої мети дослідження. Калусна тканина, як легкодоступний матеріал найчастіше використовується для клітинної селекції. Зазвичай, роботу проводять на первинній або перепасированій калусній тканині, що не втратила здатності до регенерації протягом ряду субкультивувань.

Разом з тим багато дослідників відзначають істотні недоліки цього об'єкта. В першу чергу - це повільний ріст калусної тканини, неоднаковий для всіх клітин вплив токсичних речовин, які застосовуються в ролі селективних факторів, втрата регенераційної здатності в процесі культивування калусних клітин. Слід відзначити, що проводити селекцію доцільно на рівні одиночних клітин (суспензійна культура або протопласти). Однак для багатьох видів рослин не розроблені ефективні технології та способи їх культивування. Тому, незважаючи на вказані недоліки, при використанні калусних культур, цей спосіб селекції залишається єдиним для деяких видів рослин.

Одержання стабільно стійких ліній в культурі *in vitro* – довготривалий процес. Селекція починається з одержання ізольованих рослинних експлантатів для отримання достатньої кількості калусної маси, яка надалі використовується для визначення сублетальної концентрації селективного фактора, при введенні якого водночас спостерігається ріст калусної тканини і загибель частини калусних колоній. Ця концентрація селективного фактора вважається оптимальною для використання в подальших експериментах.

Первинно отримані на середовищах з селективними агентами колонії клітин виникають внаслідок фізіологічної адаптації або певного стану диференціації клітин, і можуть бути генетично нестійкими. Тому протягом наступних чотирьох – шести субкультивувань на селективному середовищі проводять оцінку стабільності стійкості отриманих клонів. Після цього їх переносять на живильне середовище без селективного фактора і субкультують протягом двох-трьох пасажів. І тільки після повторного повернення в селективні умови відбирають стабільні клони, з яких одержують рослини-регенеранти.

Була проведена низка робіт із культивування калусної тканини для одержання нового колекційного матеріалу на рослинах пшениці, ячменю, рису, сорго, а також картоплі, томатів, люцерни. Одержані рослини пшениці, рису, картоплі, стійкі до хлоридного засолення (NaCl); рослини-регенеранти моркви, які завдяки додаванню в живильне селективне середовище аналогів амінокислот, синтезують в 20 разів більше метіоніну, в 30 разів триптофану, у п'ять разів – лізину; рослини картоплі, стійкі до кільцевої гнилі. Що стосується

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

рослин деревних порід, то роботи в цьому напрямку проводяться дуже рідко і часто носять пошуковий характер.

Поряд з калюсними та суспензійними культурами, як вихідний матеріал для селекції можуть бути використані ізольовані протопласти, культури статичних або андрогенних ембріоїдів, органогенні експлантати (сегменти листків або різні меристематичні чи стеблові частини рослин), а також культура ізольованих зародків. Шляхом культивування та селекції *in vitro* зародків з насіння отримані рослини ячменю, стійкі до аналогів амінокислот. Розроблено ефективний метод обробки пагонів та черешків картоплі мутагеном, що призводить до одержання хлорофілдефектних та антибіотикостійких химерних мутантів.

Подальше використання калюсної культури в селекційній практиці відкриває широкі можливості для створення нових форм рослин з господарсько - цінними ознаками шляхом проведення селекції на клітинному рівні, що дозволяє у два – чотири рази прискорити створення нових форм рослин, порівняно із традиційними методами.

Лабораторна робота 23.

Селекція мутантів на рівні клітинних колоній. Висів суспензії на селективне живильне середовище.

Здатність клітин до поділу на селективних середовищах в присутності мутагенного фактора (більшість антибіотиків, в тім числі і стрептоміцину) носить мутагенний характер, що набуває особливого значення для відбору цитоплазматичних мутантів. В основу багатьох прийомів селекції покладено метод відбору мутантних клітинних ліній за їх здатністю до фотосинтезу на селективному середовищі, що є досить ефективним в селекції цитоплазматичних мутантів.

Мета роботи: Отримання клітинних колоній стійких до антибіотиків.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, стерильні піпетки, чашки Петрі з селективним середовищем, клітинні суспензії тютюну.

ХІД РОБОТИ

1. Відбирають 1 мл клітинної суспензії, отриманої із мезофілу листків тютюну і висівають на середовище, яке складається:

Макросолі МС	100мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5мл
Вітаміни МС	1 мл
ІОК	2мг
БАП	0,5мг

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Стрептоміцин	0,5мг/мл
Агар	8г
Сахароза	20г
pH	5,0-5,5

2. Чашки Петрі з висіяною суспензією поміщають в термостат для утворення калюсної тканини при регульованій температурі +25-26⁰С і абсолютній темряві.

3. Присутність антибіотику стрептоміцину в живильному середовищі інгібує позеленіння калюсних тканин, але не пригнічує їх ріст. Ділянки калюсу з мутантними клітинами виявляють по їх зеленому забарвленню.

4. Для перевірки на стійкість до стрептоміцину, відділяють ділянки зелених тканин і розмножують на живильних середовищах того самого складу.

5. На середовищі без антибіотика проводять регенерацію зелених осередків тканин до цілих рослин. Для запобігання утворення химерних рослин їх доцільно підтримувати на середовищі, доповненому антибіотиком.

6. Через кожні сім діб проводять спостереження і роблять висновки.

Тема 7. Культура ізольованих протопластів

Протопласти – унікальна модель для вивчення фундаментальних фізіологічних проблем у рослин, а саме складу, структури і функціонування плазмалеми в природних умовах та за дії на неї гормонами, інгібіторами, фітотоксинами, визначення складу і архітекτονіки первинної клітинної стінки та вивчення механізму її репарації після руйнування.

На рис.10 представлена схема використання ізольованих протопластів при вивченні різних фізіологічних процесів.



Рис. 10. Ізольовані протопласти – об’єкт і модель у фізіологічних дослідженнях (за Р.Г. Бутенко, 1999)

Ізольовані протопласти можуть бути використані для низки теоретичних та прикладних досліджень:

1. Вивчення хімічного складу і структури клітинної стінки (при руйнуванні та синтезі «de novo».
2. Вивчення властивостей плазмалеми, трансмембранних переміщень.
3. «М’яке» виділення органоїдів.
4. Спостереження за закономірностями диференціювання клітин при злитті протопластів та взаємодією ядер і цитоплазми в отриманій гібридній клітині, вивчення соматичних гібридів.
5. Введення чужих клітинних органоїдів.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

6. Введення чужорідних генів в рослинну клітину

Ізольовані протопласти можуть слугувати реципієнтом для:

- а) ядерного, мітохондріального або хлоропластного геномів інших рослин, в тім числі і таксономічно віддалених (соматична гібридизація і цибридизація);
- б) окремих генів або фрагментів чужорідної ДНК (плазмід, синтетичних генних векторів);
- в) ізольованих клітинних органоїдів.

Виділення протопластів

Ізольований протопласт – це внутрішній вміст рослинної клітини, оточений плазмалемою, у якого відсутня зовнішня целюозна оболонка. Вихідним матеріалом для виділення протопластів можуть бути різні частини рослини - листки, корені, гіпокотилі, а також калюсні та суспензійні культури (в стадії логарифмічного росту, при якій клітинні стінки легко руйнуються, а протопласти є найбільш життєздатними).

Вперше протопласти були виділені Дж. Клернером в 1892 р. при вивченні плазмолізу в клітинах листків тілоріза (*Stratiotes aloides*) під час механічного ушкодження тканини. При *механічному* способі у плазмолізованих клітин пошкоджують клітинну стінку і протопласти виходять у середовище. Це тривалий і трудомісткий метод, що дозволяє виділити лише невелику кількість протопластів (виділення можливе не з усіх видів тканин). Натепер метод модифікований, покращений, але має низку обмежень:

- невисока продуктивність;
- можливість використання тільки тканин з екстенсивним плазмолізмом;
- трудоємкість і довготривалість.

Сучасний метод виділення протопластів, що одержав назву *ферментативного (ензиматичного)*, полягає у видаленні клітинної стінки за допомогою поетапного використання для її руйнування ферментів класу целюлаз, геміцелюлаз, пектиназ. Порівняно з механічним, цей метод має ряд переваг:

- одночасно можна виділити велику кількість протопластів (до 10 млн. із 1г тканини або клітин суспензійної культури);
- клітини не піддаються сильному осмотичному стресу;
- клітини не ушкоджуються;

Комбінація ферментів та їх співвідношення є специфічними для кожного типу клітин. Виділення протопластів проводять в три етапи:

- обробка рослинних тканин чи клітин ферментами;
- виділення протопластів із клітинних стінок;
- відділення інтактних протопластів від клітинних осколків.

Э. Коккінгом було встановлено, що ізольований протопласт, завдяки механізму піноцитозу, здатний поглинати з навколишнього середовища не

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

тільки низькомолекулярні речовини (іони, цукри), але й великі молекули, частки (віруси) і навіть ізольовані органоїди.

Культивування протопластів

Ізольовані протопласти можна культивувати, використовуючи живильні середовища того складу на яких ростуть ізольовані клітини і тканини. Середовище складається із осмотичного стабілізатора, неорганічних сполук, джерела вуглецю, азоту, вітамінів, фітогормонів. Умови культивування: рН середовища 5,4 - 5,8, температура 22-28⁰С, інтенсивність освітлення не більше 2000лк.

Відомо два способи культивування протопластів: *метод рідких крапель* і *метод платирування*. В першому випадку суспензію протопластів у вигляді крапель поміщають у пластикові чашки Петрі. Модифікація цього способу, запропонована в 1978 р. українським вченим Ю.Глебою полягає у культивуванні одиничних ізольованих протопластів в мікрокраплях об'ємом 1 мкл. У разі методу платирування суспензію протопластів наливають в чашки Петрі, додають рівний об'єм живильного середовища з 1% агаром при температурі не вище +45⁰С. Після застигання середовища чашки Петрі перевертають і культивують при +28⁰С в термостаті або культуральній кімнаті. В даному випадку протопласти зафіксовані в одному положенні і фізично відділені один від одного, що дає можливість спостерігати за розвитком інтактного протопласту: формуванням клітинної стінки, поділом, ростом і розвитком рослин-регенерантів.

Відразу після видалення ферментів у протопластів в культурі *in vitro* починається утворення клітинної стінки. Протопласти, у яких відбулась регенерація клітинної стінки, поведуться як ізольовані клітини і проявляють здатність до поділу і формування клону клітини. На життєздатність ізольованих протопластів та їх здатність до регенерації клітинної стінки, поділу, утворення колоній впливає фізіологічний стан вихідного матеріалу, який визначається умовами культивування: інтенсивністю освітлення, фотоперіодом, вмістом сахарози в поживному середовищі. На проліферацію клітин, що виникають із протопластів впливають наступні фактори:

- видова специфічність і фізіологічний стан вихідної тканини рослини;
- спосіб і умови виділення протопластів;
- щільність висіву протопластів;
- склад живильного середовища.

Злиття протопластів (парасексуальна гібридизація)

Ізольовані протопласти, які не ресинтезували клітинну стінку, здатні до злиття між собою. Злиття протопластів – своєрідний метод гібридизації при якому в якості батьківських компонентів використовують диплоїдні клітини рослини. Техніка парасексуальної гібридизації дає можливість:

- схрещувати філогенетично віддалені види рослин (організмів);

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

- отримувати асиметричні гібриди, що мають генний набір одного із батьків;
- злиття трьох і більш клітин;
- отримання гібридів, які мають генотип обох батьків;
- переведення мутацій в гетерозиготний стан, що дозволяє отримувати життєздатні форми при злитті протопластів, оскільки мутагенез досить часто дає дефектну по морфогенезу рослину;
- отримання рослин, гетерозиготних за позаядерними генами.

Злиття протопластів буває спонтанним (у протопластів із молодих тканин або суспензійних культур) та індукованим, при якому використовують ПЕГ, високі значення рН та концентрації Ca^{2+} . Протопласти зливаються як попарно, так і в великій кількості. Багатоядерні продукти злиття, як правило, руйнуються. Доля геномів (ядерного і цитоплазматичного) після злиття протопластів може бути різною:

1. Ядерні генетичні детермінанти успадковуються, як дво -, так і одnobатьківськи. В останньому випадку ядра не зливаються і в подальшому сегрегують в процесі клітинних поділів.

2. Позаядерні генетичні детермінанти успадковуються двобатьківськи. При цьому в міжвидових комбінаціях проявляється тенденція до соматичного вищеплення та елімінації одного із батьківських цитоплазматичних геномів.

3. Виникнення гібридних клітин і рослин в результаті злиття більше, чим двох батьківських клітин.

Були отримані міжвидові, міжродові, міжтрибні, міжродинні гібриди. Для віддалених гібридів характерними особливостями є:

- відносна стабільність гібридного стану, при якому не спостерігається повна елімінація генетичного матеріалу одного із батьків;
- генетичні перебудови (реконструкція і часткова елімінація хромосом);
- генетична різноякісність клонів гібридних клітин;
- обмежена морфогенетична здатність.

Лабораторна робота 24.

Виділення та культивування протопластів (механічним методом)

Ізольовані протопласти - один із найбільш цінних об'єктів в біотехнології. При їх злитті відбувається утворення гібридних клітин. В ізольовані протопласти досить легко вводити генетичну інформацію із органоїдів і клітин інших рослин, прокаріотичних організмів, клітин тварин, що має дуже важливе теоретичне і практичне значення.

Мета роботи: оволодіння навиками отримання протопластів механічним методом.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Матеріали і обладнання: 1М розчин сахарози, дистильована вода, пробірки, штативи для пробірок, піпетки на 10 мл, стерильні препарувальні голки, скляні палички, предметне скло, покрівельні скельця, фільтрувальний папір.

Об'єкт досліджень: шматочки рослинних тканин (зафарбований епідерміс луски цибулі, листки бегонії чи традесканції).

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати в пробірках розчини сахарози в концентраціях 0,3; 0,35; 0,4; 0,5; 0,55; 0,6; 0,7 М.

2. Занурити в пробірки з розчинами шматочки рослинних тканин для виникнення плазмолізу, що надасть можливість бачити протопласт в цілій клітині.

3. Через 10-15 хв рослинну тканину вийняти із пробірок і помістити на предметне скло в краплю відповідного розчину.

4. Притримуючи скляною паличкою, розділяють її на тонкі смужки, залишаючи цілим загальний кінець.

5. Обережно проводять препарувальною голкою по тканині, видавлюючи в розчин вміст зруйнованих клітин.

6. Тканину прибирають голкою, а краплю розчину накривають покрівельним скельцем, поміщають на столик мікроскопа і розглядають препарат при збільшенні $\times 30$.

7. Відмічають концентрацію розчину сахарози, в якому спостерігались ізольовані протопласти, замальовують їх і роблять висновки.

Необхідно враховувати, що механічний метод виділення протопластів дозволяє отримати незначну їх кількість і вимагає особливої точності при дотриманні методики. Розчини сахарози різної концентрації дають можливість вибрати один розчин, водний потенціал якого буде наближений до потенціалу рослинної тканин. В цьому розчині найбільш ймовірно будуть збережені цілі протопласти.

Лабораторна робота 25.

Виділення та культивування протопластів (ферментативним методом)

Ізольовані протопласти використовують для реконструкції рослинного геному в дослідженнях по соматичній гібридизації, перенесенні субклітинних частин і в генетичній інженерії. Схема робіт по виділенню протопластів представлена на рис.12.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Мета роботи: оволодіти методикою виділення та культивування протопластів із мезофілу листка та калюсних тканин тютюну.

Матеріали і обладнання: стерильні листки тютюну, ламінар-бокс, інвертований мікроскоп, фільтр "Millipore", чашки Петрі, термостат, нейлонові фільтри, центрифужні пробірки, ферменти, чашки Петрі з живильним середовищем, міні-центрифуга.

ХІД РОБОТИ

1. Приготування ферментних розчинів проводять безпосередньо перед дослідом або за добу до нього. Склад розчинів:

а) для виділення протопластів із мезофілу листка тютюну:

0,5% Cellulase, 0,5% Macerozime, 0,2% Driselase

б) для калюсних тканин

2% Cellulase, 1% Macerozime, 0,5% Driselase.

Розчини центрифугують протягом 10-5хв при 2000 об/хв. і стерилізують за допомогою фільтру "Millipore" та розливають в стерильні чашки Петрі по 7-10 мл.

2. Для ферментації використовують нарізані вузькими смужками молоді листки тютюну, які одразу поміщають у ферментативний розчин. Листкову тканину беруть з розрахунку 1г на 7-10 мл розчину. Ферментацію проводять в термостаті при регульованій температурі +28-30 °С протягом 15-18 год. (інкубація). При виділенні протопластів із калюсних культур, тканину беруть із розрахунку 2 г на 7-10 мл розчину. Час ферментації - 20-22 год при кімнатній температурі.

3. Після інкубації вміст чашки фільтрують через нейлоновий фільтр в плоскодонну колбу.

4. Отриману суспензію переносять в центрифужні пробірки і центрифугують протягом 3 хв при 1000 об/хв. Життєздатні протопласти спливають на поверхню, їх збирають пастерівською піпеткою і переносять в другу центрифужну пробірку з середовищем W-5 (табл.7).

5. Для осадження протопластів центрифугують 1-2 хв при 700 об/хв. і двічі відмивають середовищем W-5 (центрифугуванням) від залишків ферментного розчину.

6. Осад протопластів ресуспендують в 0,5 мл середовища K-3 і висівають в чашки Петрі на це ж середовище. Оптимальна густина посіву становить 10^3 клітин/мл.

7. Культивують протопласти на розсіяному світлі або в термостаті при регульованій температурі +26-28°C.

8. Через 10-20 днів культивування протопласти утворюють колонії-агрегати клітин (рис.11).

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Таблиця 7.

Середовища, які використовуються для виділення і культивування протопластів

	W-5	K-3
NaCl	9000	
NaH ₄ MO ₃		250
KNO ₃		2500
CaCl ₂ •2H ₂ O	18400	900
MgSO ₄ •7H ₂ O		250
KCl	800	
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O		150
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
Fe-хелат		250
H ₃ BO ₃		3
ZnSO ₄ •7H ₂ O		2
СиSO ₄ •5H ₂ O		0,025
CoSO ₄ •7H ₂ O		0.025
KI		0,75
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O		0,25
MnSO ₄ •7H ₂ O		14
Мезоінозит		100
Нікотинова к-та		1
Гідролізат казеїну		500
B ₁		10
B ₆		1
НОК		0,2
2,4-Д		1
БАП		0,2
Сахароза		10000
Глюкоза	1000	
Манітол		72800

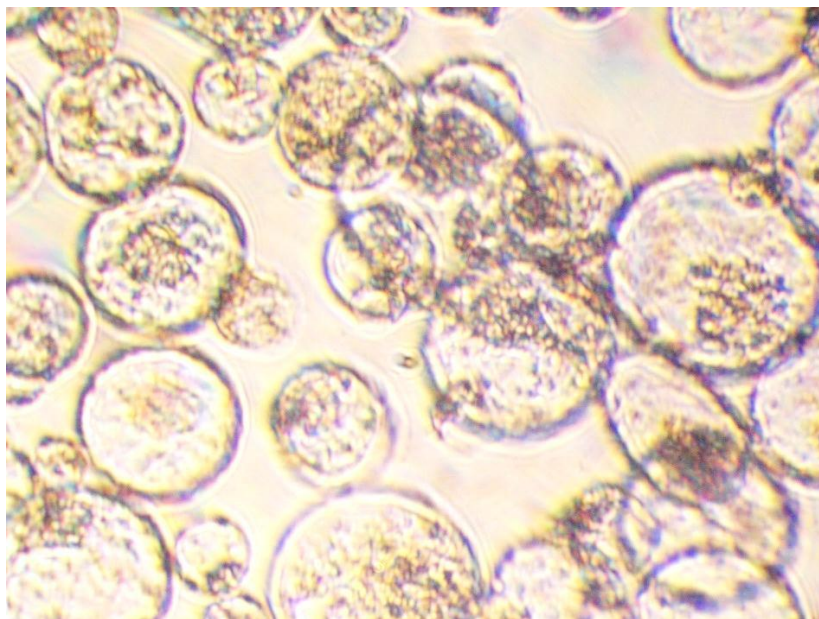


Рис. 12. Ізольовані протопласти тютюну

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

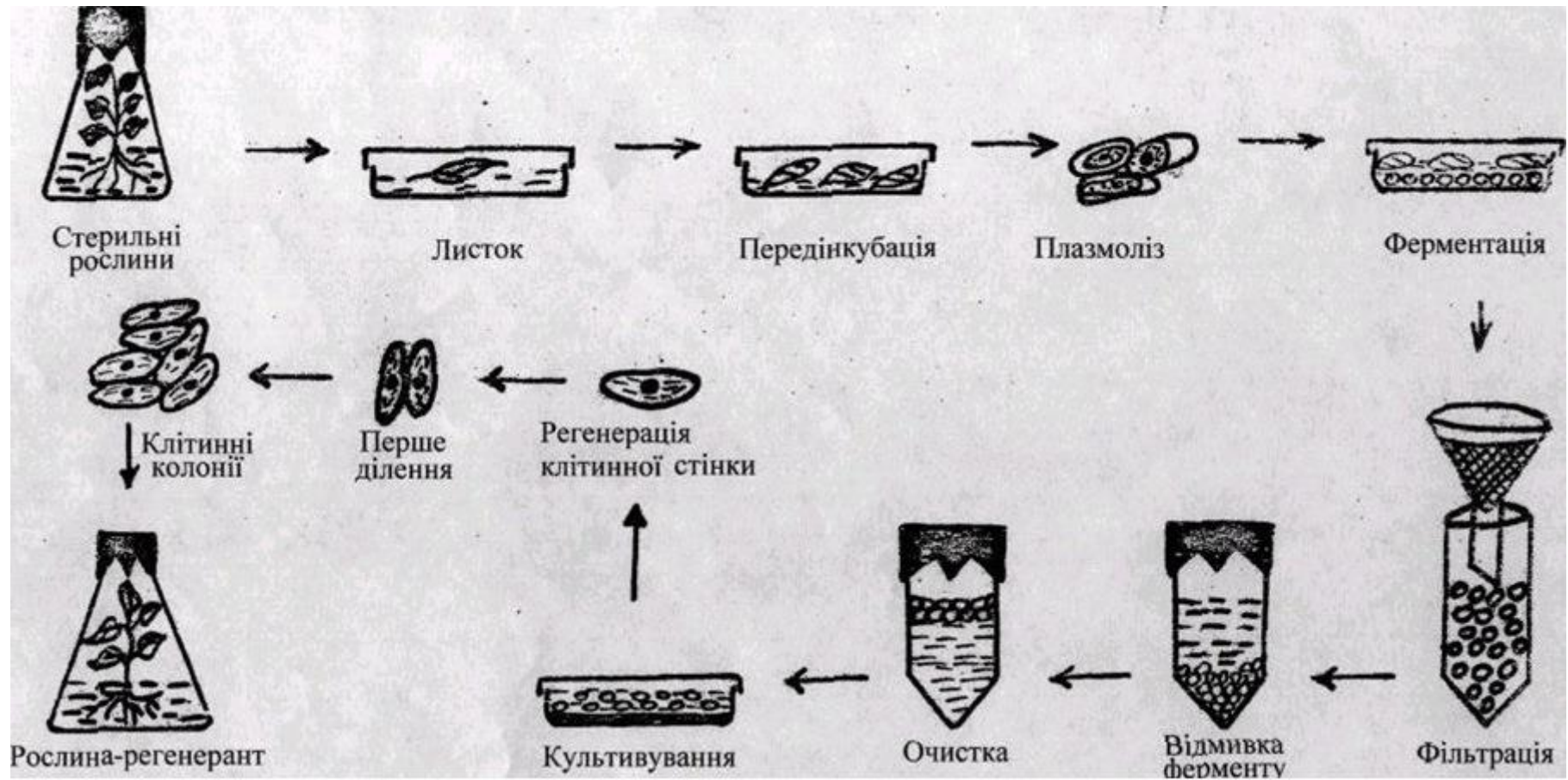


Рис. 13. Схема виділення протопластів

Тема 8. Мікроклональне розмноження рослин

Метод клонального мікророзмноження рослин - одержання в умовах *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру. В його основу покладено унікальну здатність рослинної клітини до реалізації властивої їй тотипотентності, тобто під впливом екзогенних факторів давати початок цілому рослинному організму.

Порівняно із традиційними способами вегетативного розмноження, метод клонального мікророзмноження має ряд переваг, а саме:

- забезпечує одержання генетично однорідного посадкового матеріалу, одержання безвірусних рослин;
 - високий коефіцієнт розмноження (10^5 – 10^6 – для трав'янистих і квіткових рослин, 10^4 – 10^5 – для чагарникових, деревних, 10^4 – для хвойних);
 - скорочення тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які не дають життєздатного насіння;
 - можливість проведення робіт протягом року та економію площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу;
 - автоматизацію процесу вирощування.

Вперше застосування методу клонального мікророзмноження було запропоновано наприкінці 1950-х рр. французьким ученим Ж. Морелем, якому вдалося одержати перші рослини-регенеранти орхідей. Досягненню успіху передувало розроблення техніки культивування апікальної меристеми рослин в умовах *in vitro*.

В колишньому СРСР роботи з клонального мікророзмноження були розпочаті в 1960-х рр. у лабораторії культури тканин і морфогенезу Інституту фізіології рослин ім К.А. Тимірязєва РАН під керівництвом професора Р.Г. Бутенко. Було вивчено умови мікророзмноження картоплі, цукрового буряку, гвоздики, гербери, фрезії та деяких інших рослин і запропоновано промислові технології вирощування рослин.

В області застосування клонального мікророзмноження спостерігається тенденція до постійного розширення, що в першу чергу стосується розмноження *in vitro* дорослих деревних порід, особливо хвойних і використання техніки *in vitro* для збереження рідкісних видів і лікарських рослин, занесених в Червону книгу.

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи (рис.14):

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантатів та одержання активно ростучої стерильної культури;
2. Власне мікророзмноження, в результаті чого досягається одержання максимальної кількості мікропагонів;

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

3. Укорінення розмножених пагонів і наступна їх адаптація до ґрунтових умов, а за необхідності - депонування рослин-регенерантів при знижених температурах (+4 – 2°C, +10°C);

4. Вирощування рослин-регенерантів в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або висадження в польові умови.

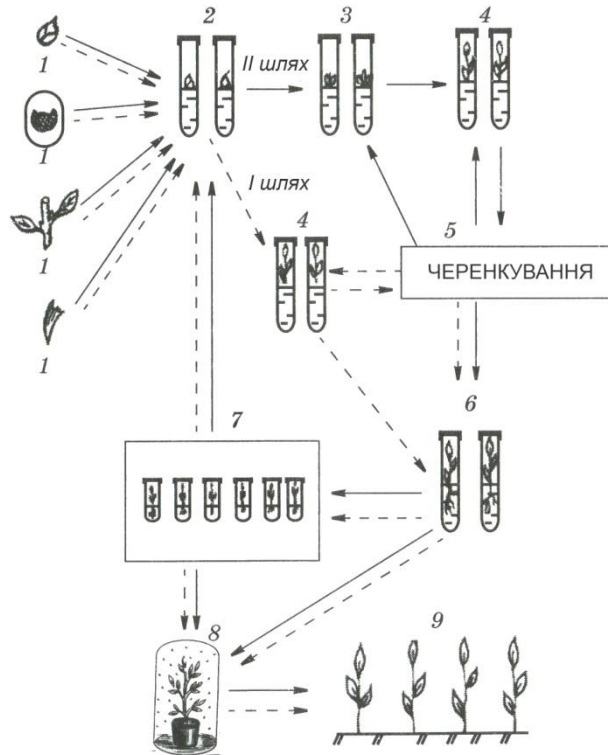


Рис. 14. Схема клонального мікророзмноження рослин методом активування розвитку меристемних тканин (I шлях) та індукція утворення адвентивних бруньок на первинному експлантаті (II шлях). 1 – вибір вихідного експлантату; 2 – одержання стерильної культури; 3 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експлантаті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (мікроживцювання); 6 – укорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2 °C); 8 – переведення рослин у тепличні умови; 9 – висадження рослин-регенерантів у польові умови.

Мікроклональне розмноження рослин і може бути здійснене наступними методами:

- активуванням розвитку меристемних тканин рослин (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки та інтеркалярні зони стебла) (рис.15);
- індукцією виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату;
- індукцією соматичного ембріогенезу;

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

- диференціацією адвентивних бруньок у первинної перепасированої калюсної тканини.

Серед методів клонального мікророзмноження рослин основним є метод активування розвитку меристемних тканин рослини, що базується на інгібуванні апікального домінування досягається двома шляхами:

- видаленням верхівкової меристеми стебла з подальшим мікроживцюванням пагона *in vitro* на безгормональному середовищі;
- додаванням у живильні середовища речовин цитокінінового типу дії, завдяки чому індукується розвиток численних пазушних пагонів.

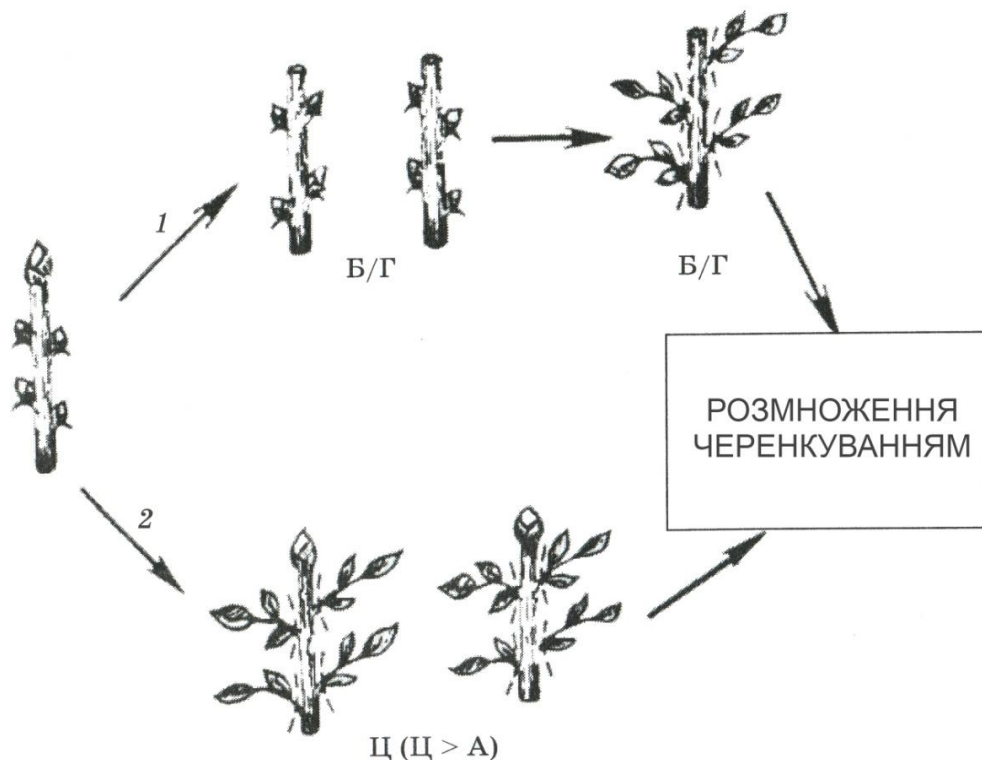


Рис. 15. Схема розмноження рослин методом активування меристемних тканин: 1 – видалення верхівкової меристеми; 2 – додавання в живильне середовище цитокінінів (Б/Г – безгормональне середовище; Ц – цитокініни; А – ауксини).

Як цитокініни зазвичай використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфуриламінопурин (кінетин), а також 2-ізопентениладенін і зеатин. Отримані таким способом пагони відокремлюють від первинного материнського експлантату і культивують на свіжоприготовленому живильному середовищі, стимулюючи проліферацію пазушних меристем і виникнення пагонів більш високих порядків.

Наразі цей метод широко застосовують у виробництві безвірусного посадкового матеріалу різних сільськогосподарських культур – технічних (цукровий буряк, хміль, тютюн, топінамбур, стахис); овочевих (томати, картопля, огірок, перець, гарбуз, спаржа та ін.); культур промислового квітникарства (гвоздика, хризантема, троянда, гербера); тропічних і

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

субтропічних рослин (рододендрон, азалія, камелія, чай та ін.); плодових та ягідних культур (яблуна, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, агрус та ін.); деревних порід (тополя, верба, вільха, береза, горобина, секвоя, туя, ялівець та ін.). Для деяких сільськогосподарських культур, зокрема картоплі, технологія клонального мікророзмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активування розвитку меристем цих тканин рослин дозволяє одержувати з однієї меристеми картоплі більше 10^5 рослин на рік. Технологія передбачає також одержання в пробірках мікробульб – цінного безвірусного насінневого матеріалу.

Другий метод – індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату – заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах живильного середовища відновлювати органи і регенерувати цілі рослини. За допомогою цього методу можна досягти регенерації майже будь-яких органів і тканин рослини (ізольованих зародків, листків, стебел, сім'ядоль, лусочок і денця цибулин, сегментів коренів та зачатків суцвіть) за умов одержання безвірусного матеріалу. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, що містять один із цитокінінів або при його поєднанні з речовиною групи ауксинів. Як ауксин у цьому випадку найчастіше використовують (3-індоліл оцтову кислоту (ІОК) або α -нафтилоцтову кислоту (НОК) у співвідношенні 10:1 або 100 : 1.

Індукція виникнення адвентивних бруньок – один із найбільш поширених методів мікроклонального розмноження вищих рослин. Так, багато цибулинних квіткових рослин (нарциси, лілії, гіацинти, гладіолуси, тюльпани) були розмножені з цибулинних лусочок, сегментів базальної частини денця цибулин, експлантатів листків; представники роду *Brassica* (капуста кольорова, качанна, брюссельська, листовая, брокколи) – із сегментів гіпокотилля, сім'ядоль, листків; цибуля та часник – з верхівкової меристеми, тканини дінця цибулини; томати – з апікальних або пазушних меристем; петунія – із сегментів корінців; глоксинія, фіалки – із сегментів листових пластинок; деякі представники деревних порід – з ізольованих зрілих і незрілих зародків

Третій метод - одержав назву соматичного ембріогенезу і ґрунтується на диференціації із соматичних клітин зародкоподібних структур, які за зовнішнім виглядом нагадують зиготичні зародки. Основна відмінність утворення зародків *in vitro* від *in vivo* (у природних умовах) полягає в тому, що соматичні зародки розвиваються асексуально поза зародковим мішком і є біполярними структурами, в яких одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня. Метод використовується для розмноження більшості рослин із родин *Orchidaceae* та *Rutaceae*, деяких представників злакових (пшениця, ячмінь), люцерни, редису, винограду, а також деяких видів деревних порід (осика, евкаліпт, дуб, ялина звичайна). Формування ембріодів в культурі тканин відбувається в дві стадії. На першій стадії клітини експлантату диференціюються за рахунок додавання в живильні середовища ауксинів (зазвичай 2,4 Д) і перетворюються в ембріональні. На другій - клітини

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

розвиваються в ембріоїди, що досягається шляхом зменшенням концентрації або повного видалення ауксину зі складу живильного середовища. Соматичний ембріогенез можна спостерігати безпосередньо в тканинах первинного експлантату, а також у калюсній культурі. Однак останній спосіб вважається менш придатним для використання при клональному мікророзмноженні, оскільки отриманий посадковий матеріал буде генетично нестабільним відносно рослини-донора. Зазвичай соматичний ембріогенез відбувається при культивуванні калюсних клітин у рідкому живильному середовищі (суспензії) і є найбільш трудомістким, тому що не дає можливості реалізувати властиву клітинам тотипотентність. Разом з тим, цей метод розмноження має свої переваги, не вимагаючи підбору спеціальних умов для укорінення і адаптації пробіркових рослин, оскільки соматичні зародки є повністю сформованими рослинками. При використанні відповідної техніки їх капсулювання з цих ембріоїдів можливо одержувати штучне насіння.

Четвертий метод клонального мікророзмноження – диференціація адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині. Обмеженою мірою застосовується для одержання посадкового матеріалу *in vitro*, що пов'язано з виникненням небажаних змін при періодичному пересаджуванні калюсних тканин на свіже живильне середовище в разі тривалого культивування. Вони полягають у зміні плоідності культивованих клітин, структурних перебудовах хромосом, виникненні генних мутацій, втраті морфогенетичного потенціалу. Поряд з генетичними спостерігаються і морфологічні зміни рослин: низькорослість, неправильність жилкування листків і їх розміщення на стеблі, утворення вкорочених, потовщених міжвузлів, химерність, знижена стійкість до ураження хворобами і шкідниками. Тому період неорганізованого росту при мікроклональному розмноженні повинен бути зведений до мінімуму.

Метод диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині має низку переваг. По-перше, він ефективний та економічно вигідний, тому що в процесі розмноження з кожної індивідуальної калюсної клітини при сприятливих умовах культивування може сформуватись адвентивна брунька, яка дає початок новій рослині. Крім того, для деяких рослин він є єдиним можливим методом розмноження рослин в культурі тканин, а також представляє великий інтерес для селекції. Рослини-регенеранти, отримані методом диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині, відрізняються за генетичними та морфофізіологічними ознаками, що дає можливість селекціонерам проводити добір рослин за господарсько важливими ознаками та оцінювати їх інтродукцію в польових умовах.

Слід наголосити, що метод диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині доцільно застосовувати тільки до тих рослин, яким властива генетична стабільність калюсної тканини, а варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

мінливості. До таких рослин можна віднести амаріліс, томати, спаржу, деякі деревні породи та інші культури. Шляхом калюсної культур були розмножені цукровий буряк, деякі представники роду *Brassica*, кукурудза, рис, пшениця та інші злакові, соняшник, льон. Підібрані оптимальні умови *in vitro*, сприйнятливі для регенерації рослин з калюсу огірка, картоплі, томатів.

Основна перевага клонального мікророзмноження полягає в можливості одержання генетично однорідного, безвірусного посадкового матеріалу. Цього досягають, використовуючи меристематичні тканини апексів і пазушних бруньок органів стеблового походження. Як відомо апікальна меристема складається з конуса наростання, одного або двох листових зачатків (примордіїв) і є вільною від інфекцій.

Англійським вченим Ф. Уайтом в 1943 р. було вперше висловлено припущення про можливість відсутності вірусів у меристематичних тканинах, уражених патогенами рослин В 1950-х рр. були успішно проведені дослідження з одержання з точки росту безвірусних рослин жоржин. На думку авторів цього методу у інфікованій рослині вірус поширюється з відставанням від швидко ростучих молодих органів, особливо в недиференційованих тканинах, де концентрація вірусу може знижуватись до його повної відсутності. Теоретичні концепції, покладені в основу цього методу, знайшли практичне підтвердження в сучасних наукових дослідженнях.

Однак слід відмітити, що зона, вільна від вірусів, істотно відрізняється для різних видів і сортів рослин, а також залежить від їх виду. Наприклад, у колеоптилі злаків, розміри ділянки верхівки можуть досягати до 250 мкм, що виключає проникнення в неї вірусів шляхом швидкого транспортування по провідній системі, проте допускається можливість його повільного поширення через плазмодесми, які з'єднують меристематичні клітини. При культивуванні апікальної меристеми картоплі розміром 200 мкм на живильному середовищі і подальшому одержанні рослин-регенерантів було показано, що серед отриманих рослин тільки 10% було не інфіковані Х-вірусом, тоді як ураженість Y-вірусом досягала 70 %. Це свідчить про низьку ефективність застосування культивування апікальної меристеми, як методу оздоровлення інфікованих вірусами рослин, що було підтверджено результатами, отриманими низкою зарубіжних і вітчизняних меристемних лабораторій. При дослідженні апікальних меристем рослин гвоздики, цимбідіума, уражених вірусами CarMV та CarVMV, в умовах *in vitro* були одержані інфіковані мериклони.

Одержання безвірусної апікальної меристеми від інфікованих патогенами рослин можна досягти шляхом застосування методів попередньої термо- або хемотерапії вихідних рослин.

Метод *термотерапії* – використання сухого гарячого повітря. Застосовують як в умовах *in vivo*, так і в *in vitro*. Існують різні гіпотези щодо дії механізму звільнення рослин від вірусів у процесі термотерапії. Згідно однієї з них, високі температури впливають безпосередньо на рибонуклеїнову кислоту та білкову оболонку вірусних частинок іспричинюють їх фізичне руйнування,

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

позбавляючи вірулентності. Друга гіпотеза полягає в тому, що висока температура проявляє вплив на віруси через метаболічні процеси рослин. Так, під дією високих температур порушується рівновага між синтезом і деградацією вірусних частинок. В разі переваги синтезу - концентрація вірусу в уражених тканинах зростає, і навпаки.

Для проведення термотерапії рослини поміщають у спеціальні термокамери (термостати) і поступово підвищують температуру протягом першого тижня від 25 до 37°C, збільшуючи щодобово параметри температур на 2°C. Не менш важливим при термотерапії є створення і підтримання протягом усього процесу оптимального режиму фізичних параметрів: температури +37°C, освітленості лампами денного світла – 5000 лк та 14–16 годинного фотоперіоду залежно від культури, відносної вологості повітря в термокамері 90 %. Тривалість термотерапії залежить від складу вірусів та їх термостійкості. Однак існують рослини (наприклад, цибулинні культури, цимбідіум, троянди та ін.), ріст яких пригнічується в результаті тривалої термотерапії *in vivo*. Тому для таких рослин доцільно проводити термотерапію рослин-регенерантів *in vitro*. Крім позитивного впливу термотерапії на звільнення рослин від вірусів, виявлено, також ефективність дії високих температур на точку росту і процеси морфогенезу деяких квіткових культур (гвоздика, хризантема, фрезія) в умовах *in vitro*. Застосування термотерапії дозволяє збільшити коефіцієнт розмноження рослин на 50 – 60%, підвищити адаптацію пробіркових рослин-регенерантів до ґрунтових умов, а також одержати більш високий відсоток безвірусних маточних рослин. Перевірку рослин-регенерантів на наявність вірусів проводять за допомогою імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії та рослин-індикаторів.

Хемотерапія – полягає у додаванні в живильне середовище, на якому культивують апікальні меристеми аналогу гуанозину – 1 β -Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол карбоскиміду (комерційна назва – вірозол) у концентрації 20-50 мг/л. Це противірусний препарат широкого спектра дії. При використанні вірозолу в культуральних середовищах відсоток безвірусних меристем рослин збільшується до 80 – 100%. Позитивні результати хемотерапії були отримані для сливи, черешні, малини, деяких квіткових та інших рослин. Слід наголосити, що термо- і хемотерапевтичні методи оздоровлення посадкового матеріалу від вірусів економічно є малоефективними. Тому, наразі, створюють форми рослин з генетичною стійкістю до вірусів за допомогою методу трансгенезу.

Фактори, які впливають на процес мікроклонального розмноження.

На ефективність мікроклонального розмноження впливають фізіологічні особливості рослини-донора, хімічні та фізичні умови культивування. Найбільш важливими факторами є вибір материнської рослини та експлантату. При *виборі материнської рослини* необхідно враховувати фізіологічні, сортові і видові особливості. Рослини-донори повинні бути здоровими, не уражені

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

грибними, бактеріальними та вірусними хворобами і знаходиться у стані інтенсивного росту (вихід із фази спокою і перехід до активного росту). При виборі експлантату необхідно враховувати його вік, будову і походження. Для забезпечення максимальної стабільності клонованого матеріалу і запобігання появи аномальних рослин, як експлантат використовують молоді, слабо диференційовані тканини. Оскільки, експлантати від ювенільних рослин набагато краще укорінюються, порівняно із зрілими. Особливо це стосується деревних порід. *Тривалість культивування* впливає на ефективність клонального мікророзмноження рослин. При тривалому культивуванні протягом декількох пасажів змінюється фізіологічний стан пагонів і зростає частота їх укорінення, а експлантат набуває ознак ювенільності, що впливає на підвищення морфогенетичного потенціалу.

Успіх введення в культуру *in vitro* рослинних тканин часто визначається ефективністю стерилізації і вибором стериліанту, який залежить від особливостей експлантату (ніжних, легко ушкоджуваних рослин і таких тканин, що мають більш щільну оболонку). Дуже часто внутрішнє ураження вихідних експлантатів патогенами буває набагато сильнішим поверхневого, тому їх попередньо обробляють фунгіцидами і антибіотиками для знищення грибних і бактеріальних інфекцій.

Залежно від виду рослин необхідно проводити дослідження для визначення оптимального *складу та консистенції живильних середовищ*. На клональне мікророзмноження впливають регулятори росту, біологічно активні речовини, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи. До фізичних факторів вирощування відносяться температура і умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 лк при фотоперіоді 14-16 годин, відносній вологості повітря – 65-70%, але величини цих параметрів залежать від конкретної культивованої культури. Висока інтенсивність світла може спричинювати хлорози і затримувати розвиток рослин-регенерантів. Однак при перенесенні в ґрунт, у них відмічається краща приживлюваність і більша активність росту. Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22-26⁰С в денний період доби і 18-22⁰С – в нічний. В деяких випадках зниження температури супроводжується підвищенням ефективності розмноження рослин. Для підвищення коефіцієнта розмноження необхідно для рослин кожного виду підбирати індивідуальні умови культивування з урахуванням його природного ареалу.

Адаптація рослин-регенерантів

Пересадження рослин-регенерантів в субстрат – відповідальний етап, який завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливим періодом для пересадження пробіркових рослин є весна або початок літа. Рослини з двома – трьома листками і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають із колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним крючком. Корені ретельно відмивають від залишків агару і

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

висаджують в ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований при +85⁰С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрат використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1). Виключення складає сімейство орхідних, для яких використовують субстрат із сфагнового моху, суміші торфу, листків бука або дуба, соснової кори (1:1:1). Підготовленим ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горшечки, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горшечки з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (+20-22⁰С), освітленістю не більше 5000 лк і вологістю 65-90%. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману. За неможливості створення таких умов, горшечки з рослинами накривають скляними банками або поліетиленовими пакетами, які поступово відкривають до повної адаптації рослин. Через 20-30 днів після посадки, добре укорінені рослини підживлюють розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. По мірі росту рослин їх періодично пересаджують у більші ємності зі свіжим субстратом. В подальшому акліматизовані рослини вирощують відповідно до прийнятої агротехніки для кожного індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересаджування рослин в ґрунт спостерігається призупинення їх росту, опадання листків і загибель рослин. Ці явища пов'язані, в першу чергу, з порушеннями діяльності продихового апарату листків пробіркових рослин, внаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не утворюються кореневі волоски, що призводить до порушення поглинання кореневою системою води і мінеральних солей із ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах процесу клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікоризацію рослин (для мікотрофних), яка відіграє позитивну роль у їх забезпеченні мінеральними і органічними поживними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів.

Індійськими вченими було запропоновано простий метод запобігання швидкого зневоднення листків рослин, вирощених *in vitro* під час їх пересаджування в польові умови. Метод полягає в тому, що листки протягом всього акліматизаційного періоду необхідно зрошувати 50% водним розчином гліцерину або суміші парафіну чи жиру в діетиловому ефірі (1:1). Застосування цього методу допомагає запобігти проведенню довгих і утруднених процесів загартування пробіркових рослин і забезпечує 100% їх приживлюваність.

Лабораторна робота 26.

Виділення і культивування апікальних меристем (гвоздики, картоплі, троянд, смородини)

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Апікальна меристема або ділянка стеблового апексу розміщена дистально по відношенню до найбільш молодого листкового примордія і досягає в середньому 80 мм в довжину. Культура апікальних меристем широко застосовується для створення вільного від патогенів рослинного матеріалу.

Мета роботи: оволодіти методикою виділення апікальних меристем та їх культивування.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, бінокулярна лупа, інструменти (ланцети, пінцети), стерильні чашки Петрі, флакони з живильним середовищем, спиртівка.

ХІД РОБОТИ

1. В стерильних умовах під бінокулярною лупою вицеляють апікальні меристеми величиною до 1 мм, відсікаючи ланцетом примордіальні листочки.

2. Ізольовані меристеми переносять на рідке або тверде агаризоване живильне середовище, яке містить:

Макросолі МС	100мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5мл
Вітаміни МС	1 мл
бакто - тріптон	1 г
сахароза	30 г

pH 5,5-5,6 до автоклавування

3. Меристеми інкубують при регульованій температурі 25-26°C, 12-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 150 лк протягом першого місяця і 500 лк - другого місяця культивування.

4. Сформовані із меристем пагони довжиною до 3 см переносять в пробірки на живильне середовище для укорінення.

Лабораторна робота 27.

Ізолювання і культивування апікальних меристем картоплі

Для оздоровлення рослин і отримання безвірусного посадкового матеріалу практично усіх сільськогосподарських культур використовують культуру апікальних меристем. Клітини конусу наростання, які активно діляться, розміщені на верхівці пагона, яка не містить вірусів. Зазвичай на живильне середовище висаджують невелику частину меристеми – не більше 0,5 мм. Чим менша величина ділянки меристеми, тим більша вірогідність отримання безвірусних рослин. Найбільш повно розроблена промислова технологія отримання безвірусного матеріалу картоплі. В культурі *in vitro* для досягнення цієї мети використовують апекси верхівкових і бокових бруньок та меристеми бічних та придаткових коренів (рис.15).

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Тканини меристеми:

- 1 – в зародку насіння
- 2 – в пророщеній рослині
- 3 – на кінці кореня
- а – верхівкова меристема пагона
- б – верхівкова меристема кореня
- в – прокамбій
- г – інтеркалярна меристема листка
- д – інтеркалярна меристема пагона
- е – камбій
- ж – верхівкова меристема придаткового кореня
- з – верхівкова меристема бічного кореня
- и – верхівкова меристема пазушної бруньки
- к – ксилема
- л – перицикл
- м – флоема

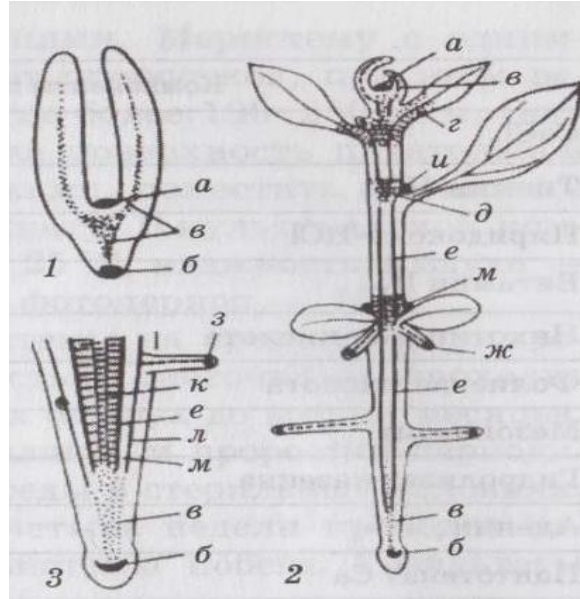


Рис. 15. Морфологічні особливості будови рослин картоплі (за Загоскіна и др., 2009)

Мета роботи: отримання апікальних меристем картоплі і дослідження розвитку пагонів.

Обладнання і матеріали: ламінар-бокс, чашки Петрі, пробірки із середовищем, флакони зі стерилізуючими розчинами (0,2% діацид або 70% розчин етилового спирту), стерильна дистильована вода, бінокулярний мікроскоп, стерильні препарувальні голки, пінцети, скальпелі, спиртівка.

Об'єкт дослідження: паростки картоплі.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильне середовище для культивування апікальних меристем картоплі, згідно складу, наведеного в табл.8, розлити у пеніцилінові флакончики і простерилізувати.

Таблиця 8.

Модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга (МС) для культивування апікальних меристем картоплі

Компоненти живильного середовища	
Маточний розчин макросолей	50 мл/л
Маточний розчин мікросолей	1 мл/л
Fe-хелат	5 мл/л
CaCl ₂	5 мл/л
Тіамін - HCl	1 мл/л
Піридоксин-HCl	1 мл/л

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Вітамін В ₁₂	0,015 мг/л
Нікотинова кислота	2 мг/л
Фолієва кислота	0,5 мг/л
Мезоінозит	100 мг/л
Гідролізат казеїна	1 г/л
Аденін	40 мг/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Рибофлавін	0,5 мг/л
Біотин	1 мг/л
Активоване вугілля	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кінетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
рН 5,7-5,8	

2. Поверхню ламінар-боксу, штативи, пробірки, мікроскоп обробити ультрафіолетом і 96% спиртом. Препарувальні голки, пінцети, скальпелі помістити в 96% спирт і перед кожною маніпуляцією обпалювати у полум'ї спиртівки.

3. Паростки довжиною 2см відділити від бульб і помістити поетапно у чашки Петрі зі стерилізуючими розчинами: в діацид на 3-5 хв, в 70% спирт – на 1-2 хв, після чого промити 3 рази по 10 хв стерильною дистильованою водою і перенести в стерильні чашки Петрі.

4. Тонкою препарувальною голкою видалити у паростків всі листки, послідовно оголюючи верхівкові і бокові меристеми із примодіями. Меристему з одним-двома примодіями відділити від проростків. При цьому величина експлантата повинна бути не більше 100-250 мкм.

5. Експлантати помістити в пробірки на поверхню живильного середовища. Пробірки закрити пробками і штатив перенести в культуральну кімнату, де необхідно підтримувати температуру +25°C, вологість повітря – 70%, освітленість – 5 Клк і фотоперіод – 16 годин.

6. Від посадки меристеми на середовище до формування паростків із 5-6 листочками проходить в середньому 30-45 діб, в деяких випадках - від двох до восьми місяців. Живильне середовище по мірі його виснаження оновлюють, періодично пересаджуючи паростки на свіже середовище в стерильних умовах.

7. Через два, три і чотири тижні проводять спостереження за розвитком пагонів із апікальної меристеми. Утворені рослини-регенеранти замальовують і роблять висновки.

Лабораторна робота 28.

Отримання безвірусного посадкового матеріалу картоплі методом термотерапії в поєднанні з культивуванням апікальних меристем

В разі ураження посадкового матеріалу патогенами використовують термотерапію (сухе гаряче повітря). Однак при ураженні рослин картоплі мозаїчними, веретеноподібними, ниткоподібними, паличковидними вірусами термічна обробка є малоефективною. Тому додатково використовують метод апікальних меристем. Для цього після термообробки бульб картоплі, апікальну меристему паростків вичленяють і розміщують в пробірки на живильні середовища. Термообробку зазвичай проводять восени і взимку. Весною у рослин відділяють пазушні бруньки довжиною від 0,3 до 1 мм і висаджують на безгормональне живильне середовище Мурасіге-Скуга (рН 5,7).

Мета роботи: вивчити вплив високої температури на розвиток апікальних меристем картоплі.

Обладнання та матеріали: ламінар-бокс, кювети з піском, пробірки з живильним середовищем, флакони зі стерильною водою, бінокулярний мікроскоп, стерильні препарувальні голки, скальпелі, флакони з хлораміном, флакони з 96% спиртом, спиртівка.

Об'єкт дослідження: бульби картоплі.

ХІД РОБОТИ

1. Здорові бульби картоплі ретельно промивають проточною водою, обробляють дезінфікуючим розчином (96% спирт, хлорамін) протягом 5 хв і ретельно ополіскують стерильною дистильованою водою.

2. Вирізають вічка з частиною паренхіми (1,5 x 1,5 см).

3. Вічка розміщують в кюветах з стерильним піском і пророщують в термостаті протягом одного-двох тижнів при регульованій температурі +28-30 °С, чотирьох тижнів – при +37-38 °С і вологості повітря 70-80%.

4. Двічі на день пісок зволожують. Через 7-10 днів проводять підкормку розчином суміші Кнопа і мікроелементів за прописом середовища МС: 5 мл маточного розчину на 1 л розчину суміші Кнопа.

5. Після проходження термотерапії одержані паростки поміщають в 6%-й розчин хлораміну на 5 хв, промивають три рази по 5 хв стерильною дистильованою водою.

6. В ламінар-боксі під мікроскопом вичленяють апікальні меристеми і поміщають їх в пробірки на живильні середовища. Культивують при температурі +25 °С, вологості повітря – 70%, освітленості – 5 Клк і фотоперіоді – 16 годин.

7. Режим теплової обробки для кожного сорту підбирають експериментальним шляхом. Бульби жаростійких сортів можна відразу вирощувати при температурі +37-38 °С і вологості повітря 70%.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

8. На підставі проведених досліджень зробити висновки про вплив високої температури на уражений патогенами посадковий матеріал.



Рис. 16. Проростки безвірусної картоплі в культурі *in vitro*.

Лабораторна робота 29.

Отримання мікробульб картоплі *in vitro*

У практиці біотехнології на штучних живильних середовищах при певному підборі біологічно активних речовин можна укорінювати пагони та індукувати утворення мікробульб картоплі. Для цього зазвичай використовують живильне середовище з високим вмістом мінеральних солей (МС), вуглеводів (сахарози – до 8 % від об'єму середовища), цитокинінів, абсцизової кислоти.

Упродовж перших 10-12 діб після черенкування живці культивують при 16-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 3-5 Клк і температурі +25°C в денний період доби та +19-20°C в нічний. Подальше культивування проводять за тих же фізичних умов при 12-годинному фотоперіоді. В окремих випадках, зокрема, після вирощування в умовах довгого дня (16-годинний фотоперіод), пробірки з експлантатами поміщають в холодильну камеру з температурою +10°C. Утворення мікробульб спостерігається через один місяць.

Одержані мікробульби зберігають в стерильних пробірках без середовища (по 10 мікробульб) в холодильній камері при температурі +5°C і вологості до 95% протягом шести місяців, створюючи умови, які співпадають з періодом спокою у картоплі, що покращує схожість та життєдіяльність рослин. Весь період – від мікрочеренкування до отримання мікробульб – складає 60-65 діб.

Мета роботи: вивчення процесу бульбоутворення картоплі.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Обладнання та матеріали: ламінар-бокс, стерильні чашки Петрі, пробірки з живильним середовищем для отримання мікробульб, препарувальні голки, пінцети, скальпелі, спиртівка, вата.

ХІД РОБОТИ

1. В стерильних умовах виймають із пробірок проростки картоплі з добре розвиненою кореневою системою і поміщають на живильне середовище для утворення мікробульб, складу

Макросолі МС	50 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe - хелат	5 мл
Тіамін- НСІ	1 мг/л
Нікотинова кистота	0,5 мг/л
Аскорбінова кислота	1 мг/л
Кінетин	0,5 мг/л
Сахароза	50 г/л
Агар	7 г/л
рН 5,6-5,8	

2. Пробірки переносять до культуральної кімнати, де культивують при температурі +25°C, вологості повітря – 70%, освітленості – 5 Клк і фотоперіоді – 16 годин.

3. Періодично проводять спостереження за процесом бульбоутворення (через чотири, шість та вісім тижнів від початку культивування).

4. Одержані мікробульби (рис.17) закладають на зберігання в холодильну камеру, де підтримують вологість на рівні 95% і температуру +5°C.



Рис. 17. Отримання мікробульб картоплі в культурі *in vitro*

Лабораторна робота 30.

Мікророзмноження гвоздики (картоплі) черенкуванням

Одним із методів мікроклонального розмноження є черенкування рослин-регенерантів. Розмноження рослин черенкуванням засновано на подоланні апікального домінування та активуванні пазушних меристем. При розміщенні мікроживців на живильне середовище із пазушної бруньки розвивається пагін. Кожне наступне черенкування проводять через 14-21 добу. Із однієї рослини отримують 5-8 черенків.

Мета роботи: оволодіти технікою клонального мікророзмноження рослин.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (ланцети, пінцети), чашки Петрі, спиртівка, пробірки з живильним середовищем, стерильні рослини-регенеранти.

ХІД РОБОТИ

1. Пагони розділяють на мікроживці довжиною 3-5мм з однією пазушною брунькою (в випадку черенкування гвоздики) або двома пазушними бруньками при черенкуванні картоплі.

2. Мікрочеренки поміщають в пробірки на живильне середовище, яке містить:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Кінетин	0,25 мг
Сахароза	20 г
Агар	8 г
H ₂ O	870 мл

рН 5,6-5,8 до автоклавування

4. Культивують в світловій культуральній кімнаті при температурі +23-25 °С, 14 - годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 2000 лк.

5. Мікрочеренки укорінюються і утворюють пагони протягом 3-4 тижнів після введення в культуру *in vitro* (рис.18).



Рис.18. Рослини-регенеранти картоплі, одержані з мікроживців

Лабораторна робота 31.

Індукція коренеутворення при мікроклональному розмноженні гербери

Ризогенез (утворення кореневої системи) можна стимулювати декількома способами:

1. При культивуванні пагонів або рослин-регенерантів на середовищі з невеликою кількістю ауксинів (БАП, ІОК в концентрації 0,3-1 мг/л).
2. При розведенні в 2 рази мінерального складу безгормонального живильного середовища.
3. При обгортанні нижньої частини пробірок фольгою або додаванні в живильне середовище активованого вугілля, враховуючи пригнічувальну дію на процес коренеутворення високої інтенсивності світла.
4. При висадженні проростків в нестерильні умови ґрунту.
5. При обробці пагонів синтетичними ауксинами.

Мета роботи: укорінення гербери.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), чашки Петрі, розчин 9% гіпохлориту натрію, хімічні стакани (50-100 мл), стерильна дистильована вода, фільтрувальний папір, квітколоже гербер.

ХІД РОБОТИ

1. Роботу проводять в ламінар-боксі. Квітколоже гербери стерилізують за допомогою 9% гіпохлориту натрію протягом 15-20 хв.
2. Промивають стерильною дистильованою водою три рази по 10 хв, обсушують фільтрувальним папером в чашках Петрі.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

3. Стерильне квітколоже висаджують на живильне середовище для утворення пагонів.

Склад середовища:

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни по Уайту	1 мл
БАП	10 мг
ІОК	0,1мг
сахароза	10 г
агар	8 г
H ₂ O	885мл
pH	5,6-5,8 до автоклавування

Культивують в культуральній кімнаті при температурі +25⁰С, 16 – годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 5000 лк.

4. Після утворення пагонів, їх пересаджують на живильне середовище для укорінення (рис.19), яке містить:

Мікроелементи МС	50мл
Мікроелементи МС	0,5 мл
Fe-хелат	2,5 мл
Вітаміни по МС	1 мл
УОК	0,3 мг
Сахароза	20 г
агар	8 г
H ₂ O	917,5 мл
pH	5,6-5,8 до автоклавування

5. Культивування пагонів проводять в культуральній кімнаті при температурі +23-24⁰С, 14 – годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 1000 лк.

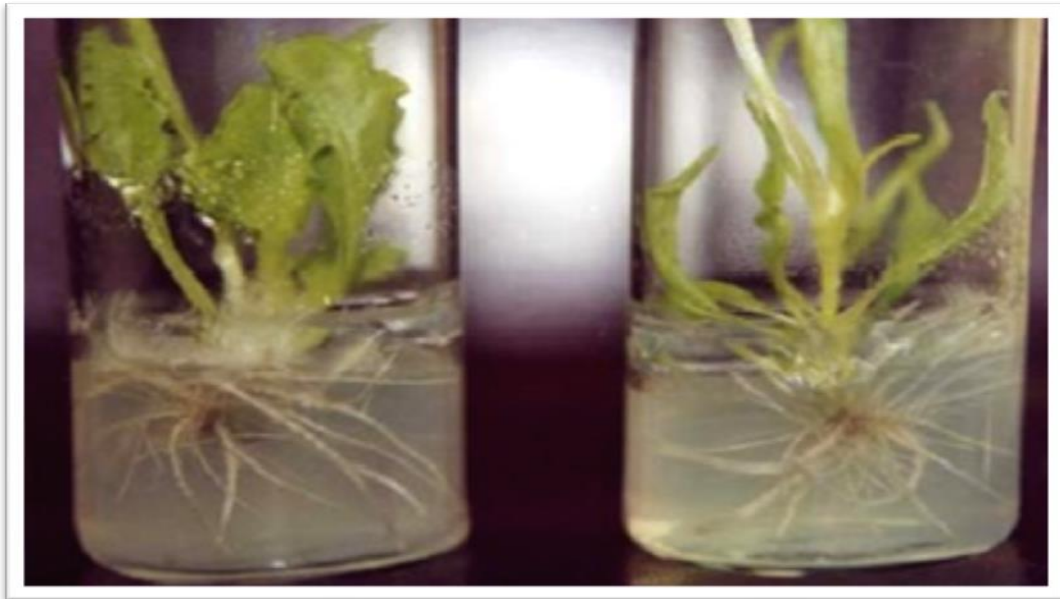


Рис. 19. Коренеутворення при мікроклональному розмноженні гербери

Лабораторна робота 32.

Прискорене мікроклональне розмноження (гвоздики, смородини, картоплі)

На сучасному етапі метод прискореного мікроклонального розмноження використовують для масового розмноження орхідних в комерційних цілях, а також у виробничих умовах при вирощуванні таких культур як картопля, гвоздика, суниця, смородина.

Прискорене мікроклональне розмноження складається із декількох етапів.

1. *Індукція адвентивних бруньок.* Верхівкові і пазушні бруньки простерилізованих пагонів поміщають в колби Ерленмейера, які містять 5 мл рідкого живильного середовища Мурасіге-Скуга, Уайта або Гамборга, доповненого бензиламінопурином (БАП) в концентрації 4-6 мг/л і культивують на світлі при регульованій температурі +25-28⁰С протягом 2-3 тижнів. Зазвичай тривалості цього терміну достатньо для зняття апікального домінування та початку інтенсивної проліферації адвентивних бруньок.

2. *Формування пагонів.* Через 2-3 тижні культивування експлантати переносять на рідке живильне середовище того ж складу, але зі зниженим вмістом БАП (до 2 мг/л). На цьому середовищі через 1,5-2 тижні починається інтенсивне утворення пагонів. Перепасирування на свіже живильне середовище проводять через кожні два тижні.

3. *Укорінення пагонів і формування рослин.* Сформовані пагони вичленяють із проліферуючих експлантатів і пересаджують в окремі пробірки на тверде середовище Мурасіге-Скуга з невисокими концентраціями ІОК (0,1-

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

0,2 мг/л) для укорінення. Повністю сформовані рослини висаджують в умови відкритого ґрунту.

Мета роботи: оволодіти технологією прискореного клонального мікророзмноження.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (ланцети, пінцети), чашки Петрі, живильні середовища, розчин “Білизни”, стерильна дистильована вода.

ХІД РОБОТИ

1. Пагони стерилізують за допомогою розчину “Білизни” (1:3) протягом 20 хвилин і промивають стерильною дистильованою водою три рази по 10 хвилин.

2. Вичленяють верхівкові та пазушні бруньки і поміщають на рідке живильне середовище, склад якого:

Макросолі МС	100 мл;
Мікросолі МС	1 мл;
Вітаміни МС	1мл;
БАП	5 мг/л;
Сахароза	20 г;
Вода	878 мл;

рН 5,5 - 5,8 до автоклавування

Іноді за основу беруть середовище Уайта або Гамборга.

3. Культивують бруньки на світлі при температурі +25-28°С протягом 2-3 тижнів до початку інтенсивної проліферації адвентивних бруньок.

4. Через 2-3 тижні культивування, експлантати переносять на рідке живильне середовище того ж складу, але зі зниженим вмістом БАП (до 2 мг/л).

5. Культивують експлантати при температурі +25-28°С, 14-годинному фотоперіоді, вологості 60-70%. Через 1,5-2 тижні культивування починається інтенсивне утворення погонів.

6. Вичленяють сформовані пагони і пересаджують в окремі пробірки на тверде живильне середовище для укорінення.

Склад живильного середовища:

Макросолі МС	100 мл;
Мікросолі МС	1 мл;
Вітаміни МС	1мл;
ІОК	0,15 мг/л;
Сахароза	20 г;
Агар	6 г;
Вода	871 мл;

рН 5,6 - 5,8 до автоклавування.

7. Повністю сформовані рослини-регегеранти пересаджують в умови відкритого ґрунту.

Лабораторна робота 33.

Культивування та адаптація рослин-регенерантів

Важливим етапом в процесі клонального мікророзмноження є пересадження рослин-регенерантів в субстрат. Не рекомендується затримувати рослини в стерильній культурі, оскільки це негативно впливає на приживлюваність і їх подальший ріст. В промислових умовах для отримання однорідного посадкового матеріалу відсортовують рослини на три групи: великі, середні і невеликі, які висаджують на окремих ділянках.

Мета роботи: проведення адаптації рослин-регенерантів.

Матеріали та обладнання: рослини-регенеранти цукрового буряку, пінцети, субстрат, розчини макросолей, мікросолей.

ХІД РОБОТИ

1. Рослини-регенеранти з двома-трьома листками і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають із пробірки пінцетом та ретельно відмивають коріння від залишків агару.

2. Рослини висаджують в посудини з субстратом, використовуючи в основному суміш торфу, піску, перліту (1:1:1), який попередньо стерилізують при +85-90°C протягом 1-2 годин (рис.19).

3. Рослини-регенеранти культивують в теплиці при температурі +22-25°C і вологості 80-90%.

4. Через 20-30 діб після посадки укорінені рослини підживлюють розчинами Мурасіге - Скуга або Кнудсона.

5. В процесі росту рослин їх пересаджують на свіжий субстрат в більші ємності, використовуючи суміш торфу і піску (3:1) або суміш торфу, дернового ґрунту, перліту (1:1:1).



Рис.19. Адаптовані рослини-регенеранти цукрового буряку.

Лабораторна робота 34.

Визначення ростових характеристик рослин-регенерантів

Для обліку рослин-регенерантів (рис.20) використовують низку показників, які характеризують їх ріст і розвиток.

1. Сиру та суху масу рослин-регенерантів, яку визначають в кінці досліду або через кожні 7 діб протягом періоду культивування для визначення динаміки їх росту.

2. Кількість та довжину міжвузлів.

3. Індекс росту (відношення кінцевої довжини рослини-регенеранту до величини вихідного експлантату).

4. Площу листової поверхні.

5. Коефіцієнт розмноження (кількість рослин-регенерантів, яку можна отримати з одного експлантату за певний проміжок часу).

6. Результати заносять в лабораторний журнал.



Рис. 20. Рослини-регенеранти цукрових буряків.

Тема 9. Регулятори росту і розвитку рослин

Гібереліни стимулюють вегетативний ріст, активують процеси розтягнення і поділу клітин, прискорюють проростання насіння, сприяють утворенню партенокарпічних плодів.

Цитокініни беруть участь в індукції клітинного поділу затримують, процес старіння, активують диференціювання хлоропластів, індукують розвиток пазушних бруньок, регулюють ріст соматичних зародків.

Ауксини індукують поділ і дедиференціацію клітин, необхідні для активування утворення корневих зачатків, регулюють соматичний ембріогенез, регенерацію органів із калюсу.

Абсцизини – їх дія пов'язана зі спокоєм бруньок і насіння, опаданням квіток, плодів, старінням і дозріванням органів рослин.

Етилен прискорює дозрівання плодів, стимулює опадання листя.

Лабораторна робота 35.

Ізольована тканина сої, як тест-система на цитокініни

Калюсна культура сім'ядолей сої дуже чутлива до дії цитокінінів, відсутність яких в поживному середовищі призводить до зупинки її росту. При додаванні цитокінінів в середовище ріст калюсної тканини повністю відновлюється.

Мета роботи: отримання калюсної тканини сої на живильних середовищах з різним вмістом цитокінінів.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), живильні середовища, чашки Петрі, стерильні сім'ядолі сої, спиртівка.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильні середовища з різним вмістом цитокінінів і проавтоклаувати їх при 1 атм. протягом 25 хвилин. Склад живильних середовищ наведений в таблиці 9. Контролем слугує безгормональне живильне середовище.

2. В ламінар-боксі висаджують отриману раніше калюсну тканину сої на живильні середовища з різним вмістом регуляторів росту.

3. Культивують калюсну тканину в термостаті при регульованій температурі +25-26°C, відносній вологості повітря 60-70%, без доступу світла.

4. Через кожні 7 діб визначають ростові характеристики калюсних тканин сої (рис.20) (тема 3).

5. Після закінчення досліду на основі отриманих даних будують графіки для визначення дії цитокінінів на ріст калюсних тканин сої, відкладаючи на горизонтальній осі номери калюсів, на вертикальній – ростові характеристики і роблять висновки про вплив різної концентрації цитокінінів на утворення калюсних тканин сої.

Таблиця 9.

Склад живильних середовищ з різним вмістом регуляторів росту

Вміст регуляторів росту	Варіанти живильного середовища		
	№ 1-3	№ 4-5	№ 6-7
Склад живильного середовища	кінетин, мг/л	БАП, мг/л	зеатин, мг/л
Макро- по Міллеру – 100 мл	-	-	-
Мікро- по Міллеру – 1 мл	0,1	0,1	0,1
Fe-хелат – 5 мл	0,5	0,5	0,5
Вітаміни по Уайту – 1 мл			
Гліцин – 2 мг/л			
ІОК – 2 мг/л			
Сахароза – 20 г			
Агар – 6 г			
pH 5,6 – 5,8			



Рис. 21. Калюсна тканина сої, при вирощуванні на живильних середовищах з різним вмістом цитокінінів

Лабораторна робота 36.

Ізольована культура тканини топінамбуру, як тест-система на ауксини

Калюсна тканина топінамбуру чутлива до дії ауксинів, при відсутності яких в живильному середовищі призупиняється ріст калюсу. Додавання ауксинів в живильне середовище, на якому культивуються експлантати стимулює відновлення росту калюсних тканин. Вивчення препаратів ауксинової дії необхідно проводити на стандартному середовищі, при заміні в ньому ауксинів на досліджуваний препарат. Ріст калюсних тканин топінамбуру на такому середовищі свідчить про ауксинову дію препарату.

Мета роботи: отримання калюсної тканини топінамбуру на живильних середовищах з різним вмістом ауксинів.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), живильні середовища, чашки Петрі, калюсна тканина топінамбуру, спиртівка.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильні середовища з різним вмістом ауксинів, які автоклавують при 1 атм протягом 25 хвилин. Склад живильних середовищ наведено в таблиці 10. Як контроль, використовують безгормональне живильне середовище.

2. В ламінар-боксі висаджують раніше отриману калюсну тканину топінамбуру на живильне середовище з різним вмістом регуляторів росту.

3. Калюсну тканину культивують в термостаті без доступу світла, при регульованій температурі $+26-28^{\circ}\text{C}$ і відносній вологості повітря 60-70%.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Таблиця 10.

Склад живильного середовища з різним вмістом ауксинів

Вміст регуляторів росту Склад живильного середовища	Варіанти живильного середовища		
	№ 1-3 ІОК, мг/л	№ 4-5 2,4-Д, мг/л	№ 6-7 Івин, мг/л
Макросолі МС – 100 мл	-	-	-
Мікросолі МС – 1 мл	0,5	0,5	0,5
Fe-хелат – 5 мл	1,0	1,0	1,0
Вітаміни МС – 1 мл	1,5	1,5	1,5
Гідролізат казеїну – 500 мг			
Кінетин – 0,2 мг/л			
Мезоінозит – 100мг			
Сахароза – 20 г			
Агар – 8 г			
Вода – 870 мл			
pH 5,6 – 5,8 до автоклавування			

4. Через кожні 7 діб визначають ростові характеристики калюсних тканин (рис.22) (масу, індекс росту, забарвлення, кількість клітин за методом Брауна) та заносять їх в таблицю.

5. В кінці досліду на основі одержаних даних будують графіки впливу різних препаратів ауксинової дії на ріст калюсної тканини топінамбуру, відкладаючи на горизонтальній осі номери калюсів, а на вертикальній відповідні ростові характеристики. Дають інтерпретацію одержаним результатам і роблять висновки про дію кожного досліджуваного препарату.

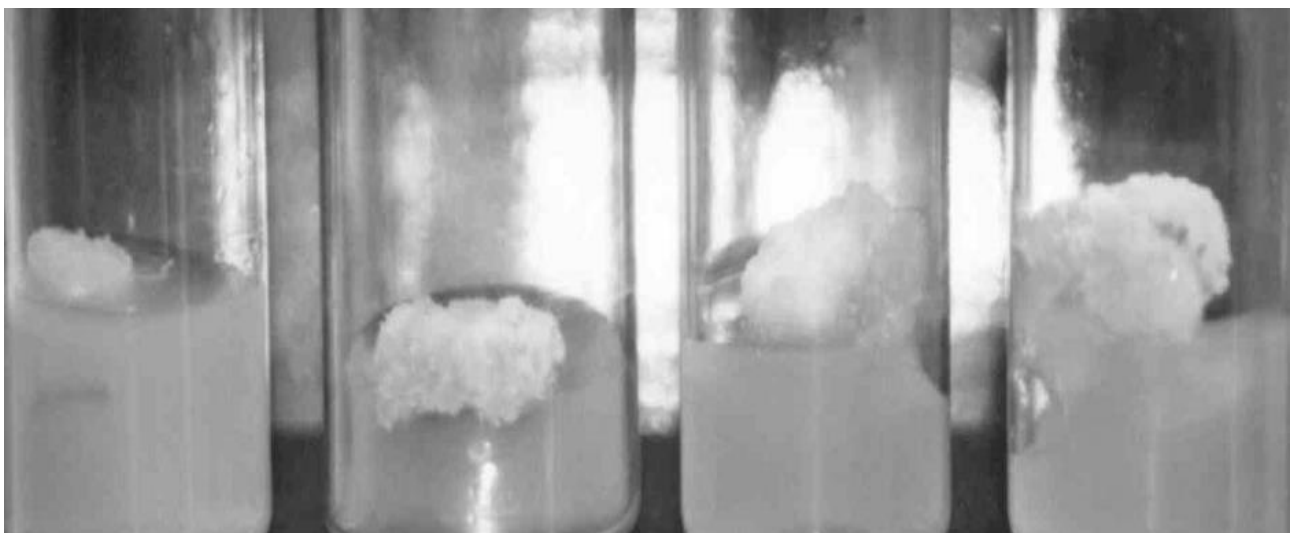


Рис.22. Калюсна тканина топінамбуру при культивуванні на живильних середовищах з різним вмістом ауксинів

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Лабораторна робота 37.

Вплив ауксинів, цитокінінів та гіберелінів на ріст і розвиток мікрочеренків стевії, картоплі, гвоздики

Мета роботи: вивчення впливу регуляторів росту на ріст та розвиток мікрочеренків різних рослин.

Матеріали і обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), живильні середовища, чашки Петрі.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати живильні середовища з розчинами досліджуваних регуляторів росту різної концентрації, які автоклавують при 1 атм протягом 25 хвилин. Склад середовищ наведений в табл. 11.

2. В ламінар-боксі за допомогою ланцету розділяють рослини-регенеранти (гвоздика, картопля, стевія) на мікрочеренки.

3. Мікрочеренки поміщають на живильні середовища з різним вмістом регуляторів росту.

4. Культивують експлантати в термальній кімнаті при температурі +25-26°C, 14-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 1000 лк та вологості повітря 60-70%.

5. Через кожні 7 діб визначають ростові характеристики (рис.23), утворених рослин-регенерантів (індекс росту, кількість міжвузлів та їх довжину).

6. В кінці досліду (на 35 - 40 день) підраховують коефіцієнт розмноження та будують графіки дії регуляторів росту на ріст і розвиток рослин-регенерантів і роблять відповідні висновки.

Таблиця 11.

Склад живильного середовища

Вміст регуляторів росту	Варіанти живильного середовища		
	№ 1-4	№ 5-7	№ 8-10
Склад живильного середовища	Ауксини (ІОК), мг/л	Цитокініни (кінетин), мг/л	Гібереліни (гіберелова кислота), мг/л
Макросолі МС – 100 мл	-	-	-
Мікросолі МС – 1 мл	0,1	0,1	0,1
Вітаміни МС - 1 мл	0,5	0,5	0,5
Fe-хелат – 1 мл	1,0	1,0	1,0
Сахароза – 20 г			
Агар – 8 г			
Вода – 870 мл			
pH 5,6 – 5,8 до автоклавування			



Рис. 23. Ріст мікрочеренків картоплі на середовищах з різним вмістом регуляторів росту

Тема 10. Культура ізольованих клітин і тканин в селекції рослин

Запліднення *in vitro* (подолання прогамної несумісності) проводять за неможливості здійснення запліднення при схрещуванні в природних умовах, яке спричинюється як фізіологічними (невідповідністю у часі дозрівання пилку та ін.), так і морфологічними особливостями (короткою пилковою трубкою або блокуванням її росту на різних етапах розвитку тощо). В умовах *in vitro* запліднення здійснюється при культивуванні зав'язі з нанесеним на неї готовим пилком на штучному агаризованому середовищі. Візуально ефект запліднення *in vitro* можна визначити за станом сім'ядолей і зародка, які швидко збільшуються в розмірах. Сформований зародок, як правило, не переходить у стан спокою, а відразу починає проростати і дає початок гібридному поколінню рослин.

Подолання постгамної несумісності. Постгамна несумісність при віддаленій гібридизації виникає після запліднення, що часто супроводжується утворенням щуплого, нездатного до схожості насіння, спричиненого розбіжністю у часі розвитку зародка і ендосперму. Внаслідок слабкого розвитку ендосперму зародок втрачає здатність до нормального проростання. У такому випадку із зернівки ізолюють зародок і вирощують його на живильному середовищі. Цей спосіб вирощування називають *ембріокультурою*. При віддалених схрещуваннях уже на ранніх етапах можуть спостерігатись

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

порушення в розвитку зародка, що проявляється у відсутності диференціювання та уповільнені його росту. Ріст культури зародка складається з двох етапів – ембріонального росту, в процесі якого триває його диференціювання, і проростання підрозлого зародка. Для стимулювання проходження першого етапу росту використовують живильне середовище з підвищеним вмістом сахарози і додаванням різних амінокислот, вітамінів і гормонів.

Метод ембріокультури в селекції рослин набуває останнім часом великого значення при отриманні віддалених гібридів зернових, злакових та інших сільськогосподарських культур. Доведено можливість збільшення виходу пшенично-житніх гібридів, при дорощувannya незрілих зародків, а також використання ембріокультури для подолання постгамної несумісності при гібридизації пшениці з колосняком. Метод ембріокультури знаходить все більш широке застосування в міжвидовій гібридизації овочевих культур. Зокрема для цибулі розроблені прийоми вирощування *in vitro* абортивних зародків, виділених із гібридного насіння на різних етапах ембріогенезу, а також зародків, від частково фертильних міжвидових гібридів. Культура ізольованих зародків використовується також у селекційній практиці томатів та інших овочевих рослин.

Метод ембріокультури знаходить застосування не тільки при віддаленій гібридизації, але й для подолання постгамної несумісності та мікроклонального розмноження цінних гібридів. При цьому клональне мікророзмноження відбувається шляхом калюсогенезу, індукції морфогенезу і отримання рослин-регенерантів з калюсної тканини. Техніка клонування незрілих зародків дозволяє розмножувати цінні генотипи рослин на ранніх стадіях їх життєвого циклу та використовується в клітинній селекції.

Клональне мікророзмноження віддалених гібридів. Ембріокультура дає можливість вирощувати гібридні рослини з неповноцінних зародків. Однак їх вихід при цьому незначний і гібриди часто бувають стерильними. Розмножують гібриди шляхом активування розвитку меристем пазушних бруньок (живцюванням стерильних пагонів), адвентивними бруньками або регенерацією рослин з калюсної тканини, отриманої при культивуванні зародків.

Одержання гаплоїдних рослин *in vitro* і використання їх у селекції. Застосування гаплоїдних рослин дозволяє пришвидшити добір компонентів для схрещування і значно скоротити тривалість селекційного процесу. Гаплоїдні рослини використовують для одержання стабільних гомозиготних ліній та мутагенезу, виходячи з того, що на гаплоїдному рівні полегшується добір рецесивних мутацій.

У диплоїдних рослин в гомологічних хромосомах мутації рідко зачіпають обидва алельних гени (домінантний і рецесивний). Для гетерозиготних рослин характерним є прояв дії тільки домінантного гена. Оскільки мутації частіше носять рецесивний характер, ніж домінантний, їх досить складно виявити в рослинному організмі. У гаплоїдних рослин, які містять тільки одну з кожної

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

пари гомологічних хромосом, мутації проявляються відразу, тому селекція на гаплоїдному рівні дозволяє проводити прямий добір як за домінантними, так і рецесивними ознаками.

Гаплоїдні особини стерильні, але при штучному подвоєнні набору їх хромосом за допомогою колхіцину із них можна одержати диплоїдні гомозиготні рослини. Гаплоїди можуть спонтанно виникати в природних умовах, але з дуже низькою частотою. В умовах *in vitro* можна одержати значно більшу кількість гаплоїдних рослин.

Існує *три способи одержання гаплоїдів* при використанні методу культури ізольованих тканин:

- *андрогенез* – одержання гаплоїдних рослин на штучному живильному середовищі з ізольованих пилку і мікроспор;

- *гіногенез* – одержання гаплоїдних рослин на штучному живильному середовищі з ізольованих сім'ядоль;

- *партеногенез* – одержання гаплоїдів з гібридних зародків, у яких через несумісність хромосом батьківських компонентів втрачаються хромосоми. Гаплоїдні ембріоїди, утворені в результаті елімінації хромосом батьківського геному, культивують на штучних живильних середовищах і одержують гаплоїдні рослини.

В культурі пиляків можливі два шляхи утворення гаплоїдних рослин. *Перший* - утворення рослин шляхом ембріогенезу в пилкових зернах. При цьому усередині пиляків із окремих пилкових зерен виникають ембріоїди, які проростають і утворюють гаплоїдні рослини;

Другий - отримання калюсу із клітин пиляку і подальшої регенерації рослин із калюсних тканин в результаті морфогенезу. Однак в цьому випадку рослини не завжди бувають гаплоїдними і часто відрізняються за плоїдністю. Природа їх походження до кінця не з'ясована - утворення від поліплоїдизованих гаплоїдних клітин або при злитті клітин.

Гаплоїди, отримані *in vitro*, можна використовувати не тільки в практичній селекції, але й у генетичній інженерії, в клітинній селекції. Для дослідів з генетичної трансформації пилкові зерна в деяких випадках є більш зручним об'єктом, ніж ізольовані протопласти.

Культивування *in vitro* пиляків, пилку, ізольованих зародків, незапліднених насінневих зачатків уможливорює отримання гаплоїдних рослин та калюсних тканин, що має суттєве значення для вирішення багатьох селекційно-генетичних програм. Особливий інтерес пов'язаний з можливістю їх дослідження як посередників при створенні подвоєних гаплоїдів (дигаплоїдів). У гаплоїдів набагато легше виявити цінні мутації, а при застосуванні колхіцину можна отримати повністю гомозиготні диплоїдні рослини. Наразі більш як у 30 видів можна отримати гаплоїдні рослини або тканини методом культури ізольованих пиляків та пилку.

В умовах *in vitro* індукція до росту мікроспор та утворення ембріоїдів може проходити двома шляхами: прямим ембріогенезом або непрямим – через

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

утворення калюсу та індукування в ньому органогенезу. В обох випадках цей процес абсолютно відрізняється від одержання гаплоїдів в умовах *in vivo*. Утворення гамет в культурі *in vitro* після одного-двох поділів блокується, тим часом як у вегетативних клітинах відбувається поділ за типом зиготи, що дає початок ембріонам. Перевагу надають прямому андрогенезу, при якому мікроспора поводить себе як зигота і проходить цілий ряд етапів ембріогенезу, включаючи утворення на пиляку рослин-регенерантів. У випадку непрямого андрогенезу мікроспора ініціює початок калюсоутворення. В подальшому в калюсі починається утворення ембріоїдів. Іноді для індукції органогенезу калюс необхідно пересадити на інше живильне середовище.

Відтворення ембріогенезу в контрольованих умовах є одним із шляхів пізнання процесів формування зародків на материнській рослині, а також вивчення реалізації генетичної інформації геному в цей період; встановлення причин і умов клітинного поділу, диференціації, формоутворення і морфогенезу. Всі дослідження в культурі зародків *in vitro* поділяються на дві групи: вирощування, в основному сформованих зрілих зародків та культивування зародків на ранніх етапах їх ембріонального розвитку.

В природних умовах спонтанні гаплоїди у рослин виникають дуже рідко. Натомість існує явище семігамії (подвійних паростків), при якому в одній насініні утворюється два або кілька зародків, один із яких буває гаплоїдним. Це спричинює у рослин затримку при самозапиленні або запиленні пилком іншого виду.

В практичній селекції гаплоїди використовують у таких напрямках:

- Створення гомозиготних ліній в селекції на гетерозис і для різноманітних генетичних досліджень.
- Одержання триплоїдів (рослин з потрійним набором хромосом) у поліплоїдних видів рослин з метою їх промислового використання.
- Подолання міжвидової несумісності (особливо у картоплі).
- Застосування у поліплоїдних видів для проведення попередньої селекції на більш низькому рівні плоїдності. Наприклад, спочатку одержують гомозиготні диплоїдні лінії з цінними ознаками, які за допомогою колхцинування переводять на більш високий рівень плоїдності.
- Для одержання анеуплоїдів (з метою визначення локалізації генів і переміщення хромосом).
- У квітникарстві декоративних культур, які характеризуються дрібними квітками і тривалим періодом цвітіння, зумовленим стерильністю.
- В мутаційній селекції, завдяки відсутності у гаплоїдів явища домінування (генотип відповідає фенотипу).

Лабораторна робота 38.

Ріст і розвиток пиляків в культурі *in vitro* (андрогагенез)

Культивування *in vitro* пиляків дає можливість отримувати гаплоїдні рослини та гаплоїдні калусні тканини (андрогагенез). Пиляки, не запрограмовані на утворення гамет, в умовах культури *in vitro* переключаються на процеси властиві вегетативній клітині. На ранніх стадіях розвитку пиляку в ньому закладаються багатоклітинні пилкові гнізда (мікроспорангії), із яких шляхом редукційного поділу утворюються тетради гаплоїдних мікроспор. В подальшому відбувається поділ мікроспори в процесі мітозу внаслідок чого формуються зрілі пилкові зерна (пилінки), оточені зовні екзиною і інтиною, а усередині містять ядро пилкової трубки і два спермії. Мітотичний поділ мікроспор з наступною диференціацією вмісту на дві клітини (велику вегетативну і маленьку генеративну) і є початком проростання мікроспори.

Відомо два методи одержання гаплоїдів шляхом андрогагенезу *in vitro*:

1 – метод культури пиляків (пилінок знаходиться усередині соматичних тканин пиляку)

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

Пиляки виділяють із бутонів і переносять на живильне середовище. При цьому великого значення набувають вік рослин-донорів, з яких одержують пиляки і фізичні умови їх вирощування, а саме: температура, фотоперіод та інтенсивність освітлення, яка впливає, зокрема, на процеси індукції новоутворень в культурі пиляків і пилку.

Мета роботи: набуття навичок виділення пиляків та спостереження за їх розвитком в умовах *in vitro*.

Матеріали і обладнання: рослини ріпаку на стадії цвітіння, стерилізуючі розчини (70% етанол, розчин діюциду), стерильна дистильована вода, стерильні пінцети, ланцети, поживні середовища для андрогагенезу, мікроскоп, 3% розчин ацетокарміну, предметне скло та покривельні скельця, ламінар-бокс.

ХІД РОБОТИ:

1. Зрізані квітки ріпаку витримують протягом 4 діб при температурі +4°C в холодильній камері.

2. Мікроспори обробляють 3% розчином ацетокарміну і визначають під мікроскопом стадію розвитку пилку в пиляку.

3. Відбирають бутони з пиляками, які містять переважно одноядерні мікроспори, враховуючи оптимальну для андрогагенезу стадію ранньої одноядерної мікроспори.

4. Відділяють квіткові бруньки і стерилізують їх в розчині діюциду протягом 10 хв з наступним трьохразовим промиванням в стерильній воді по 10 хв.

5. Пінцетом з довгими кінцями відбирають пиляки і висаджують їх у пеніцилінові флакончики на живильне середовище складу:

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Макро МС	100 мл
Мікро МС	1 мл
Вітаміни МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
μ-інозит	100 мг
Глютамін	800 мг
Серин	100 мг
НОК	0,1 мг/л
2,4-Д	0,1 мг/л
Сахароза	100 г
Агар-агар	7-8 г
рН 5,5-5,6 до автоклавування	

6. Пиляки інкубують в термостаті при регульованих температурних умовах (+24 – 27°C), інтенсивності освітлення 2000 лк та фотоперіоді 14 годин.

7. Через 25 – 30 днів проводять візуальне визначення частоти утворення калюсу та морфологічних структур на експлантатах. Одержані результати заносять у табл.11.

Таблиця 11.

№ п/п	Сорт, гібрид	Загальна кількість експлантатів, шт	Кількість експлантатів, що утворили калюс		Кількість експлантатів, що утворили морфологічні структури	
			штук	%	штук	%

Лабораторна робота 39.

Одержання гаплоїдів з жіночого гаметофіту (гіногенез)

В культурі *in vitro* відомо два способи одержання гаплоїдних рослин з жіночого гаметофіту.

1. Затримка запилення, яка призводить до поділу яйцеклітини без запліднення.

2. Запліднення пилком іншого виду рослин або пилком, ядра якого опромінені великими дозами γ - променів.

Важлива роль належить компонентам насінневого зачатку, з яких розвивається зародок. Найкращим вважають такий стан зародкового мішка, при якому повністю відбувається диференціювання гаплоїдних елементів (яйцеклітини, двох синергід і трьох антиподів), потенційна тотипотентність яких може бути реалізована у вигляді зародків або калюсної тканини.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Розроблено технологію одержання гіногенетичних гаплоїдів для цукрових буряків, соняшнику, пшениці та інших сільськогосподарських культур.

У покритонасінних рослин мегаспорогенез (розвиток насінневого зачатку і зародкового мішка) проходить відносно швидко – за декілька днів або годин. З однієї материнської археспоріальної клітини нуцелуса шляхом 5 – 6 поділів утворюється готовий до запилення зародковий мішок.

Мета роботи: одержати гаплоїдні рослини з жіночого гаметофіту

Матеріали і обладнання: квіткові бруньки цукрових буряків, стерилізуючі розчини (70% етанол, розчин діюциду), стерильна дистильована вода, стерильні пінцети, ланцети, живильні середовища, мікроскоп, ламінар-бокс.

ХІД РОБОТИ:

1. За 2 – 3 дні до початку цвітіння провести кастрацію материнської рослини, шляхом видалення маточки квітки.

2. Стовпчик маточки стерилізують розчином діюциду з наступним трьохразовим промиванням по 10 хв дистильованою стерильною водою.

3. Стерильним пінцетом стовпчик маточки переносять у пробірки на живильне середовище (рН 5,5-5,6 до автоклавування) для індукції органогенезу, склад якого

Макро МС	100 мл
Мікро МС	1 мл
Вітаміни МС	1 мл
Fe-хелат	5 мл
μ-інозит	100 мг
кінетин	0,25 мг/л
2,4-Д	0,1 мг/л
Сахароза	100 г
Агар-агар	7-8 г

4. Пробірки з рослинним матеріалом культивують в світловій культуральній кімнаті при температурі +27°C, фотоперіоді 14 годин.

5. Через 25 – 30 днів проводять візуальне визначення частоти утворення калюсу та морфологічних структур на експлантатах.

6. Отримані результати заносять у таблицю 12.

Таблиця 12.

№ п/п	Загальна кількість експлантів	Кількість асептичних експлантів	Кількість експлантів, що утворили калюс	Кількість морфогенних структур

Лабораторна робота 40.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Ембріокультура

На сучасному етапі досить глибоко досліджено морфологію ембріонального процесу покритонасінних рослин, що дає можливість для вивчення фізіолого-біохімічних особливостей і розшифрування механізму диференціації тканин і репродуктивних органів та дозволяє наблизитись до механізмів управління процесом ембріогенезу. Значний інтерес представляють дослідження індукції соматичних зародків в калюсній культурі і одержання з них рослин-регенерантів. Вдосконалення методу культури ізольованих зародків буде сприяти його широкому використанню в біологічних дослідженнях, в тім числі і в селекційно-генетичних. Особливо ефективний цей метод при вирощуванні рослин із маложиттєздатних, абортивних зародків, які утворюються при схрещуванні географічно і генетично віддалених форм рослин. Використання культури зародків є необхідною умовою для одержання нових форм і сортів сільськогосподарських культур та поповнення їх генофонду.

Мета роботи: розробка методичних прийомів для культивування ізольованих незрілих зародків цукрових буряків.

Матеріали і обладнання: насіння цукрових буряків, 0,5% розчин сулеми, стерильна дистильована вода, стерильні пінцети, ланцети, живильні середовища.

ХІД РОБОТИ:

1. Насіння цукрових буряків стерилізують 0,1% розчином сулеми протягом 20 хв і промивають три рази по 10 хв в стерильній дистильованій воді.
2. Насіння по 20 – 25 шт. поміщають у стерильні чашки Петрі із зволженим паперовим фільтром і залишають на ніч для набубнявіння.
3. Вичленяють зародки із насіння за допомогою стерильного ланцета.
4. Стерилізують зародки 0,5% розчином сулеми протягом 5 хв і стерильною водою відмивають п'ять разів по 5 хв від залишків стериліанту.
5. Стерильним пінцетом зародки переносять у стерильні чашки Петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами для обсушування.
6. Зародки переносять стерильним пінцетом у пеніцилінові флакончики на живильне середовище складу:

Макросолі Гамборга	100 мл
Мікросолі Гамборга	1 мл
Fe-хелат	5 мл
Вітаміни МС	1 мл
Кінетин	0,2 мг/л
Гіберелова кислота	0,5 мг/л
Піридоксин	1,0 мг/л
Глютамін	50 мг/л
Сахароза	30 г

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

Агар-агар

7 г

pH 5,6 до автоклавування

7. Ізольовані незрілі зародки спочатку необхідно витримати протягом перших 10 діб в термостаті при температурі +10–12°C і постійному освітленні (1,2–1,4 клк), культивуючи надалі при температурі +26°C і 16-годинному фотоперіоді (1,2 клк).

8. Одержані результати заносять у табл. 13.

Таблиця 13.

№ п/п	Сорт, гібрид	Загальна кількість експлантатів, шт	Кількість експлантатів, що утворили калюс		Кількість експлантатів, що утворили морфологічні структури	
			штук	%	штук	%

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Клітинна інженерія рослин та її завдання.
2. Дайте перелік основних етапів розвитку біотехнології.
3. Дайте визначення терміну «тотипотентність клітин».
4. В якому році (і ким) було відкрито регулятори росту цитокініни? Яка природа цих речовин?
5. Дайте перелік основних напрямків використання культури ізольованих клітин і тканин рослин у біотехнології.
6. Назвіть головні відмінності між прокаріотичними та еукаріотичними клітинами.
7. Який процес визначає формування калюсної тканини рослин?
8. Яку роль відіграють ауксини та цитокініни при калюсогенезі?
9. Що відбувається з клітинами та тканинами рослин у процесі їх дедиференціації?
10. Дайте визначення калюсної тканини і назвіть її основні типи.
11. Зробіть перелік основних фази росту клітин та охарактеризуйте кожна з них.
12. Фізіологічна асинхронність клітинних культур рослин.
13. Назвіть причини генетичної гетерогенності культур в системі *in vitro*.
14. Дайте визначення гормонезалежності клітинних культур рослин.
15. Суспензійні культури клітин.
16. Дайте перелік основних умов, необхідних для культивування клітинних суспензій.
17. Назвіть ступені агрегації клітин в суспензійних культурах і охарактеризуйте їх особливості.

РОЗДІЛ 2. Вплив мінеральних компонентів на розвиток клітини

18. Дайте визначення поняття ізольовані протопласти. Ким і коли був запропонований цей термін?
19. Хто вперше виділив ізольований протопласт і з якого об'єкта?
20. Охарактеризуйте механічний і ферментативний методи виділення ізольованих протопластів і порівняйте їх особливості.
21. Які умови необхідні для культивування ізольованих протопластів?
22. Дайте визначення процесу морфогенезу в умовах культури *in vitro*.
23. В чому полягає вторинне диференціювання калюсної клітини?
24. Дайте визначення клітини-ініціалі.
25. Пояснити роль гістогенезу в клітинних культурах рослин.
26. Які типи морфогенезу характерні для культур *in vitro* і в чому вони полягають?
27. Дайте перелік умов, необхідних для переходу клітин до морфогенезу *in vitro*.
28. Назвіть стадії формування соматичних ембріодів з калюсної клітини.
29. Дати визначення терміну «клональне мікророзмноження». Які переваги характерні для даного методу, порівняно із традиційними методами розмноження рослин?
30. Ким, коли і на якому об'єкті, вперше започатковано роботи з клонального мікророзмноження рослин?
31. Охарактеризуйте основні етапи клонального мікророзмноження рослин.
32. Які можливості дає метод термотерапії і на чому він заснований?
33. Що таке хемотерапія та її застосування.
34. Дати перелік методів *in vitro*, які використовуються для селекції рослин.
35. Що таке ембріокультура і для чого вона використовується?
36. Назвіть способи одержання гаплоїдів в умовах *in vitro*.
37. Які методичні прийоми використовують при проведенні клітинної селекції?
38. Які умови необхідно створити для одержання стабільно стійких ліній клітинних культур?
39. Назвіть переваги клітинної селекції в умовах *in vitro*, порівняно з традиційними методами селекції.

РОЗДІЛ 3. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Генетична інженерія (або генна технологія) рослин базується на досягненнях молекулярної біології другої половини ХХ століття, котрі уможливили перенесення окремих генів або їх функціональних елементів із одних організмів в інші. Датою заснування генетичної інженерії вважають 1973 рік, коли в 1972 – 1973 р. П. Берг, Г. Бойер і С. Коен із співробітниками створили першу рекомбінантну ДНК, яка містила фрагменти ДНК вірусу SV40, бактеріофага λ і лактозного оперона *E. coli*. Через 10 років було отримано перші трансгенні рослини, пізніше – трансгенні миші, а через 20 років – трансгенні вівці.

Натепер генетична інженерія має великий арсенал знань і методів для ефективного перенесення корисних генів. Слід зазначити, що принципів обмежень для пересадження генів не існує, тобто ген будь-якого походження може бути вбудований в геном рослини. Однак ген повинен бути адаптований для роботи у відповідному рослинному організмі, а інакше його реальна експресія може бути недостатньою або зовсім відсутньою.

Вибраний для перенесення ген прийнято називати *цільовим*. Підготовлені для трансформації цільові гени вводять в рослину, зазвичай, сумісно з яким-небудь допоміжним геном, який називається *маркерним*. Як правило використовують маркерні гени двох основних типів: *селективні* гени, які надають рослинам стійкості до антибіотиків або гербіцидів; *репортерні* гени - кодуєть нейтральні для клітин білки, наявність яких в клітинах можна легко тестувати. На відміну від селективних, репортерні гени практично не впливають на метаболізм трансгенних рослин або їх стійкість до селективних агентів. Важливо відмітити, що продукти репортерних генів нового покоління, таких як гени автофлюоресцентних білків дозволяють проводити швидкий прижиттєвий скринінг трансгенних рослин навіть в польових умовах. Заміна селективних генів на репортерні при відборі трансгенних рослин часто є дуже бажаною, оскільки можливість потенційного ризику для навколишнього середовища і здоров'я людини при використанні репортерних генів практично виключена.

Молекулярні основи генетичної інженерії

Генетична інженерія – це конструювання *in vitro* функціонально активних генетичних структур (рекомбінантних ДНК), які надають організму нові генетичні та інші властивості або інакше – створення штучних генетичних програм. За допомогою методів генетичної інженерії вводять в ядерний апарат реципієнта не тільки окремі нові гени і регуляторні послідовності не властиві даному організму, але й одержують нові форми організмів, шляхом введення цілих хромосом, окремих органодів або злиття двох клітин. Таке перенесення називають трансгенезом, а організми, в ДНК яких включено чужорідні гени - трансгенними.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Перше повідомлення про нуклеїнові кислоти (ДНК і РНК) було зроблено Ф.Мішером в 1869 р. Через 75 років, у 1944 р., О.Т. Евері зі співробітниками довели, що саме в молекулі ДНК зберігається спадкова інформація. Вони провели трансформацію невірулентного штаму пневмокока у вірулентний за допомогою очищеного препарату дезоксирибонуклеїнової кислоти, виділеної з вірулентних клітин. В 1953 р. Д. Уотсоном і Ф. Кріком була створена модель структури ДНК, а в 1966 р. М.Ніренберг, С. Очоа та Х.Г.Корана розшифрували генетичний код і виділили ферменти (лігази та рестриктази), які беруть участь у метаболізмі нуклеїнових кислот.

Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) – складна високомолекулярна біологічна полімерна дволанцюгова молекула, побудована за принципом комплементарності, яка забезпечує її стабільність і точне відтворення при побудові дочірніх ланцюжків. Мономером ДНК слугують чотири типи нуклеотидів, кожний з яких складається з 5-вуглецевого цукру – дезоксирибози, фосфатної групи та азотистої основи. Нуклеотиди відрізняються за азотистими основами, що підрозділяються на дві групи: пуринові (аденін та гуанін) і піримідинові (цитозин і тимін). У молекулах рибонуклеїнової кислоти (РНК) – тимін замінюється на урацил. Основи нуклеотидних ланцюгів з'єднуються між собою водневими зв'язками за принципом комплементарності (А – Т та Г – Ц). Розмір молекули ДНК визначається числом пар комплементарних нуклеотидів і сягає від декількох тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) до мільйонів пар нуклеотидів (м.п.н.).

У молекул ДНК, як носіїв генетичної інформації важливою одиницею є гени – елементарні одиниці спадковості, за допомогою яких відбувається кодування, зберігання і передача спадкових властивостей організму в низці поколінь. Кожен ген характеризується строго певною послідовністю нуклеотидів. Більша частина генів містить інформацію про будову білків, а деякі кодують тільки певні молекули РНК (наприклад, рибосомальну РНК). У вищих організмів гени знаходяться в хромосомах, займаючи у них певне місце – *локус*. Сукупність генів організмів становить їх генотип. За функціями гени поділяють на структурні, які несуть інформацію про послідовність амінокислот у білковій молекулі, і регуляторні, що не несуть такої інформації, але контролюють і регулюють діяльність структурних генів. Ген має розмір 0,0003 – 0,0005 мкм і складається у середньому з 1000-1500 пар нуклеотидів. Ген тільки відносно постійний, його зміни (мутації) – джерело мінливості рослинних організмів і вірусів.

Генетичні конструкції, які використовуються для перенесення чужорідної ДНК називають рекомбінантними ДНК. До їхнього складу входить фрагмент донорної ДНК (ДНК, що клонується) і векторна ДНК (відповідає за перенесення та вбудовування – інтеграцію клонованої ДНК). Молекули рекомбінантної ДНК використовуються для клонування необхідних ділянок ДНК, картування ДНК, створення трансгенних організмів, масового одержання продуктів, закодованих даною ділянкою ДНК. Рекомбінантні ДНК стають

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

складовою частиною генетичного апарату реципієнтного організму та забезпечують йому нові унікальні генетичні, а відтак біохімічні і фізіологічні властивості.

Технологія одержання рекомбінантних ДНК включає наступні методичні підходи

1. Специфічне розщеплення ДНК ферментами рестрикційними ендонуклеазами, що прискорює виділення та маніпуляції з окремими генами.
2. Секвенування всіх нуклеотидів у певному фрагменті ДНК для визначення межі гена та послідовності амінокислот, які він кодує.
3. Конструювання рекомбінантної ДНК.
4. Гібридизація нуклеїнових кислот, яка дозволяє виявляти з великою точністю і чутливістю специфічні послідовності РНК і ДНК, засновано на їх здатності зв'язувати комплементарні послідовності нуклеїнових кислот.
5. Клонування ДНК шляхом введення її фрагмента в бактеріальну клітину, яка після такої трансформації відтворює цей фрагмент у мільйонах копій (ампліфікація *in vitro*) та створення геномних бібліотек.
6. Введення рекомбінантної ДНК в клітини або рослинні організми.

Ферменти генетичної інженерії.

Ферменти генетичної інженерії – це ферменти, які дозволяють проводити різноманітні маніпуляції з молекулами ДНК. Більшість ферментів, необхідних для одержання рекомбінантних ДНК виділяють з клітин бактерій і використовують для «розрізання» або «зшивання» ДНК як прокаріотичних, так і еукаріотичних клітин.

Основні ферменти генетичної інженерії підрозділяють на декілька груп:

- *рестриктази* - ферменти, за допомогою яких виділяють фрагменти ДНК;
- *ДНК-полімерази* - ферменти, що синтезують ДНК на матриці ДНК
- *зворотні транскриптази (ревертази)* – ферменти, які синтезують ДНК на матриці РНК;
- *лігази* - ферменти, що з'єднують фрагменти ДНК;
- *ферменти, що змінюють будову кінців фрагментів ДНК;*
- *нуклеази* – ферменти, що каталізують реакцію гідролізу нуклеїнових кислот.

Рестриктази (рестрикційні ендонуклеази) – це високоспецифічні ферменти, які розпізнають і розрізають певні послідовності азотистих основ у молекулі ДНК (сайти рестрикції). У генетичній інженерії їх використовують для вирізання необхідних ділянок з молекули донорної ДНК.

Рестриктази виділяють з бактерій, їх було виявлено також в дріжджах та одноклітинних водоростях. Номенклатура рестриктаз запропонована в 1973 р. С.Смітом та Д.Натансом, згідно якої назви ферментам дають за назвами тих бактерій, з яких вони були виділені. Перша буква назви означає рід мікроорганізму, дві наступні – його вид. Надалі йде порядковий номер даної

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

рестриктази в низці інших ендонуклеаз, виділених з даного організму. Наприклад, рестриктази *Hpa* I, *Hpa* II – ферменти, виділені з *Haemophilus parainfluenzae*; *Eco* RI – рестриктаза, виділена з *E. coli*. Іноді вставляють ще одну, четверту, латинську букву – як показник штаму бактерій: *Hind* III – з *Haemophilus influenzae*. В разі локалізації захисної системи бактеріальної клітини (система рестрикції – модифікації) в плазміді, вказують також символ плазміди – R, наприклад, *Eco* RI.

Єдиною основною функцією рестриктаз є захист бактерії від чужорідної ДНК (насамперед від ДНК бактеріофагів, які можуть проникати в клітину і спричинюють трансформацію). Ферменти рестрикції обмежують можливість розмежування фагової ДНК, розрізаючи її на частини, і не проявляють здатності до розрізання своєї власної ДНК, завдяки модифікації метилюванням бактеріальної ДНК, яке здійснюється ферментом ДНК-метилязою. Відповідні рестриктази розпізнають в ДНК послідовності з декількох (від чотирьох до восьми) нуклеотидів, здійснюючи несиметричні, або симетричні розриви. При розщепленні молекула ДНК розрізається з утворенням так званих «липких» або «тупих» кінців. «Липкі» кінці утворюються при розривах в різних ланцюгах ДНК, що відбуваються зі зміщенням їх один до одного (рестриктази *Eco* RI; *Hind* III), а «тупі» – виникають при розривах в ланцюгах один проти одного (рестриктази *Taq* I, *Hpa* I, *Sma* I). Наразі виділено понад 2000 рестриктаз, які можуть розпізнавати більше 150 сайтів рестрикції.

ДНК-полімерази, зворотні транскриптази – ферменти, які синтезують комплементарну ДНК на одноланцюговій ДНК – матриці при подовженні ланцюга ДНК в напрямку 5' → 3' шляхом приєднання комплементарного нуклеотида. У генетичній інженерії часто використовують ДНК-полімеразу I, виділену А. Корнбергом та співавторами в 1958 р. із клітин *E. coli* або фага T4. Цей фермент має трьохдоменну структуру. При видаленні N-кінцевого домену частина молекули, що залишилася (фрагмент Кленова) зберігає характерні для неї каталітичні властивості. ДНК-полімераза в клітині *in vivo* відіграє важливу роль у репарації (відновленні структури) ушкодженої ДНК, здійснюючи так звану нік-трансляцію (нік – розрив одного з ланцюгів ДНК). Властивості даного ферменту використовуються для створення кДНК бібліотек.

РНК-залежна ДНК-полімераза, ревертаза – ферменти, які використовують для синтезу комплементарного ланцюга ДНК на РНК - матриці. Вперше їх було виділено Г. Теміном та С. Мізутані в 1970 р. з вірусу саркоми Рауса. Ревертази можуть синтезувати комплементарний ланцюг ДНК на РНК – матриці. Отриману дволанцюгову комплементарну молекулу ДНК (кДНК) вбудовують у вектори, розмножують в складі гібридних молекул ДНК і використовують для подальших досліджень та створюють кДНК-бібліотеки. Молекули кДНК не містять нітронів, що дозволяє клонувати ДНК еукаріот в прокаріотичних системах. За допомогою ревертаз можна отримувати кДНК-ДНК копії мРНК. кДНК дають можливість вивчати будову генів та ідентифікувати повноцінні копії цих генів в геномі.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Лігази – ферменти, які «зшивають» фрагменти ДНК за рахунок фосфодіефірних зв'язків, що утворюються між 3'-гідроксильною кінцевою групою одного фрагмента ДНК та 5'-фосфатною групою іншого фрагмента (лігування). З двох типів існуючих лігаз для лігування фрагментів ДНК зазвичай використовують більш універсальну лігазу фага Т4 для «зшивання» «липких» і «тупих» кінців. В умовах *in vivo* при ураженні рослин бактеріозами ДНК-лігази беруть участь в процесах репарації ДНК і реплікації при подвоєнні ланцюга ДНК.

Ферменти, що змінюють будову кінців фрагментів ДНК. Лужна фосфатаза відщеплює від лінійного фрагмента молекули ДНК 5'-фосфатні угруповання, знижуючи кількість випадково утворених небажаних комбінацій фрагментів ДНК (у тому числі тих, що виникають під дією ДНК-лігази). Нуклеаза *Bal 31* – фермент, дія якого пов'язана з неспецифічним видаленням нуклеотидів з послідовності ДНК, що дозволяє «підтупити» несиметричні кінці ДНК або вкоротити їх фрагменти, шляхом зближення функціонально значимих елементів.

Нуклеази – велика група ферментів, які каталізують реакцію гідролізу молекул нуклеїнових кислот. В результаті дії нуклеаз молекула ДНК або РНК розпадається на фрагменти чи окремі нуклеотиди. Вихідна функція нуклеаз в клітині - деградація непотрібних на даний момент життєдіяльності молекул (наприклад, деградація мРНК після трансляції) і захист від чужорідних молекул нуклеїнових кислот (розщеплення фагової ДНК бактеріальними нуклеазами при ураженні бактерії фагом). За типом їх дії нуклеази можна поділити на декілька груп. Нуклеази, які можуть діяти тільки на молекули ДНК (ДНКази) або РНК (РНКази), чи на молекули ДНК і РНК одночасно (нуклеаза золотистої квасолі). Нуклеази вибірково можуть діяти на одноланцюгову (нуклеаза S1), або дволанцюгову (екзонуклеаза III) молекули ДНК, чи на гібридну ДНК-РНК-молекулу (рибонуклеаза H). Крім того, нуклеази розділяють на два типи: *екзонуклеази* і *ендонуклеази*. Екзонуклеази зазвичай гідролізують молекули з 5'-чи 3'- вільними кінцями, а ендонуклеази можуть розщеплювати послідовності усередині фрагмента або кільцевої молекули ДНК.

Визначення нуклеотидної послідовності (секвенування) ДНК.

Методи, що дозволяють ідентифікувати генетично важливі ділянки ДНК, мають велике значення. Вони також сприяють розробці виключно ефективних нових методів секвенування ДНК і створення рекомбінантних молекул. Секвенування дає можливість досить швидко визначити повну нуклеотидну послідовність ДНК для 100-500 нуклеотидних пар та визначити структуру, функції, можливості рекомбінації і ампліфікації молекул або фрагментів молекул нуклеїнових кислот. За допомогою рестрикційних ферментів ДНК розділяють на фрагменти, визначають послідовність нуклеотидів хімічним або ензиматичним методом.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Хімічний метод було запропоновано в 1976 р. А. Максамом та У. Гілбертом. Заснований на хімічній деградації ДНК – специфічній хімічній модифікації пуринових та піримідинових основ з наступним розщепленням модифікованих нуклеотидів із ланцюгу ДНК і аналізом утворених продуктів методом гель-електрофорезу. Перед початком досліду один з кінців фрагменту ДНК мітять за допомогою ізотопу фосфору ^{32}P . Отримані електрофореграми проявляють за допомогою рентгенівської плівки. Таким чином, фракціонуючи на одній гелевій пластині фрагменти, утворені після специфічного відщеплення кожного з чотирьох нуклеотидів (А, Т, Г і Ц), можна безпосередньо читати нуклеотидну послідовність секвенованих ДНК, за проявленою електрофореграмою.

Ензиматичний метод базується на використанні дії фермента ДНК-полімерази I. При аналізі фрагмента ДНК його використовують як матрицю в реакції полімеразного копіювання (синтезу комплементарного ланцюга ДНК) за допомогою ДНК-полімерази I *E.coli*. Метод одержав назву «плюс-мінус-метод», оскільки реакцію полімеризації спочатку проводять при відсутності одного із чотирьох типів нуклеотидів («мінус»-система), або за наявності тільки одного нуклеотида («плюс»-система), що обмежує можливість нарощування полінуклеотидного ланцюга, тобто зупиняє (термінує) його синтез через нестачу відповідного нуклеотиду. Для зупинки синтезу використовують спеціальні молекули – термінатори. Продукти реакцій аналізують методом електрофорезу, а послідовність, що секвенується, зчитують з радіоавтографа, як і в разі хімічного секвенування.

Конструювання фрагментів рекомбінантних ДНК («зшивання»).

Фрагменти рекомбінантних ДНК, отримані після дії рестриктаз, які містять певні гени «зшивають» одним із трьох основних методів, залежно від того, які кінці мають фрагменти «зшивання» ДНК – «тупі» або «липкі».

«Зшивання» за однойменними «липкими» кінцями. Це найбільш простий метод за допомогою якого вперше в 1973 р. С. Коеном та співавторами було отримано гібридну ДНК. Два фрагменти ДНК (незалежно від їх походження), утворені під дією однієї і тієї ж рестриктази, яка дає фрагменти рестрикції з «липкими» кінцями, можуть «злипатися» за рахунок утворення водневих зв'язків між одноланцюговими ділянками комплементарних нуклеотидів. Однак після такого спарювання повна цілісність подвійної спіралі не відновлюється, оскільки залишаються два розриви у фосфодиефірному скелеті. Для її відновлення, тобто «зшивання», або лігування ниток, використовують ДНК-лігазу бактеріофага Т4. Цей фермент у живій клітині також виконує функцію «зшивання» фрагментів ДНК, що синтезуються при реплікації.

«Зшивання» за «тупим» кінцям. «Тупі» кінці можна з'єднувати під дією фермента ДНК-лігази. У цьому випадку реакція лігування має свої особливості, проте її ефективність нижча, ніж при «зшиванні» за «липкими» кінцями. Вперше такі експерименти були проведені в 1972 р. П.Бергом у

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Стенфордському університеті (США). Метод зокрема використовують при клонуванні ДНК-копій матричних РНК, які доступні в обмежених кількостях.

«Зшивання» фрагментів з різнойменними кінцями. При «зшиванні» фрагментів, утворених різними ендонуклеазами рестрикції, які мають некомплементарні один одному «липкі» кінці, застосовують так звані лінкери (або «перехідники»). Лінкери – хімічно синтезовані олігонуклеотиди, що представляють собою сайти рестрикції або їх комбінацію. Вперше ця ідея була запропонована Г. Шеллером та співавторами в 1977 р. «Липкі» кінці також можна приєднати ферментативним шляхом до молекул ДНК з «тупими» кінцями. При цьому спочатку «добудовують» відсутні фрагменти для утворення комплементарних «липких» кінців, а надалі для ковалентного з'єднання двох фрагментів використовують ДНК-лігази. Оскільки можна формувати досить довгі взаємно-комплементарні одноланцюгові кінці, гібридні молекули утворюються з високою ефективністю.

Гібридизація – метод виявлення специфічних послідовностей нуклеотидів.

Реакція гібридизації використовується в генетичній інженерії для аналізу гібридних молекул ДНК як досить чутливий метод виявлення певних послідовностей в ДНК та РНК. Гібридизація базується на здатності азотистих основ утворювати комплементарні пари. При нагріванні сольового розчину ДНК до 100°C і підвищенні рН до 13, відбувається її денатурація (плавлення) та дисоціювання на два окремих ланцюги за рахунок руйнування комплементарних зв'язків між азотистими основами. Цей процес зворотний і носить назву ренатурація або гібридизація, оскільки витримання ДНК при температурі +65°C призводить до відновлення структури подвійної спіралі. Процеси гібридизації відбуваються між будь-якими одинарними комплементарними ланцюгами: ДНК – ДНК, РНК – РНК, РНК – ДНК.

Для тестування використовують одноланцюговий фрагмент ДНК або ДНК-зонд, комплементарний до тієї послідовності, яку хочуть виявити, одержуючи його клонуванням або шляхом хімічного синтезу. Одноланцюгова ДНК, що використовується як індикатор, називається ДНК-зондом і може містити від 15 до 1000 нуклеотидів.

Методи клонування ДНК.

Фрагменти ДНК будь-якого виду, отримані за допомогою рестриктаз, вводять в плазмиду чи в бактеріофаг, одержуючи в такий спосіб вектор, а потім розмножують ці генетичні елементи в клітинах бактерій або дріжджів, збільшуючи їх число в мільйони разів.

Методи клонування ДНК базуються на двох підходах:

- використання бактеріальних або дріжджових клітин для розмноження введеної в неї чужорідної ДНК (клонування ДНК *in vivo*), а також створення банку генів (геномної бібліотеки);

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

- ампліфікації ДНК *in vitro*.

При проведенні біотехнологічних експериментів виникає необхідність ідентифікувати гени, кодуючі певні структурні білки. Їх виявляють та ідентифікують завдяки геномним бібліотекам, використовуючи три широко розповсюджені методи: гібридизація з міченим ДНК-зондом (ДНК-гібридизація) і наступним радіоавтографічним аналізом, імунологічний скринінг та скринінг за активністю білка, що кодується необхідним геном.

ДНК-гібридизація полягає в комплементарному спарюванні ДНК-мішені та міченого ДНК-зонда. Гібридні молекули найчастіше виявляють радіоавтографічним методом. При застосуванні двох інших методів виявлення ДНК-мішені відбувається за виявленням продукта її експресії – білка або його частини. Наявність білка визначають імунологічними методами (*імунологічний скринінг*) або за активністю білкового продукту за його наявності (*скринінг за активністю білка*). Одержання необхідного для перенесення гена, здійснюють шляхом виділення його із підходящого геному, або методами синтезу (хімічним чи ферментативним шляхом), чи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Найчастіше необхідний ген виділяють із банку генів.

Клонування ДНК *in vivo*.

Для клонування ДНК *in vivo* створюють банк генів (бібліотеку ДНК), тобто колекцію клонів ДНК, які включають всі фрагменти геному даного виду. Використовуючи мікроорганізми можна створювати два типи бібліотек - геномну та клонову (кДНК).

Геномна бібліотека. Першу геномну бібліотеку було створено в 1978 р. Т. Маніатісом та співавторами при використанні ДНК з геному дрозоділи *D. melanogaster*, яку клонували в клітинах *E.coli*. Для створення банку генів виділяють всю геномну ДНК, розрізають її на окремі фрагменти за допомогою рестриктаз або методом “дробовика” (ультразвуку), які приєднують до плазмідних або вірусних векторів і вводять у реципієнтні бактерії для наступного клонування. Багато плазмід-векторів несуть ген стійкості до антибіотиків. За наявності в рекомбінантній плазміді такого гена трансформовані клітини (колонії) можна легко виявити, вирощуючи їх на середовищі з антибіотиком. При цьому кожна така колонія є клоном або потомством однієї клітини. Плазміді однієї колонії містять клон геномної ДНК, а сукупність плазмід, які несуть різні ділянки геному, називають бібліотекою геномної ДНК. В такому вигляді банк можна зберігати. Недоліком геномних бібліотек є те, що фрагменти ДНК утворюються у великій кількості. Розрізання геномної ДНК визначається випадково, тому лише частина фрагментів містить повнорозмірні гени. Деякі фрагменти можуть містити тільки частину гена або його інтронні послідовності.

Бібліотека генів може зберігатись і використовуватись протягом необмежено тривалого часу. Вона містить всю спадкову інформацію організму. Банк генів - це не тільки джерело для одержання потрібного трансгена, але й

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

матеріалу, необхідного для вивчення структури, функції та регуляції індивідуальних генів, структури і функцій білків. За її допомогою можна також вирішити проблему збереження генофонду зникаючих видів.

Клонова бібліотека генів (кДНК). Це бібліотека молекул ДНК, комплементарних копій зрілих мРНК, що пройшли процесінг і не містять інтронів. Створення кДНК починається з синтезу на матриці РНК за допомогою зворотної транскриптази, комплементарної нитці ДНК. Відтак створюють лужні умови для руйнування ланцюга РНК на нуклеотиди, після чого за допомогою ДНК-полімерази синтезують з них комплементарний ланцюг ДНК. При цьому утворюється фрагмент ДНК з «тупими» кінцями. Таку ДНК вбудовують в плазмиди і вводять в клітини бактерій. При ампліфікації плазмиди утворюється клон комплементарної копії ДНК (кДНК). Істотна перевага бібліотеки кДНК полягає в тому, що вона є бібліотекою транскрибуємих генів, що підлягають безперервній транскрипції, тоді як у геномній бібліотеці не завжди присутні тільки дискретні гени (рестриктази можуть розрізати ДНК і всередині гена).

Крім того, гени еукаріот містять інтрони, які видаляють з РНК, що проходить транскрипцію перед перетворенням її в матричну. Цей процес називають сплайсингом (дозрівання – видалення послідовностей, не кодуємих білкові продукти), після якого «зшивають» фрагменти нуклеїнової кислоти. Бактеріальні клітини не можуть подібним чином здійснювати модифікацію РНК, яка утворилася шляхом транскрипції гена еукаріотичної клітини. Тому, для одержання білка шляхом експресії клонованого гена, краще використовувати банк кДНК, отриманої на основі матричної РНК. Бібліотека кДНК відображує спектр генетичної активності клітин, із яких вона була виділена. Такі бібліотеки необхідно створювати для порівняння генетичної активності в клітинах різних тканин.

Пошук потрібних генів у геномній бібліотеці. Одним з методів пошуку потрібних генів у банку є гібридизація, яка включає блоттінг (від англ. blotting – промокання). *Блоттінг* – метод перенесення фрагментів нуклеїнових кислот на спеціальну плівку (мембрану) з нітроцелюлози, яка зв'язує (іммобілізує) ці молекули.

Саузерн-блоттінг (названий за прізвищем, запропонованого його автора), заснований на переміщенні фрагментів ДНК, завдяки капілярному ефекту. Процес перенесення фрагментів ДНК, що знаходяться в агарозному гелі на плівку з нітроцелюлози за допомогою фільтрувального паперу схожий на промокання.

Аналіз проводять у такій послідовності:

- виділену ДНК розділяють в агарозному гелі, де відбувається електрофоретичний поділ її фрагментів за масою та зарядом;
- після поділу фрагментів ДНК в агарозному гелі його обробляють розчинами, що денатурують ДНК з утворенням одноланцюгових ДНК. Далі

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

гель розміщують на фільтрувальному папері, змоченому концентрованим сольовим (буферним) розчином;

- на гель накладають нітроцелюлозний фільтр, на якому відбувається іммобілізація (або адсорбція, чи фіксація) одноланцюгових фрагментів ДНК;

- зверху на фільтр кладуть стопку аркушів сухого фільтрувального паперу, який слугує своєрідним капілярним насосом, забезпечуючи повільний потік буферного розчину через гель. Сольовий розчин, проходячи через агарозний гель, захоплює з собою фрагменти ДНК, які затримуються нітроцелюлозою і зв'язуються з нею, а розчин всмоктується сухим фільтрувальним папером;

- фільтр витримують у вакуумі при температурі 80°C, в результаті чого одноланцюгові фрагменти ДНК незворотно іммобілізуються (фіксуються) на нітроцелюлозі. При цьому розташування смуг іммобілізованої ДНК точно відповідає їх розміщенню в гелі;

- ДНК, зв'язану з фільтром, поміщають у розчин з міченим ДНК-зондом, в якому відбувається гібридизація. Гібридизація (утворення водневих зв'язків) спостерігається тільки зі специфічним зондом, комплементарним його фрагментам ДНК, які виявляються у вигляді темних смуг на рентгенівській плівці - радіоавтографії нітроцелюлозного фільтру.

Для аналізу РНК застосовують *Нозерн-блот-гібридизацію*, багато в чому схожу на *Саузерн-блоттинг*. У цьому випадку молекули РНК, виділені з клітини розділяються за розмірами з допомогою гель-електрофорезу, а відтак переносяться на фільтр. Після гібридизації з міченим одноланцюговим зондом виявляються місця гібридизації (гомології) РНК і зонду. У цьому методі як зонд зазвичай використовують фрагменти ДНК.

Ампліфікація ДНК in vitro.

Ампліфікація – збільшення числа копій молекул ДНК. На відміну від клонування ДНК *in vivo*, що відбувається в клітинах прокариот, дріжджів та інших еукаріотичних організмів, ампліфікація здійснюється поза клітиною (*in vitro*) за допомогою хімічних методів: *полімеразної ланцюгової реакції* (ПЛР), *лігазної ланцюгової реакції*, *NASBA-методу* (Nucleic Acid Sequence – Base Amplification).

В 1985 р. К.Мюлліс зі співавторами розробили метод клонування послідовностей ДНК *in vitro*, що одержав назву полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Ампліфікація фрагментів ДНК здійснюється завдяки дії особливого фермента Таq-полімерази (термостабільної ДНК-полімерази, виділеної з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*) у присутності чотирьох типів нуклеотидів і праймерів (коротких ланцюжків ДНК розміром близько 20 нуклеотидів, які виступають в ролі затравок). Процес циклічний, проходить у декілька етапів, а саме: термічна денатурація (поділ комплементарних ланцюгів ДНК при температурі +93–95°C), охолодження до +60°C, зв'язування праймерів з одноланцюговими ДНК, синтез другого ланцюга ДНК за допомогою Таq-

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

полімерази. Повторюючи цикли ампліфікації, можна одержати мільйони копій фрагментів ДНК. Необхідно зазначити, що в процесі розглянутої реакції ефективно ампліфікується тільки послідовність ДНК, обмежена праймерами.

Розмножений *in vitro* фрагмент одержують у достатній кількості для його прямого секвенування, оскільки при цьому не виникає потреба в проміжному етапі клонування фрагмента ДНК у молекулярних векторах. Метод ПЛР іноді називають *безклітинним молекулярним клонуванням* (cell-free molecular cloning). Автоматизована процедура *Taq*-полімеразної ланцюгової реакції, яка складається з 30 і більше циклів, триває протягом 3 – 4 год., що істотно прискорює і спрощує процедуру клонування певного фрагмента ДНК у складі векторних молекул.

Для *лігазної ланцюгової реакції* використовують інший фермент – термостабільну ДНК-лігазу. Найбільш універсальним методом ампліфікації слугує *NASBA-метод*. На відміну від ПЛР, він здійснюється при температурі +41°C, тобто є ізотермальним. Крім того, в цьому методі використовують також інші ферменти, зокрема РНК-полімерази фага T7, РНКазу H та зворотну транскриптазу вірусу пташиного мієлобластозу. Метод дуже чутливий, що дозволяє використовувати його для контролю харчових продуктів, в медичній діагностиці, в судово-медичній практиці.

Введення нового (рекомбінантного) гена в клітину.

Введення чужорідного гена в клітину проводять двома способами, а саме *використовуючи вектор або шляхом прямого введення*.

Вектор – молекула ДНК або РНК, здатна переносити включені в неї чужорідні гени в клітину, де вони реплікуються автономно або після інтеграції з геномом (хромосоною). Не кожна молекула ДНК або РНК може бути вектором.

Вектори повинні мати певні властивості, до числа яких входять:

- здатність до автономної (тобто незалежності від хромосоми реципієнта) реплікації в клітині реципієнта. Наприклад, для реплікації в клітині бактерії вектор повинен містити сайт *ori* (ділянку ініціації реплікації);
- наявність області, можливої для вбудовування необхідного фрагмента ДНК. Для цього вектор повинен містити одну або більше ділянок (сайтів рестрикції), чутливих до певних рестриктаз, які розщеплюють вектор і дозволяють вбудовувати бажану послідовність нуклеотидів (трансген);
- невеликий розмір, оскільки при довжині більше 15 т.п. значно знижується ефективність клонування чужорідної ДНК;
- наявність *маркерних генів*, які дозволяють відрізнити трансформовані клітини від вихідних. Це можуть бути *селективні* (ті, що надають клітинам стійкості до антибіотиків, гербіцидів) або *репортерні* (клітини зручно тестувати за зміною забарвлення продуктів цих генів) гени;
- наявність відповідного промотора, під яким необхідно помістити чужорідний ген для експресії в клітині бактерії.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Послідовності ДНК, розміщені перед початком структурного гена і ті, що визначають ступінь активності РНК-полімерази, називаються *регуляторними послідовностями*. Одна з таких послідовностей представляє собою ділянку ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза. Ця ділянка носить назву промотора.

Регуляторні послідовності генів еукаріот відрізняються від прокаріот. Тому бактеріальна РНК-полімераза не може їх розпізнати. Для експресії генів еукаріот в клітинах прокаріот гени повинні перебувати під контролем бактеріального промотора, тобто промотора клітини-хазяїна. Як промотор, широко використовують промотор гена, локалізованого в комерційних векторах, наприклад рBR322, lac-промотор *E. coli* та ін. В результаті створюється вектор - ціла генетична конструкція, до складу якої, крім чужорідного гена (трансгена), вводять маркерні гени та відповідні регуляторні послідовності.

Типи векторів.

Природними векторними системами можуть слугувати плазмідні бактерій або дріжджів (простих еукаріотичних організмів), ДНК бактеріофагів або вірусів, штучні хромосоми дріжджів (УАК) і бактерій (ВАК). Створені також гібридні (штучні) вектори – фазміди, які поєднують переваги плазмід та фагів. Для клонування невеликих фрагментів ДНК використовують плазмідні, фагові ДНК, а для великих – косміди та штучні хромосоми.

1. *Плазмідні*. Основою для створення вектора зазвичай слугують бактеріальні плазмідні. Це невеликі позахромосомні кільцеві молекули ДНК, які автономно реплікуються та накопичуються в клітинах бактерій у вигляді декількох копій. Природні плазмідні часто містять гени, корисні для бактерій. Вони надають стійкості до антибіотиків та іонів важких металів (*R-плазмідні*); контролюють здатність до руйнування різних токсичних сполук, які важко розкладаються (нафталін, камфор, толуол, ксилол, різні пестициди та ін.) - плазмідні біодеградації, або *D-плазмідні*.

Деякі плазмідні за рахунок специфічного сайту ініціації реплікації можуть реплікуватись в клітинах тільки одного виду бактерій - це так звані *плазмідні з вузьким спектром хазяїв*. Плазмідні, з менш специфічним сайтом, здатні до реплікації в клітинах різних видів бактерій. До них відносяться *плазмідні із широким спектром хазяїв*. Зазначені особливості плазмід успішно використовують при створенні векторів.

Однак природні плазмідні часто мають властивості, які не дозволяють їм виступати в ролі вектора. Зокрема, їх розмір може досягати від 1 т.п.н. до 500 т.п.н. і значно перевищує допустимий. Крім того, не всі типи плазмід несуть в собі гени, які можуть слугувати маркерами для розпізнавання трансгенних клітин. Тому для ефективного трансгенезу конструюють штучні векторні системи (*плазмідні вектори*) на основі плазмід за допомогою методів генетичної інженерії. На сьогодні запропонований цілий арсенал комерційних векторів, створених на основі бактеріальних плазмід. Наприклад, плазмідний

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

вектор pBR322 створений на основі плазмиди *E. coli* (рис. 23). Плазміда pBR322 має *ori* - область, відповідальну за реплікацію плазмиди, гени стійкості до антибіотиків ампіциліну та тетрацикліну, причому в генах стійкості до цих антибіотиків є сайти рестрикції. При вбудовуванні фрагменту чужорідної ДНК в один з генів стійкості, останній інактивується. Отже, успішне вбудовування фрагменту чужорідної ДНК в один із цих генів легко детектувати за зникненням у бактерій стійкості до даного антибіотика, тому що при цьому зберігається стійкість до іншого антибіотика. Тобто, вектор дає можливість детектувати тільки ті клони бактерій, які містять рекомбінантну плазмиду.

Будова векторів може бути різноманітною, але всі вони обов'язково повинні мати декілька сайтів для вбудовування фрагментів донорної ДНК і забезпечувати просту ідентифікацію трансформованих клітин. У плазмідах можна клонувати фрагменти ДНК розміром не більше 10 т. п. н.

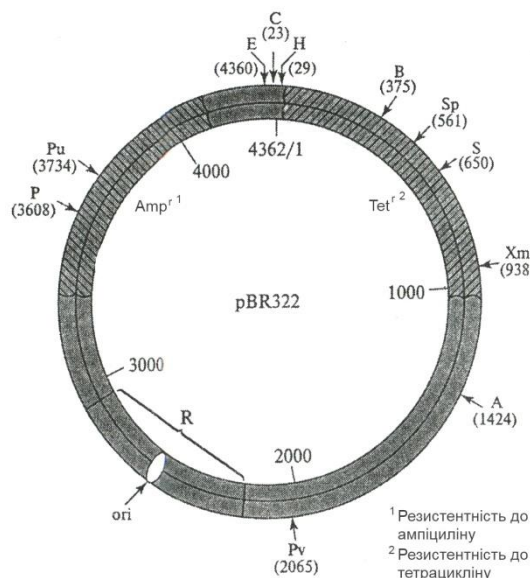


Рис. 23. Схема будови плазмідного вектора pBR322 (за О.С. Конічевим та Г.А. Севастьяною, 2003): *ori* – точка початку реплікації; Amp^r та Tet^r – гени стійкості до ампіциліну та тетрацикліну (зазначені сайти рестрикції для різних рестриктаз, цифри позначають число нуклеотидних пар); R – реплікон.

2. *Віруси* – найменші та найпростіші з усіх патогенів, які є одними з головних кандидатів на роль векторів для введення чужорідної ДНК. Вони слугують для створення векторів на основі РНК, віроїдоспецифічних ДНК, комбінації віроїдоспецифічних ДНК з Ті-плазмідами. При вірусній інфекції кожна клітина може одержати велику кількість копій чужорідного гена. Вбудовування ДНК проводять таким чином, щоб вона перебувала під контролем сильного вірусного промотору, який забезпечує високий рівень експресії гена, внаслідок чого і його продукти будуть більш доступними для дослідження. У генетичній інженерії часто використовують 35S-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти. Він не має тканинної специфічності та активний

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

не тільки в клітинах хрестоцвітих рослин, але й у клітинах інших родин. Вірус повинен бути життєздатним після рекомбінування його ДНК. Найлегше віруси вводяться в бактерії. Основним недоліком вірусів як векторів є їх невеликий розмір та коло обмежене хазяїв.

3. *Човникові вектори* – це плазмідні вектори, призначені для роботи в клітинах різних організмів (тварин і бактерій). Найчастіше для клонування генів використовують вектори з одним сайтом реплікації для роботи з *E. coli*. При необхідності використання інших бактерій або еукаріотичних клітин у вектори вбудовують другий сайт ініціації реплікації, що забезпечує їх роботу і в інших клітинах. Саме такі векторні системи називаються човниковими. Найпоширеніші вектори складаються з плазмиди pBR322 та інтактного раннього району транскрипції ДНК вірусу SV40, а потрібний ген вбудовують під контролем промотору пізніх генів або додаткового раннього промотору. Човникові векторні системи експресії розроблені для дріжджів, комах і клітин ссавців. Човникові вектори, створені на основі бакуловірусів для роботи в клітинах *E. coli* і комах, називають бакмідами.

4. *Транспозони* – сегменти ДНК, які контролюють власне переміщення з одного сайту ДНК в інший і вбудовування в новий сайт хромосоми або плазмиди та пересуваються по всьому геному рослини. Механізм переміщення фрагментів ДНК по геному до кінця не з'ясований. Вперше транспозони були відкриті в 1940-х рр. американським ученим Барбарою Мак-Клінток у кукурудзи. Протягом багатьох років кукурудза залишалася єдиною системою, в якій виявились такі рухливі генетичні елементи. Наразі вони виявлені у бактерій, дрозофіл та інших організмів. Транспозони є досить ефективними векторами для передачі рекомбінантної ДНК, оскільки за їх допомогою можна переносити досить великі ділянки ДНК. Цей метод має значні переваги, основною з яких є здійснення перенесення генів з високою частотою й не супроводжується значними перебудовами в інтегрувальній ДНК.

5. *Векторні системи*, які використовують для клонування великих фрагментів ДНК включають:

– *косміди* – об'єднують в собі ділянки плазмідних ДНК (ген-маркер і реплікон плазмиди) і ДНК бактеріофага. Термін означає, що вектор є плазмідною, усередину якої вбудована *cos* ділянка фага λ (*cos-site*) - нуклеотидна послідовність, яка відповідає за упакування фагової ДНК у її протеїнову капсулу. Косміди можуть переносити до 40 т.п.н. клонованої ДНК в клітини *E. coli*;

– *фазміди* – штучні гібриди між фагом і плазмідною. Залежно від умов, після вбудовування чужорідної ДНК вони можуть розмножуватись як фаги або плазміди;

– *бактеріальна штучна хромосома* (BAC – від англ. bacterial artificial chromosomes) – здатна переносити ділянки чужорідної ДНК від 150 до 300 т.п.н. Використовується для трансформації тваринних клітин;

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

– *дріжджова штучна хромосома* (YAC – від англ. yeast artificial chromosomes) – сконструйована для перенесення особливо великих ділянок чужорідної ДНК, довжиною від 100 т.п.н. до 1 м.п.н. Для їх створення до плазмиди дріжджів “пришивають” центромерні послідовності, теломери, послідовності для автономної реплікації в дріжджовій клітині, сайти рестрикції та селективні маркери.

6. *Хлоропластні та мітохондріальні ДНК*. Використовують для перенесення чужорідної ДНК невеликого розміру.

Для ідентифікації трансформованих клітин, які несуть рекомбінантну ДНК, вектор повинен містити один або декілька генів-маркерів. Виділяють дві групи маркерних генів, які дозволяють відрізнити трансформовані клітини від вихідних, як правило, це селективні та репортерні гени.

Селективні гени – надають клітинам селективну перевагу, тобто стійкість до антибіотиків (канаміцину, тетрацикліну, неоміцину та ін.) або гербіцидів (у рослин). Основний принцип роботи такого маркера – здатність трансформованих клітин до росту на селективному живильному середовищі з додаванням певних речовин, які інгібують ріст і поділ нетрансформованих, тобто нормальних клітин. Трансформовані клітини відбирають на середовищах з високим вмістом цих речовин. Наприклад, в присутності гена лактомази бактеріальна клітина набуває стійкості до ампіциліну, а при внесенні цього антибіотика в середовище утворює клон (що несе даний ген). У нетрансформованих клітин (без даного гена) спостерігається загибель на цьому середовищі

Репортерні гени – кодують нейтральні для клітини білки, наявність яких можна легко виявити у тканинах. Як репортерні найчастіше використовують гени β-глюкуронідази (*uidA*, інша назва – *gus*), зеленого флюоресцентного білка (*gfp*), люциферази (*luc*), хлорамфеніколацет трансферази (*cat*). Серед них більшою мірою застосовують гени, що кодують білки GUS та GFP і меншою – LUC та CAT.

Ген uid (gus) - модифікований геном *E. coli*, який кодує β-глюкуронідазу і гідролізує великий спектр природних і синтетичних глюкуронідів, що дозволяє підбирати відповідні субстрати для спектрофотометричного або флюориметричного визначення активності фермента та гістологічного забарвлення тканин *in situ* (у синій колір). У складі химерних білків, створених генно-інженерними методами, *GUS* зазвичай зберігає свою функціональну активність.

GFP (green fluorescent protein – зелений флюоресцентний білок). Був виявлений Т. Шимомурою із співавторами в 1962 р. у люмінесцуючої медузи *Aequorea victoria*. При опроміненні довгохвильовими УФ-променями проявляє здатність до флюоресценції у видимій (зеленій) області спектра. Прояв флюоресценції не потребує субстратів або кофакторів. Ген *gfp* клонований в 1992 р. Г. Прашером і співавторами. Завдяки властивостям білка, *gfp* є дуже перспективним репортерним геном, який дозволяє проводити різноманітні

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

прижиттєві (недеструктивні) дослідження з трансгенними організмами. Визначається за допомогою гістохімічного методу при зміні забарвлення тканини шляхом додавання відповідного субстрату.

Ген *luc* кодує фермент люциферазу (клоновану з бактерій і світлячка). Люцифераза забезпечує перехід люциферинів з окисленої форми в основну, що викликає світіння трансформованих клітин рослин, які накопичують цей білок.

Ген *cat* відповідає за синтез хлорамфеніколацетилтрансферази (виділений з *E.coli*). Цей фермент каталізує реакцію перенесення ацетильної групи від ацетил-КоА до хлорамфеніколу. Визначається тільки радіоізотопними методами.

Область застосування селективних генів переважно пов'язана з простим контролем трансгенезу. Репортерні гени дозволяють виявляти (по можливості кількісно) тимчасові та просторові особливості експресії даного конкретного гена (власного або чужорідного). Приєднання репортерного гена до однієї лише промоторної області дозволяє досліджувати в “чистому вигляді” її роль у регулюванні експресії вивчаємого гена на рівні транскрипції.

Методи прямого перенесення генів в клітину

Реципієнтами, в геном яких вбудовуються чужорідні гени, слугують культури клітин, ембріональні клітини ссавців, дрозофіли, пронуклеуси ссавців. У рослин – протопласти, ізольовані клітини та тканини, мікроспори, незрілі зиготичні зародки, проростки.

Для введення генетичного матеріалу в клітини різних організмів застосовують ряд загальних методів прямого перенесення, зокрема таких, як трансформація, електропорація, мікроін'єкція та ін.

Трансформація – метод введення рекомбінантної ДНК в клітину, завдяки збільшенню проникності її клітинної оболонки (ймовірно, за рахунок локального руйнування останньої). Клітини обробляють льодяним розчином CaCl_2 , а потім витримують при температурі $+42^\circ\text{C}$ протягом 1,5 хв.

Трансдукція – процес передачі бактеріофагом бактеріальної ДНК з однієї клітини в іншу. Загальна трансдукція використовується в генетиці бактерій для картування геному та конструювання штамів.

Трансфекція – метод передбачає введення ДНК, адсорбованої на кристалах фосфату кальцію (преципітат кальцію) в клітину шляхом фагоцитозу. Для трансфекції також використовують і ДЕАЕ-декстран — полімер, який адсорбує ДНК. При цьому спостерігаються високі ефект проникнення в клітини та час експресії, але частота стабільної трансформації значно нижча, ніж в разі використання преципітату кальцію. Частоту трансфекції можна збільшити, застосовуючи гліцериновий шок (4 хв у 15%-му розчині гліцерину в HEPES-буфері).

Електропорація – метод полягає у використанні імпульсів високої напруги електричного струму, під впливом якого в клітинних мембранах тимчасово утворюється велика кількість пор, що зворотно збільшує

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

проникність мембран. Через ці пори, які функціонують протягом короткого проміжку часу, чужорідна ДНК проникає в клітину. Це досить простий, ефективний і відтворюваний метод. За його допомогою були отримані трансгенні рослини кукурудзи, рису та цукрової тростини.

Мікроін'єкції ДНК – метод дозволяє за допомогою тонких мікроголок і мікроманіпулятора вводити в клітину або безпосередньо в ядро векторну ДНК із включеною чужорідною ДНК. При застосуванні мікроін'єкцій здійснюється трансформація у дрізофіли та вищих рослин (ячменю, капусти). Метод був розроблений на початку 1970-х рр. А. Андерсоном і Г. Діакумакосом і дає невеликий вихід трансформованих клітин. Основною перевагою цього методу є можливість вводити будь-яку ДНК у різноманітні клітини. Крім того, збереження в клітинах введеного гену не потребує селективного тиску.

Упакування в ліпосоми. Ліпосоми – сферичні тільця, оболонки яких утворені фосфоліпідами. Ліпосоми, що містять усередині рекомбінантну ДНК, здатні безпосередньо до злиття з мембраною клітини або можуть поглинатись клітинами. В клітині відбувається руйнування оболонки ліпосом і вивільнення ДНК. Це один з методів, що дозволяє захистити трансформований генетичний матеріал від руйнування позаклітинними нуклеазами. Метод застосовується для введення нуклеїнових кислот у культивовані клітини тварин та протопласти рослин.

Біологічна балістика – один з найефективніших методів трансформації однодольних і хвойних рослин (в які не вдається ввести чужорідну ДНК за допомогою агробактерій), а також трансформації тваринних клітин. Метод базується на напилюванні рекомбінантної ДНК на мікрочастинки золота або вольфраму (діаметр часток 0,6-1,2 мкм), якими бомбардують клітини. Бомбардування здійснюють при допомозі генної гармати за рахунок перепаду тиску або під дією електричного розряду. За достатньої швидкості ці частинки можуть безпосередньо проникати в ядро і підвищувати ефективність трансформації. Клітини, які перебувають в центрі чашки Петрі (безпосередньо під гарматою) гинуть, а розташовані по периферії - виживають і трансформуються. За допомогою генної гармати були трансформовані однодольні рослини і отримані стабільні рослини-трансформанти, зокрема, кукурудзи, рису, пшениці, ячменю.

Основні етапи створення трансгенних організмів

Процес створення трансгенного організму складний і часто вимагає індивідуального підходу. Проте у кожному окремому випадку його можна підрозділити на декілька загальноприйнятних етапів.

1. Одержання (виділення) потрібного для перенесення гена (трансгена). Ген може бути виділений з природних джерел або з геномної бібліотеки; штучно синтезований хімічним (за наявною послідовністю нуклеотидів) або ферментативним шляхом (з використанням механізму зворотної транскрипції,

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

синтез кДНК на матриці мРНК за допомогою зворотної транскриптази) та отриманий за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

2. Створення спеціальних генетичних конструкцій – векторів (переносників), у складі яких містяться гени (трансгени) для вбудовування в геном іншого виду або експресії в клітинах прокариот чи еукаріот. Для конструювання *рекомбінантної ДНК (рекДНК)* векторну ДНК (наприклад, плазмиду) і чужорідну ДНК, яка містить трансген, розрізають однією і тією ж рестриктазою, в результаті чого утворюються однакові кінці. До генів, синтезованих хімічним шляхом або отриманих на матриці їх мРНК, такі кінці можна «пришити» штучним шляхом. Потім провести змішування фрагментів ДНК (вектора і трансгена) і «зшивання» їх ДНК-лігазою. Кінці чужорідної ДНК і плазмиди взаємодіють між собою, утворюючи комплементарні пари основ. В результаті відбувається гібридизація векторної чужорідної ДНК. Кінці фрагментів замикаються за допомогою водневих зв'язків і ковалентно «зшиваються» за дії фермента ДНК-лігази.

3. Генетична трансформація, тобто перенесення і включення рекДНК, що містить трансген в клітини реципієнта (наприклад, *E. coli*). Плазміда, вбудована в бактерію, поводить себе як вектор нового гена, що реплікується в кожному новому поколінні.

4. Молекулярна селекція – добір трансформантів, тобто клонів, що несуть рекДНК. В процесі генетичної трансформації *E. coli* можуть утворюватись три типи клітин, а саме клітини, які не містять плазмиду, ті, що мають плазмиду без рекДНК та клітини з плазмідною рекДНК. Для добору трансформантів серед нетрансформованих клітин використовують різні маркерні гени, які перебувають у векторній молекулі поряд із трансгеном. Так, плазміда pBR322 має два гени стійкості до антибіотиків ампіциліну (Amp^r) і тетрацикліну (Tet^r). Один з генів слугує для ідентифікації бактерій, які несуть плазмиду (вектор) шляхом добору клітин, стійких до антибіотика, а другий – для вирізнення гібридної плазмиди (рекДНК) від вихідного вектора. У гені Tet^r є унікальний сайт, що розрізається рестриктазою *Bam* HI. Якщо розрізати вектор у гені Tet^r рестриктазою *Bam* HI та вмонтувати в нього фрагмент чужорідної ДНК, отриманий за допомогою тієї ж рестриктази, то ген Tet^r інактивується і в бактерій, які несуть плазмиду, зникає стійкість до тетрацикліну, але зберігається стійкість до ампіциліну. Добір на середовищі з ампіциліном допомагає виявити присутність плазмиди в *E. coli*. Бактерії, що містять плазмиду проявляють здатність до росту на середовищі з ампіциліном. Для добору клітин, які несуть чужорідну ДНК, бактерії вирощують на середовищі з тетрацикліном. Трансформовані клітини проявляють стійкість до ампіциліну, але чутливі до тетрацикліну (такі колонії відсутні на середовищі з тетрацикліном). Крім плазмиди pBR322 використовуються також інші вектори для клонування (pUC19, pET, pQE), причому для деяких із них створено досить своєрідні системи добору рекомбінантних клонів (наприклад, забарвлення колоній клітин, що містять немодифіковану плазмиду pUC19).

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

5. Вирощування трансформованих клітин до повноцінних трансгенних організмів і синтез певного білка – продукту введеного гену.

Необхідно зазначити, що перші три етапи характеризують послідовність створення рекомбінантної ДНК, а четвертий і п'ятий - трансгенез і виявлення трансгенного організму.

Після введення в реципієнтну клітину фрагмента чужорідної ДНК відбувається її клонування для одержання великої кількості копій або починається синтез продукту, закодованого у введеному гені. Найчастіше ці процеси здійснюються в бактеріальних клітинах. Тому клонування прокариотичної ДНК в клітинах прокариот не викликає ускладнень. Клонування еукаріотичної ДНК вимагає додаткових методичних прийомів, оскільки існують розходження в будові геному прокариот і еукаріот. У прокариот кодуючі домени структурних генів є безперервними, а в еукаріот області, які кодують (екзони) розділені тими, що не кодують (інтронами). Прокариоти нездатні до видалення інтронів з первинних РНК-транскриптів, що спричинює відхилення трансляції еукаріотичних мРНК в бактеріальних клітинах. Для видалення інтронів з ДНК еукаріот запропоновано метод синтезу ДНК-копії (кДНК) на мРНК.

Таким чином, основні етапи генетичної інженерії зводяться до того, що із набору рестрикційних фрагментів ДНК, які містять чужорідний ген, складають компакту генетичну структуру – ДНК, яку потім вводять в клітину. Нова генетична інформація піддається експресії, що призводить до синтезу відповідного продукту, який кодується клонуючим геном. При введенні в клітину нової генетичної інформації у вигляді гібридних молекул ДНК, можна отримати рослину, яка буде змінена відповідно поставленій меті.

Основні проблеми генетичної інженерії:

1. Вибір векторів і експресія чужорідних генів, тобто вирішення питання про індукування або регулювання експресії чужорідних генів в рослинній клітині.
2. Отримання в кінцевому підсумку повноцінних, здорових рослин, здатних до розмноження.
3. Вибір і виділення генів рослинного або іншого походження, введення яких призводить до появи нових помітних змін у рослин.

Тема 11. Молекулярна біологія та генетична інженерія.

Трансформація рослинного геному

Важливою перевагою рослин порівняно з тваринами, є здатність їх клітин до відтворення цілого організму (тобто тотипотентність), яка широко використовується при одержанні трансгенних рослин.

Генетична трансформація рослин за допомогою методів генетичної інженерії може бути здійснена векторним способом (з використанням

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

агробактерій та вірусів) і шляхом прямого перенесення генів. Найбільш вивченими плазмідними векторами для введення чужорідних генів в геном рослин є Ti- та Ri-плазмідні ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium*. За допомогою цих плазмід бактерії можуть інтегрувати свій генетичний матеріал у клітини дводольних рослин. Ti-плазмиду (від англ. tumor inducing — індукуюча пухлини) було виявлено в клітинах деяких штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Виділена в чистій культурі, ця бактерія може призводити до утворення пухлин у дводольних рослин, що можна розглядати як *природну генно-інженерну систему*. Ri-плазмідна (від англ. root inducing — індукуюча корені) присутня у штаммах *Agrobacterium rhizogenes*.

В 1970-х рр. Дж. Шелл із співавторами було показано, що причиною пухлиноутворення є Ti-плазмідні, які містяться в клітинах деяких штамів *A. tumefaciens*. Ti-плазмідна проникає із клітини бактерії в рослину, і, її частина, що була названа T-ДНК (від англ. transferred DNA — та, що переноситься), ковалентно вбудовується в хромосоми інфікованої рослини. В природі цей фрагмент переносить гени, які сприяють розмноженню агробактерій та дає їм можливість паразитувати на ураженій рослині. Гени, що входять до складу T-ДНК, функціонують після їх перенесення в рослинну клітину. В результаті інтегрування з хромосомою, T-ДНК індукує в місці зараження утворення пухлини (корончатих галлів, що нагадують ракові клітини тварин), гіперпродукцію фітогормонів - цитокінінів та ауксину, а також синтез похідних амінокислот, опінів - речовин, відсутніх в здорових клітинах рослин. Пухлина виникає внаслідок порушення балансу фітогормонів, тобто як результат функціонування онкогенів, продуктами яких є ауксини та цитокініни. Опіни, виділені клітинами пухлини, використовуються бактерією як джерела вуглецю і азоту для свого росту та розмноження. Сама бактерія в клітину не проникає, а залишається в міжклітинному просторі, використовуючи клітину з вбудованою T-ДНК як «фабрику» для продукування опінів. Такі відносини *Agrobacterium tumefaciens* і рослини Дж.Шеллом були названі генетичною колонізацією (природна генетична інженерія).

До складу Ti-плазмідні входять:

- *T-ДНК* - область ДНК, що містить гени, які відповідають за морфологію пухлини і синтез фітогормонів, викликають неконтрольований ріст пухлинних клітин, а також гени, відповідальні за синтез опінів - джерел вуглецю та азоту для живлення бактерій. Саме всі ці гени *T-ДНК* передаються в ядерний геном рослинної клітини;

- *vir-область* – в якій знаходяться гени, відповідальні за вирізання, перенесення та інтеграцію T-ДНК у хромосоми рослин. Індукція цих генів має зворотну дію, що є важливим для бактеріальних клітин. В ураженому патогенами нежиттєздатному рослинному організмі перенесення T-ДНК не відбувається;

- *ori-область* - містить гени, продукти яких забезпечують реплікацію Ti-плазмідні;

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

- *tra-область* - містить гени, відповідальні за кон'югацію бактерій.

На основі Tі-плазмиди в лабораторних умовах створюють штучні вектори. Для одержання трансгенних рослин гени, що кодуєть господарсько-цінні ознаки, вбудовують у T-ДНК, яку забезпечують маркерними генами (для добору трансформованих рослинних клітин), промотором еукаріот (наприклад, 35S-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти - CaMV) і унікальними сайтами рестрикції. Однак розміри Tі-плазмід занадто великі і не дозволяють використовувати їх як вектор. Для вирішення цієї проблеми створена спеціальна технологія - *бінарна система*. Сутність її полягає в тому, що T-ДНК вирізають із Tі-плазмиди й вбудовують, наприклад, у плазмиду pBR322, здатну до самореплікації в клітинах *E. coli* і, здійснюючи таким чином, клонування T-ДНК (багаторазове збільшення числа копій) у складі pBR322. Векторну систему (T-ДНК - pBR322) виділяють з клітин *E. coli* і вбудовують у T-ДНК цільові гени. Одержану векторну систему знову розмножують у клітинах *E. coli*, а потім вводять у клітини *Agrobacterium tumefaciens*, у яких знаходяться стандартні Tі-плазмиди. В результаті гомологічної рекомбінації векторна система та Tі-плазмиди обмінюються ділянками T-ДНК і клітини *Agrobacterium tumefaciens* несуть у складі своїх плазмід чужорідні гени, які вони передають в ядерний геном рослинних клітин, що призводить до одержання трансгенних рослин.

В останні роки для створення штучних векторів використовують Ri-плазмиду (від англ. *root inducing* - індукуюча корені), яка присутня у штаммах *Agrobacterium rhizogenes*. На відміну від Tі-плазмід, Ri-плазмиди є природними нешкідливими векторами. Після вбудовування T-ДНК у хромосомну ДНК рослинних клітин в області ураження спостерігається посилене утворення корінців («бородатість»), із яких можна легко регенерувати здорові рослини, порівняно з недиференційованою пухлинною тканиною.

Однак не всі рослинні клітини трансформуються агробактеріями. Найбільш сприятливими виявились дводольні рослини, хоча і для них ефективність трансформації великою мірою залежить від виду і навіть сорту. Що стосується однодольних, то хоча в останні роки досягнені певні успіхи в їх трансформації агробактеріальними векторами, подібний шлях трансформації зустрічає суттєві утруднення. Тому для трансформації стійких до агробактерій однодольних рослин розроблені різноманітні прийоми прямого фізичного перенесення ДНК у клітину, багато із яких були запозичені із практики роботи з клітинами бактерій або тварин. Ці методи досить різноманітні, вони включають: бомбардування мікрочастинками (балістичний метод), електропорацію, обробку поліетиленгліколем, перенесення ДНК в складі ліпосом та ін. Найчастіше використовується найбільш продуктивний метод бомбардування мікрочастинками за допомогою якого можна також трансформувати і інші ДНК-вмісні клітинні органоїди – хлоропласти і мітохондрії.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

В останні роки розроблений і успішно використовується також комбінований метод трансформації - *агролістичний*. При цьому чужорідну ДНК вводять у тканини будь-яким фізичним методом, наприклад, балістичним. Ця ДНК містить як Т-ДНК вектор з цільовим і маркерним геном, так і агробактеріальні гени вірулентності під контролем промотору еукаріот. Тимчасова експресія генів вірулентності в рослинній клітині призводить до синтезу білків, які правильно вирізають Т-ДНК із плазмиди і вбудовують її в геном хазяїна, як і у випадку традиційної агробактеріальної трансформації.

Після проведення трансформації рослинної тканини тим або іншим способом її поміщають *in vitro* на спеціальне живильне середовище з фітогормонами, яке сприяє розмноженню клітин. Середовище зазвичай містить селективний агент, у відношенні до якого трансгенні, на відміну від контрольних клітин, набувають стійкості. Регенерація рослин, найчастіше проходить через стадію калюса, після чого при відповідному підборі середовищ починається органогенез (пагоноутворення). Сформовані пагони переносять на середовище для укорінення, що часто містить селективний агент для більш строгого відбору трансгенних рослин. Іноді трансформанти добре ростуть тільки в стерильній культурі і не переносять повернення в природні умови. Для запобігання цієї проблеми все частіше застосовують метод трансформації *in plant*, тобто безпосередньо на рослині. При цьому трансформації піддають флоральну меристему на ранніх стадіях. В результаті плодоношення до 1-4% такого насіння виявляються трансгенним і при його пророщуванні на селективному середовищі не трансформовані рослини можна легко видалити, а трансгенні проростки - виростити до дорослого стану.

Підвищення продуктивності рослин і покращання їх якості методами генетичної інженерії

Одним із основних завдань покращання рослин є підвищення якості синтезованих продуктів: білків, жирів, поліцукрів та інших речовин, які визначають їх харчову і технічну цінність.

Методи генетичної інженерії дозволяють досить швидко створювати нові генотипи рослин, тобто значно прискорювати одержання сортів сільськогосподарських культур, порівняно з методами традиційної селекції. Крім того, застосування цих методів дозволяє цілеспрямовано змінювати генотип рослин, а саме одержувати сорти, стійкі до комах-шкідників, фітопатогенів, гербіцидів, пестицидів, різних стресових факторів. Проводяться роботи із введення чужорідних генів, які регулюють дозрівання плодів, відповідають за синтез вітамінів, лікарських препаратів тощо.

Однак можливості генетичної інженерії рослин обмежуються цілою низкою причин:

- по-перше, геном рослин вивчений недостатньою мірою;
- по-друге, не для всіх рослин вдається підібрати умови регенерації, особливо для злакових культур. Стабільно одержують рослини-регенеранти з

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

протопластів картоплі, люцерни, томатів, моркви, тютюну, капусти й деяких інших дводольних рослин;

- по-третє, однією з лімітуючих причин слугує розмір фрагмента донорної ДНК, який передбачається вводити в клітину, а також поява химерних організмів, нездатних до розвитку і розмноження.

Зміна харчової цінності рослин

1. *Запасні білки.* В більшості випадків запасні білки рослин мають незбалансований для харчування людини і тварин амінокислотний склад. Так, запасні білки бобових – леґуміни – характеризуються низьким рівнем амінокислоти метіоніну, а запасні білки злаків – проламіни – дефіцитом лізину, треоніну, триптофану, що знижує харчову і кормову цінність зерна. Покращання амінокислотного складу білка методами традиційної селекції досить утруднене в зв'язку з тим, що гени, які визначають ці важливі сільськогосподарські ознаки, часто бувають зчеплені і успадковуються разом з генами, що спричинюють виникнення небажаних ознак. Так, при використанні в селекції кукурудзи і ячменю мутантів типу opak-2, хайпролі з відносно високим вмістом лізину в зерні, не призвело до значного покращання якості, оскільки у мутантних форм підвищений вміст лізину корелював зі зменшенням синтезу основних запасних білків зеїну і гордеїну і, в кінцевому підсумку, із зниженням продуктивності і врожайності рослин.

В зв'язку з цим найбільш перспективним є використання генно-інженерних методів при створенні нових сортів, що дозволяє ввести в геном тільки корисну ознаку, без зчеплення з негативними властивостями. Наприклад, введення додаткових кодонів лізину в гени проламінів може призвести до синтезу білків, збагачених лізином, і покращанню кормової і харчової цінності білка. Одержані рослини кукурудзи, трансформові геном модифікованого α -зеїну, збагаченого лізином. Модифікований білок активно синтезувався в насінні трансгенних рослин кукурудзи. В результаті були одержані лінії кукурудзи з поліпшеною якістю зерна. В подальшому такі трансгенні лінії можуть використовуватись для виведення нових гібридів і сортів методами класичної селекції. Введення в геном рослин пшениці модифікованого гена високомолекулярної субодиниці білка глютеніна із зміненою послідовністю, призводить до активного синтезу модифікованого білка і впливає на склад і рівень відповідних запасних білків, що сприяє поліпшенню хлібопекарської якості пшеничного борошна.

Трансгенні рослини можуть бути використані як виробники «їстівних» вакцин. Так, одержані рослини тютюну і картоплі, що синтезують імуноглобулін А-Г, ентеротоксин, В-токсин холери, білок поверхневого антигена гепатиту В. Білок, одержаний із трансгенних рослин, має такі ж антигенні і фізіологічні властивості, як і білок тваринних клітин. В генетично-модифікованих рослинах тютюну можуть накопичуватись повністю функціональні секреторні моноклональні імуноглобуліни, які виділяються в

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

ротову порожнину і шлунок людини та тварин і слугують першим бар'єром на шляху кишкових інфекцій. Отримані моноклональні антитіла, специфічні для *Streptococcus mutans* - бактерій, котрі викликають зубний карієс, що в перспективі дозволить створювати антикарієсну зубну пасту.

2. *Склад жирних кислот.* Проводяться роботи із покращання складу жирних кислот низки олійних культур, і, в першу чергу, ріпаку. Насіння ріпаку характеризується високим вмістом олії, однак із-за великої кількості в ній специфічної довголанцюгової ерукової кислоти, а також глюкозинолатів смакові і поживні якості ріпакової олії різко знижуються. За допомогою генетичної інженерії і подальшої селекції були одержані сорти ріпаку, які містили гени, що контролюють довжину молекули жирних кислот. Це призвело до зниження долі ерукової кислоти і покращання якості ріпакової олії. Аналогічні роботи проводяться і з одержання модифікованих жирних кислот з підвищеною кількістю ненасичених зв'язків, що дозволить одержувати рослини, які синтезують нові цінні жирні кислоти. Крім того, останнім часом було показано, що зміна складу жирних кислот може призводити до підвищення стійкості рослин до низки комах-шкідників, а також до дії знижених температур. До 2001 року уже пройшли польові випробування сорти трансгенних рослин сої, ріпаку і кукурудзи з модифікованим складом жирних кислот.

3. *Поліцукри.* Створено трансгенні рослини картоплі, у яких крохмаль знаходиться головним чином у вигляді амілопектину (розгалуженій формі крохмалю) або тільки у вигляді амілази (лінійній формі крохмалю). Так, крохмаль, що складається в основному з амілопектину, має попит на ринку виробників різних живильних сумішей (наразі як наповнювач використовується модифікований крохмаль).

Підвищення врожайності та регуляція швидкості росту рослин.

За допомогою генетичної інженерії можна підвищувати врожайність сільськогосподарських культур. Ця ознака є полігенною, проте, застосовуючи окремі гени, продукти яких дозволяють істотно підсилювати процеси росту і розвитку рослин, можна, в кінцевому підсумку, підвищити продуктивність рослин. Генно-інженерні розробки активно проводяться в слідуючих напрямках: підвищення фотосинтетичної активності і збільшення синтезу окремих речовин. Роботи по збільшенню фотосинтетичної активності зосереджені в напрямку введення генів C_4 фотосинтезу в C_3 рослини. Ген фосфоенолпіруваткарбоксілази фотосинтетичної системи кукурудзи C_4 , який кодує основний фермент, що бере участь в фіксації атмосферного CO_2 в клітинах мезофілу листка, був клонований і перенесений методом агробактеріальної трансформації в C_3 рослини рису. Аналіз одержаних трансгенних рослин рису показав, що активність фермента в клітинах рису в 2-3 рази була вища, ніж у кукурудзи, що призвело до збільшення фотосинтетичної активності і врожайності. Крім клонування і використання

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

генів, які безпосередньо беруть участь в процесах фотосинтезу були ідентифіковані гени, що контролюють кількість хлоропластів в клітинах. Це також призводить до зміни рівня фотосинтезу. Одержані модифіковані білки, які специфічно зв'язують хлорофіл а/б. Показано, що підвищена експресія таких білків в трансгенних рослинах призводить до значного збільшення біомаси. При вбудовуванні в геном картоплі гена фітохром В арабідопсису підвищується інтенсивність фотосинтезу і збільшується врожай бульб.

Другий напрямок генно-інженерних робіт стосується зміни метаболізму у трансгенних рослин. Введення гена сахарофосфатсинтази кукурудзи – ключового ферменту в регулюванні вуглеводного метаболізму, в геном інших рослин викликало зміни вуглеводного обміну і підвищення продуктивності рослин.

Перенесення у геном картоплі гена, який кодує утворення ферменту УДФГ трансферази дозріваючого зерна кукурудзи, супроводжується посиленням біосинтезу ростових фітогормонів. Це дозволяє підвищити урожай клубнів - у два рази, рівень сухих речовин у клубнях - до 27 % (у звичайних сортів - менше 20%), аскорбінової кислоти - до 9%. Розрізані бульби не темніють на повітрі. Отримані також швидкоростучі трансгенні рослини осики, шляхом введення в них генів *ugt* - із кукурудзи та *acb^{p302}* - з арабідопсису. Продукти цих генів впливають на швидкість росту рослин, змінюючи їх гормональний (ауксиновий) статус.

Методами генетичної інженерії можна досягти підвищення якісних і споживчих властивостей сільськогосподарської продукції. Отримані рослини кави, зерна яких не містять кофеїну, тютюну без нікотину, арахісу, який не містить характерних для нього алергенів. Швейцарськими вченими створений сорт Золотого рису, при перенесенні до його геному генетичної конструкції, що містить три гени від різних організмів, необхідних для біосинтезу β -каротину: гени фітоендесатурази і лікопін- β -циклази – від нарцису та ген каротиндесатурази - від бактерії. В результаті у зерні рису почала утворюватись підвищена кількість речовин, необхідних для біосинтезу β -каротину (провітаміну А). Модифікована рослина запобігає дефіциту вітаміну А в раціоні мешканців країн, для яких рис є основною складовою повсякденного харчування. Генно-інженерний підхід був використаний для підвищення вмісту вітаміну А в таких важливих сільськогосподарських культурах, як ріпак, цвітна капуста, морква, картопля, маніока, манго, банан, гарбуз, диня, ківі, томат.

Проводяться роботи зі створення трансгенних деревних порід із зниженим вмістом лігніну, що є дуже важливим для целюлозно-паперової промисловості. Лігнін, який складає 15-35% від сухої речовини в деревині при виробництві паперу є “зайвим” компонентом, а його видалення хімічними методами - дорогим й екологічно небезпечним процесом.

Створені експериментальні установки для одержання за допомогою рослин моноклональних антитіл, функціональних фрагментів антитіл і полімеру полі- β -гидроксибутирату, який використовують для виготовлення

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

пластику, що піддається біодеградації. Одержання цього полімеру за допомогою трансгенних рослин – важливий крок для створення сільськогосподарських культур, які можна використовувати для масштабного виробництва біодеградуючих пластиків.

Регулювання строків дозрівання і зберігання плодів

Методами генетичної інженерії можна не тільки вводити в організм новий чужорідний ген, але й заблокувати (провести адресне руйнування), послабити (або навпаки підсилити) дію природного гена. Наприклад, плоди томатів під час дозрівання містять значну кількість спеціального білка-фермента PG (полігалактуронази), дія якого спричинює їх рихлість. Цей фермент бере участь у руйнуванні пектину – основного компонента міжклітинного простору тканин плодів та клітинної стінки. Продукт гена *pg* синтезується в період дозрівання плодів томатів. При збільшенні його кількості плоди поступово втрачають пружність, стають більш м'якими й загнивають, що призводить до значного скорочення їх строку зберігання. Для видалення цього білка (з метою подовження строків зберігання томатів) проводять відключення гена *pg* шляхом вбудовування в геном томатів антисенсових конструкцій відносно цього гена. В результаті транскрипції отримують антисенсову мРНК (так звану асРНК), що комплементарно зв'язується з нормальною (сенсовою) мРНК, з утворенням молекули дволанцюгової РНК (дуплекс), яка втрачає функцію матриці для синтезу білка. При використанні цього методу отримані перші комерційні рослини томату *Flavr Savr*, які відрізняються зниженою деполімеризацією пектину клітинної стінки, у результаті чого збільшується лежкість плодів, зберігаються товарні й харчові якості та підвищується стійкість рослин до грибкових захворювань.

Генно-інженерний підхід застосовують і для регулювання строків дозрівання томатів. Відомо, що етилен – це газоподібний гормон, одна з функцій якого – контроль за процесами дозрівання і старіння плодів. Як мішень, у даному випадку, використовують ген *efe* (ethylene-forming enzyme), продуктом якого є фермент, що бере участь у біосинтезі етилену. У трансгенних рослинах рівень етилену є набагато нижчим норми, що підвищує термін зберігання плодів. Даний підхід представляє інтерес і для забезпечення тривалого зберігання зрізаних квітів.

Зміна забарвлення квіток у декоративних рослин

У квітникарстві в усі часи намагались створити рослини, квітки яких мають привабливий зовнішній вигляд і краще зберігаються після зрізування. Однак схрещування рослин традиційними методами – довготривалий і кропіткий процес, що має певні обмеження. Так, наприклад, нікому не вдавалось вивести сорт троянд з квітами синього забарвлення. Методами генетичної інженерії в Голландії був створений сорт блакитних (синіх) троянд за допомогою перенесення в них гена з дельфініума, який контролює синтез

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

блакитного пігменту. В 1998-2001 рр. були одержані перші чотири комерційні сорти трансгенних квітів: сорт гвоздики з геном АСС-синтази, який викликає прискорене цвітіння, і три сорти (два - гвоздики і один – хризантеми) – зі зміненими генами біосинтезу антоціану, що призвело до нетрадиційного забарвлення пелюсток вінчика. Отримані також сорти петунії, трансформовані конструкціями, що містять мобільні елементи і трансгенні рослини бавовни із забарвленим волокном. В майбутньому натуральне бавовняне волокно стане більш міцним, не буде м'ятись, зсідатись та матиме різноманітне забарвлення без використання хімічних барвників.

Створення гербіцидостійких рослин

Одним із основних напрямків біотехнології рослин є одержання культурних рослин, стійких до гербіцидів, які мають широкий спектр дії. При знищенні бур'янів вони проявляють також пригнічувальну дію і на посіви, екологічно небезпечні і токсичні для ссавців, проявляючи здатність до накопичення в рослинах та забруднення навколишнього середовища. Гербіциди негативно впливають на метаболізм рослин, інгібуючи біохімічні процеси і, перш за все, фотосинтез (атразин, симазин, діурон) і синтез амінокислот (гліфосат, сульфонілсечовина, біалофос).

Одержання сільськогосподарських культур стійких до гербіцидів методами генетичної інженерії базується на вивченні молекулярних механізмів толерантності і включає наступні етапи: виявлення біохімічних мішеней дії гербіцидів у рослинній клітині, відбір рослин/бактерій, стійких до даного гербіциду (як джерела генів резистентності), ідентифікація і клонування цих генів, вивчення їх експресії для використання в трансгенних конструкціях. Доведено, що ознака гербіцидостійкості є моногенною (детермінується найчастіше одним-єдиним геном), що полегшує можливість застосування технології рекомбінантних ДНК для її передачі. Тому гени, кодуєчі ті чи інші ферменти деструкції й модифікації гербіцидів, можуть успішно використовуватись для створення гербіцидостійких рослин методами генетичної інженерії.

Найбільш широко в рослинництві застосовують гербіцид гліфосат (комерційна назва - Roundup), який пригнічує синтез найважливіших ароматичних амінокислот (тирозину, фенілаланіну та триптофану). Під дією цього гербіциду в нестійких до нього рослинах спостерігаються симптоми азотного голодування і загибель протягом двох тижнів. Методами генетичної інженерії отримані сорти низки сільськогосподарських культур, стійких до гліфосату. Зокрема в країнах Північної Америки і Європи натеper дозволені до застосування більше 20 сортів стійких до гербіцидів трансгенних рослин, таких важливих сільськогосподарських культур як кукурудза, бавовна, рис, соя, пшениця, картопля, томати, льон.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Стійкість до комах

Для боротьби з комахами-шкідниками в рослинництві застосовують високоєфективні хімічні засоби захисту рослин – інсектициди, які водночас негативно впливають на життєздатність корисних комах і забруднюють довкілля. Крім того, у комах-шкідників згодом виникає механізм пристосування до дії інсектицидів. Відомо понад 400 видів комах, стійких до тих чи інших інсектицидів. Тому все більшу увагу привертають альтернативні біологічні засоби боротьби, які забезпечують строгу вибірковість дії та відсутність адаптації комах-шкідників до інсектицидів.

Генно-інженерні методи дозволяють конструювати рослини з підвищеною резистентністю до атаки комах. Показано, що бактерії *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) експресують інсектицидний білок - прототоксин (Cry-білок, гени якого локалізовані на плазмідах), високотоксичний для багатьох видів комах, але безпечний для ссавців. Цей білок у кишечнику комах під впливом ферментів протеїназ (класу гідролаз) розщеплюється і перетворюється в активний токсин, який специфічно зв'язується з рецепторами (кінцевими структурами чутливих нервових волокон, клітини яких сприймають подразнення) в середній кишечнику комах і призводить до лізису клітин кишкового епітелію і спричинює їх загибель. Взаємодія токсину з рецепторами строго специфічна, що ускладнює підбір комбінації «токсин - комаха».

Знайдено велику кількість природних штамів *B. thuringiensis*, ендотоксини яких діють тільки на певні види комах. Препарати *B. thuringiensis* протягом останніх десятиліть використовують для контролю чисельності комах на полях, завдяки безпечності токсину і його білкових складових для людини та інших ссавців. При вбудовуванні гена ендотоксину (*bt*) в геном різноманітних видів рослин (тютюн, картопля, томати, бавовна, кукурудза, рис, рапс, тополя та ін.) були отримані трансгенні рослини (*Bt*-рослини - від *B. thuringiensis*), які не ушкоджуються комахами (наприклад, картопля, стійка до колорадського жука), що дозволяє відмовитись від застосування інсектицидів (рис.24). На сьогодні *Bt*-рослини бавовни й кукурудзи займають основну частку в загальному обсязі виробництва генетично модифікованих рослин цих культур у США.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

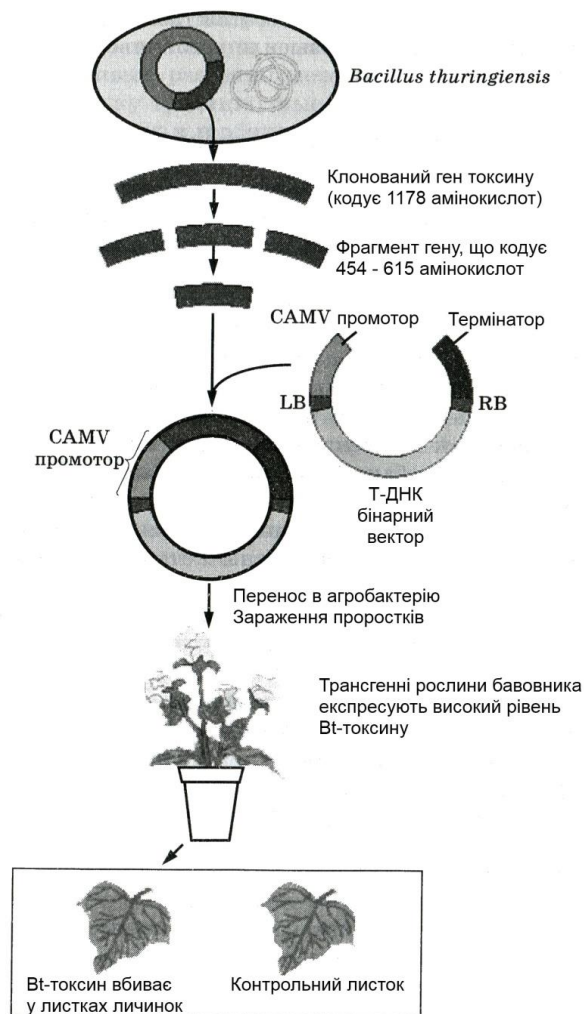


Рис. 24. Одержання трансгенних рослин бавовни з геном *bt*, що несуть стійкість до комах (за Л.А. Лутовою, 2000)

Ефективність захисту сільськогосподарських культур, трансформованих генами ендотоксину була показана і на трансгенних рослинах томатів. При цьому бактеріальний білок, синтезований в тканинах рослин, забезпечував захисний ефект на рівні дії хімічних інсектицидних препаратів. Слід наголосити, що використання трансгенних рослин в сільськогосподарському виробництві призвело до різкого скорочення застосування інсектицидів і підвищення врожайності.

Підвищення стійкості рослин до стресових умов

Рослини дуже часто зазнають впливу різних несприятливих факторів навколишнього середовища. Високі й низькі температури, нестача води, часті посухи, вторинне засолення ґрунтів, різке погіршення екологічної ситуації – це абіотичні стресові чинники, які призводять до втрати понад 50% врожаю більшості сільськогосподарських культур. Тому використання сортів рослин, толерантних до стресових дій, має велике економічне значення.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

В рослин виробляються різні способи захисту – від фізіологічних змін до структурних пристосувань, які визначають їх адаптивну стійкість. Стійкість до того чи іншого стрес-фактора має дві складові: витривалість та опірність (тотожні англійським поняттям *tolerance* і *resistance*). Якщо в першому випадку йдеться про виживання організму в несприятливих стресових (критичних) умовах, то в другому – про його функціонування. Оскільки зазначені механізми стійкості істотно впливають на загальний стан рослинного організму, то в результаті формується комплексна стійкість рослин до дії низки несприятливих стресових чинників.

Для підвищення стійкості рослин методами генетичної інженерії використовують окремі гени, які контролюють біохімічні процеси, безпосередньо індуковані фактором стресу. Так, відомо, що в рослинах за умов тривалого водного стресу накопичується низка органічних низькомолекулярних сполук, таких, як пролін, гліцинбетаїн та інших, які слугують осморегуляторами або осмопротекторами. Встановлено подібність стресової відповіді у бактерій і вищих рослин: в обох випадках в клітинах відбувається синтез молекул осмопротекторів, механізм дії яких полягає у встановленні осмотичного балансу між цитоплазмою і навколишнім середовищем та частковій стабілізації білків. Подібність біохімічних шляхів синтезу молекул осмопротекторів дозволили використовувати гени бактеріального походження для одержання стійких до стресів трансгенних рослин. Із геному *E. coli* були виділені два гени, кодуєчі ферменти шляхів біосинтезу проліну, акумулювання якого в клітинах рослин відбувається у відповідь на осмотичний стрес. Експресія бактеріальних генів в геномі рослин призводить до активізації процесів синтезу і накопичення проліну в тканинах трансгенних рослинах.

Для одержання морозостійких рослин використовують побічний підхід, який базується на генно-інженерних методах роботи з бактеріями *Pseudomonas syringae* та *Erwinia herbicola*. Виявлено, що саме ці бактерії епіфітної (поверхневої) мікрофлори та їх білки слугують центрами кристалізації при uszkodженні рослин за низьких температур.

З розвитком індустриальних технологій актуальною є розробка методів, які дозволяють вести сільське господарство в умовах підвищених концентрацій важких металів у ґрунті. Одним із підходів вирішення цієї проблеми є клонування і вбудовування в геном рослин гена, кодуєчого білок тваринного походження - *металотіонеїн*, здатний зв'язувати важкі метали, в тім числі і кадмій.

Подальше вивчення фізіологічної, біохімічної і генетичної основ відповідної реакції рослин на стресові фактори середовища дозволить більш широко застосовувати методи генетичної інженерії для конструювання стійких до стрес-факторів рослин.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Підвищення ефективності біологічної азотфіксації

Атмосферний азот фіксується завдяки дії нітрогенази - одного із найбільш складних і унікальних ферментів, які використовують прості субстрати. Серед азотфіксуючих бактерій найбільш детально досліджені симбіотичні з бобовими рослинами ризобії та вільноживуча бактерія *Klebsiella pneumoniae*. Встановлено, що в цих бактерій за фіксацію азоту відповідають 17 генів - так звані *nif-гени*, які зчеплені між собою і розміщені в хромосомах між генами, кодуєчими біосинтез гістидину (*his*), і генами, відповідальними за засвоєння шикімової кислоти (*shi*). У швидкоростучої ризобії *nif-гени* знаходяться у формі мегаплазмиди, яка містить 200-300 т.п.н. До ядерного геному клітин симбіотичних бактерій плазмиди, крім структурних генів нітрогенази, входять гени відповідальні за розвиток кореневих бульбочок у певних видів бобових. Конструювання плазмід з *nif-генами* дозволяє передавати здатність до фіксації азоту організмам, у яких ця властивість відсутня.

На сучасному етапі наукових досліджень увага низки вчених спрямована на вирішення проблем введення генів азотфіксації в клітини інших рослин (не бобових), створення ризоценозів між цими рослинами (особливо злаками) і азотфіксуючими організмами, підвищення потужності кореневої системи бобових рослин для збільшення кількості клубеньків. Створені нові азотфіксуючі системи, шляхом введення діазотрофних мікроорганізмів у калюсні тканини рослин та отримані з них рослини-регенеранти.

Таким чином, найбільш перспективними напрямками є підвищення ефективності фіксації азоту у природних системах за рахунок впливу на гени, що контролюють цей процес, а також збільшення потужності кореневої системи бобових рослин і створення нових азотфіксуючих систем за допомогою методів клітинної інженерії.

Лабораторна робота 41.

Приготування живильного середовища

для культивування *A.tumefaciens*

Мета роботи: нарощування *A.tumefaciens* та використання її для трансформації рослинних клітин і виділення Tі-плазмиди.

Матеріали та обладнання: стерильні бактеорологічні пробірки, колби, хімічні стакани, спиртівка, петля для посіву бактерії, ламінар-бокс, картопляний відвар, хлористий натрій, агар-агар, технічні ваги.

ХІД РОБОТИ

1. Наважку очищеної картоплі в кількості 250 г залити 400 мл водопровідної води, довести до кипіння і витримати на слабкому вогні протягом 10 хвилин.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

2. Картопляний відвар процідити через чотири шари марлі та додати 2,5 г NaCl.

3. Наважку агару (10 г) залити 100 мл водопровідної води і залишити на 30 хв для набухання. Відтак довести до кипіння і додати до картопляного відвару. Загальний об'єм середовища довести до 500 мл.

4. Розлити по 5 мл середовища в стерильні пробірки, закрити їх ватними пробками і простерилізувати при 1 атм протягом 20 хв.

5. Після стерилізації пробірки покласти під кутом 15-20° для отримання скошеного агару («косяків»).

6. На поверхню застиглого середовища за допомогою бактеріологічної петлі висіяти невелику кількість *A.tumefaciens*.

7. Пробірки помістити в термостат в умови абсолютної темряви при регульованій температурі +24-25°C.

7. Через 48 годин вирощені таким чином бактерії використовують для трансформації рослинних клітин та виділення Ті-плазмід.

Лабораторна робота 42.

Трансформація клітин коренеплоду моркви під дією *A.tumefaciens* (природна генетична інженерія)

Трансформація відбувається при вбудовуванні Ті-плазмиди в геном рослини, що призводить до трансформації її клітин. Клітини починають ділитись і утворюють корончатий гал (рис.25). Поява пухлин є маркерною ознакою трансформації клітин. Корончатий гал – це пухлинна тканина, клітини якої здатні до росту і поділу на безгормональному середовищі та автономного синтезу ростових речовин, а саме ауксинів та цитокінінів.

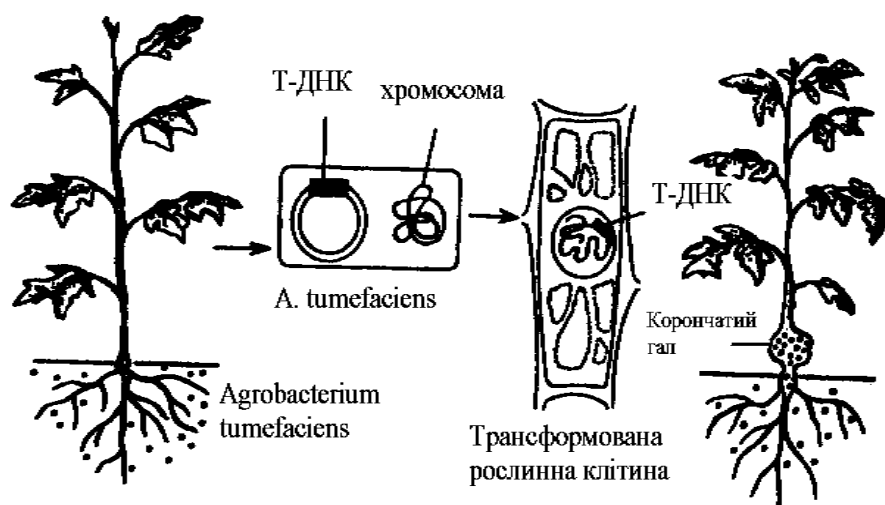


Рис.25. Інтеграція Т-ДНК в хромосому рослини і утворення пухлини (корончатий гал) (за Е. С. Пірузян, 1989):

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Мета роботи: отримати трансформовані клітини коренеплоду моркви під дією *A.tumefaciens*.

Матеріали та обладнання: чашки Петрі з «голодним» агаром, інструменти (ланцети, пінцети, свердла), фарфоровий стакан із 96⁰ спиртом, коренеплоди моркви, стерильний фізіологічний розчин, стерильні піпетки, 48-годинна культура *A.tumefaciens*, ламінар-бокс.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати 0,8% розчин агару, проавтоклавувати його при 1 атм протягом 25 хв. Розлити в асептичних умовах (в ламінар-боксі) в стерильні чашки Петрі.

2. Здорові, не пошкоджені коренеплоди моркви, які зберігались при температурі +4°C ретельно миють мильним розчином за допомогою щітки, промивають проточною водою та споліскують дистильованою водою, очищують.

3. Подальшу роботу проводять в ламінар-боксі: коренеплід наколюють на стерильний ланцет, опускають у фарфорову склянку з 96% етиловим спиртом і обпалюють в полум'ї спиртівки.

4. Вичленити експлантати моркви і висадити в чашки Петрі на «голодний» агар.

5. Приготувати суспензію *A.tumefaciens*, додаючи в пробірку, в якій вирощувалась бактерія 3 мл стерильного фізіологічного розчину, змиваючи склянню паличкою колонії бактерії.

6. Набрати стерильною піпеткою суспензію бактерії і нанести на експлантати по 1-2 краплі (0,02-0,03 мл).

7. Контролем слугують не заражені бактерією *A.tumefaciens* експлантати.

8. Чашки Петрі помістити в термостат при регульованій температурі +26-27°C, вологості 70-80%. Через кожні 5-7 діб необхідно проводити спостереження за утворенням пухлин.

9. На 5-7 добу на інокульованих експлантатах з'являються корончатоголові пухлини (рис.26), а на 14-21 - експлантати повністю покриваються корончатими галами. На контрольних експлантатах пухлини не утворюються.



Рис. 26. Утворення корончатих галів на експлантатах моркви

Лабораторна робота 43.

Трансформація рослинних клітин томатів під дією *A.tumefaciens*

Мета роботи: отримати трансформацію стеблових клітин томатів під дією патогенного штаму *A.tumefaciens*.

Матеріали і обладнання: асептичні рослини-регенеранти, 48-годинна культура бактерії, ламінар-бокс, фізіологічний розчин, одноразовий інсуліновий шприц, спиртівка.

ХІД РОБОТИ

Роботу проводять в ламінар-боксі.

1. Приготувати суспензію бактеріальних клітин, додаючи в пробірку, в якій вирощували бактерію 3 мл стерильного фізіологічного розчину і за допомогою скляної палички змити колонії бактерії.

2. Одноразовим шприцем набрати суспензію бактеріальних клітин.

3. Відкрити пробірку з асептичною рослиною томатів і в стеблову частину за допомогою шприца ввести суспензію бактеріальних клітин (декілька ін'єкцій). Закрити пробірку ватною пробкою або фольгою.

4. Інокульовані рослини культивують в світловій термальній кімнаті при температурі +25-26 °C і 14-годинному фотоперіоді.

5. Через кожні 7-10 діб необхідно проводити обстеження інокульованих рослин. На ділянках, де відбулася трансформація під дією Tі-плазміди, з'являються нарости у вигляді корончатих галів. Пухлини досягають розміру в діаметрі до 2 см при товщині стебла рослини томату 0,3 см.

Лабораторна робота 44.

**Трансформація рослинної клітини під дією Ті-плазміді
*Agrobacterium tumefaciens***

Методи генетичної трансформації рослин умовно розділяють на дві групи. Перша група методів – «кокультивування» та «листочкові диски», заснована на природній здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* до введення свого генетичного матеріалу в рослини. Друга - до якої відноситься «пряме перенесення генів» передбачає пряме фізичне подолання мембранного бар'єру у протопластів рослин.

Мета роботи: отримати трансформовані рослинні клітини методом «листочкових дисків».

Матеріали та обладнання: ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), чашки Петрі, живильні середовища, стерильні рослини, бактеорологічна петля, стерильний фільтрувальний папір, стерильна дистильована вода, культура *Agrobacterium tumefaciens*.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати середовище для вирощування бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, склад якого:

- Гідролізат казеїну 10 г
- Дріжджовий екстракт 1 г
- Глюкоза 10 г
- NaCl 1 г
- MgSO₄ • 7H₂O 0,25 г
- CaCl₂ • 2H₂O 0,25 г

pH 7,5 до автоклавування

Довести об'єм середовища до 1 л. Проавтоклавувати при 1 атм протягом 25 хвилин.

2. Висіяти агробактерії на середовище за допомогою бактеорологічної петлі і культивувати на качалці ротаційного або шейкерного типу при 100 об/хв і температурі +37⁰С протягом нічної пори доби (для отримання нічної культури агробактерії).

3. Приготувати регенераційні середовища R, R₁, R₂ (табл.13) для "листочкових дисків" і проавтоклавувати їх при 1 атм протягом 20-25 хвилин.

Таблиця 13.

Склад живильного середовища

Компоненти	Середовище		
	R	R ₁	R ₂
Макроелементи МС	100 мл	100 мл	100 мл

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Мікроелементи МС	1 мл	1 мл	1 мл
Fe – халат	5 мл	5 мл	5 мл
Мінозетол	100 мг	100 мг	-
Вітамін В ₁	10 мг	10 мг	10 мг
Вітамін В ₆	1 мг	1 мг	1 мг
Сахароза	10 г	10 г	20 г
Кінетин	1 мг	1 мг	-
НОК	0,1 мг	0,1 мг	-
Агар	-	8 г	8 г
Н ₂ О	884 мл	876 мл	876 мл
Клафوران	-	500 мг	200 мг
Карбеніцилін	-	500 мг	200 мг
Канаміцинсульфат	-	50 мг	100 мг
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

4. Для отримання листових дисків використовують стерильні рослини картоплі або тютюну, листки яких нарізають смугами або одержують диски за допомогою свердла діаметром 2-3 мм і поміщають в чашку Петрі на живильне середовище R.

5. Через 5 годин до середовища, де культивуються листові диски (смужки), додають отриману нічну культуру агробактерій із розрахунку 1 мл культури на 10 мл середовища.

6. Уражені агробактерією листові диски (смужки) поміщають в термостат і культивують при температурі +28°C протягом 48 годин. Після інкубації їх обережно виймають пінцетом, промивають стерильною дистильованою водою і обсушують стерильним фільтрувальним папером.

7. Листові диски (смужки) переносять на агаризоване живильне середовище R₁ і культивують в термостаті при регульованій температурі +23-24°C. На 25-30 добу утворюються темно-зелені точки, а потім пагони.

8. Одержані пагони поміщають на безгормональне живильне середовище R₂ для укорінення і культивують в термальній кімнаті при температурі +25-26°C, 14 – годинному фотоперіоді та вологості повітря 60-70%.

9. Проводять біохімічний аналіз укорінених рослин (виділення хлоропластної, мітохондріальної ДНК тощо).

За допомогою методу «листових дисків» можна отримувати значну кількість генетично трансформованих рослин.

Лабораторна робота 45.

Виділення ядерної ДНК з рослинних тканин

Ядерну ДНК використовують для аналізу соматичних гібридів. За допомогою методу Саузерн блот-гібридизації досліджують успадкування і

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

організацію в геномах соматичних гібридів ядерної ДНК вихідних батьківських компонентів.

Мета роботи: оволодіти методикою виділення рослинної ДНК.

Матеріали і обладнання: термостат, водяна баня, лабораторна центрифуга, фарфорова ступка, рослини-регенеранти або калюс, міні-центрифуга, автоматичні піпетки, ваги.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати буферний розчин, склад якого:

- 5М сечовина;
- 0,1М ЕДТО;
- 0,1М тріс-НСІ рН 8,0.

2. Взяти наважку 5-10 г листків або калюсної тканини і помістити в фарфорову ступку, ретельно розтерти з рідким азотом і додати 20 мл буферного розчину.

3. Провести гомогенізацію, додаючи 1 мл насиченого водою фенолу та 2 мл 20 % додецилсульфату натрію.

4. Одержаний гомогенат залишити для лізису при кімнатній температурі на 15-20 хв, відцентрифугувати суміш при 5000 g протягом 30 хвилин.

5. Перенести надосадову рідину у пробірку і провести двократну депротейнізацію сумішшю, яка містить:

- 75% фенолу;
- 24% хлороформу;
- 1% ізоамілового спирту.

Центрифугують протягом 3 хв при 1600g.

7. Відібрати водну фазу. Осадити ДНК, додаючи до водної фази два об'єми етанолу (відповідно до утвореної її кількості) і охолодити при -20°C протягом 30 хвилин.

8. Відцентрифугувати суміш протягом 10 хвилин при 4000g.

9. Злити надосадову рідину і розчинити одержаний осад ДНК в ТЕ буфері складу:

- 10мМ тріс-НСІ, рН-7,6
- 1мМ ЕДТО, рН-8,0
- рН буферу 7,6

10. Отриманий розчин ДНК зберігати в морозильній камері при температурі -20°C .

Лабораторна робота 46.

Ампліфікація плазмід

Ампліфікація – це утворення додаткових копій хромосомних послідовностей, виявлених в хромосомній або в нехромосомній ДНК.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Мета роботи: отримання великого числа копій плазміди.

Матеріали та обладнання: качалка шейкерного типу, лабораторна центрифуга, спектрофотометр, колонія бактерій, середовище LB, буфер STE.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати середовище LB (Luria-Bertani) з ампіциліном, яке містить в 1 л:

- бакто-триптон – 10 г
- бакто-дріжджовий екстракт – 5 г
- NaCl – 10 г
- ампіцилін – 1 мл

2. В колбу наливають 10 мл середовища LB і висівають окрему колонію бактерій. Інкують на качалці шейкерного типу протягом ночі при температурі +37°C.

2. На другу добу ранком висівають 0,1 мл одержаної нічної культури в 25 мл середовища LB в колбу на 100 мл. Інкують при температурі +37°C, інтенсивно струшуючи, доки культура не досягне пізньої логарифмічної фази ($D_{600}=0,6$ – визначається на спектрофотометрі).

3. До 500 мл середовища LB додають 25 мл культури в логарифмічній фазі та інкують при температурі +37°C при інтенсивному струшуванні на качалці ($D_{600}=0,4$).

4. Додають 2,5 мл розчину хлорамфеніколу (34 мг/л в етанолі).

5. Інкують при температурі +37°C при інтенсивному струшуванні на качалці протягом 12-16 годин.

6. Збирають бактеріальні клітини центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хв при температурі +4°C і зливають надосадову рідину.

7. Отриманий осад клітин один раз промивають 100 мл охолодженого буферу STE

- 0,1M NaCl
- 10mM тріс – HCl, pH 7,8
- 1mM ЕДТО

і використовують для подальших молекулярних досліджень.

Лабораторна робота 47.

Виділення плазмідної ДНК

Плазміди – невеликі кільцеві молекули ДНК, здатні до стабільного, незв'язаного з хромосомами існування і автономної реплікації, які широко використовуються в генетичній інженерії.

Мета роботи: оволодіти методикою виділення плазмідної ДНК.

Матеріали та обладнання: ламінар-бокс, центрифуга, водяна баня, сухий лід, культура *E.coli.*, центрифужні пробірки, автоматичні сэмплери.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати середовище LB (Luria-Bertani) з ампіциліном, яке містить в 1 л:
 - бакто-триптон – 10 г
 - бакто-дріжджовий екстракт – 5 г
 - NaCl – 10 г
 - ампіцилін – 1 мл
2. В ламінар-боксі середовище LB розлити в колби по 5 мл і висіяти за допомогою бактеріальної петлі одну бактеріальну колонію. Інкубувати на шейкерній мішалці при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом ночі при інтенсивному перемішуванні (нічна культура).
3. Перенести 1,5 мл нічної культури в пробірку і центрифугувати протягом 1хв при 10000 об/хв. Решту нічної культури зберігають в холодильній камері при температурі $+4^{\circ}\text{C}$.
4. Супернатант злити, а до утвореного осаду додати 0,35 мл розчину, що містить 8% сахарози, 0,5% тритону X-100, 50 мМ ЕДТО, 10 мМ тріс-НСІ рН-8,0.
5. Додати 25 мкл розчину лізоциму (10 мг/мл в 10 мМ тріс-НСІ рН-8,0) і перемішати скляною паличкою протягом 3 секунд.
6. Пробірку помістити на киплячу водяну баню (100°C) на 40 секунд.
7. Вміст пробірки центрифугують при 14000 об/хв протягом 10 хв в умовах кімнатної температури.
8. Супернатант перенести в іншу пробірку і додати 40 мкл 2,5М ацетату натрію та 420 мкл ізопропанолу. Вміст пробірки перемішати, витримати на бані з сухим льодом протягом 15 хвилин і центрифугувати при 14000 g, температурі $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хвилин.
9. Супернатант злити, а осад в пробірці висушити при кімнатній температурі, після чого розчинити в 50 мкл буферу ТЕ рН-8,0, який містить РНКазу (50 мг/мл). Одержану суміш інкубують на водяній бані при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 10 хв. В результаті такої обробки видаляється РНК.
10. Осадити ДНК центрифугуванням при 14000g протягом 15 хв за умов кімнатної температури.
11. Осад висушити, розчинити в 50 мкл ТЕ буферу, розлити в пробірки по 15 мкл і зберігати при температурі -20°C .
12. Одержані фрагменти ДНК аналізують за допомогою гел-електрофорезу (рис. 27)

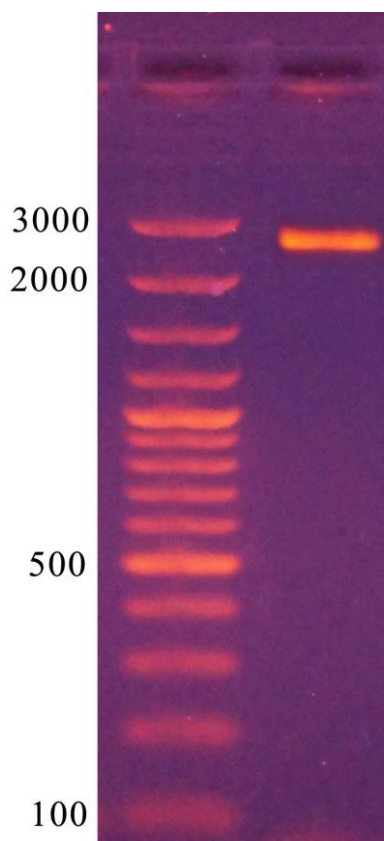


Рис. 28. Гель-електрофорез плазмідної ДНК.

Лабораторна робота 48.

Виділення рослинної РНК

РНК – рибонуклеїнова кислота, яка складається із 5-вуглецевого цукру-рибози, залишків фосфорної кислоти та азотистих основ: аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу.

Мета роботи: оволодіти методикою виділення РНК.

Матеріали та обладнання: лабораторна центрифуга, рослинний матеріал, насичений фенол, деіонізована вода, ацетат амонію, автоматичні піпетки, фарфорові ступки, пробірки, тридистильована вода.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати буферний розчин для екстракції РНК, склад якого:
 - 0,02 М тріс-НСІ рН-8,9
 - 2 мМ SDS, 4% бентоніт
 - 20% фенол.
2. Наважку листків або калюсних тканин в кількості 1 г розтерти в ступці з рідким азотом і додати 2 мл буферу для екстракції РНК.
3. Отриманий гомогенат перенести в пробірку і центрифугувати при 5000 г протягом 30 хв і температурі +4°C.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

4. До супернатанту додати рівний об'єм 80% фенолу в 0,5М тріс-НСІ рН-7,6 і суміш хлороформ: ізоаміловий спирт (24:1) для депротейнізації.
5. Суміш центрифугують при 5000 g протягом 5 хв і температурі +4°C.
6. Осадити РНК в надосадовій рідині ацетатом амонію до концентрації 0,5 М та 2,5 об'єму 96⁰ етанолу і витримати в холодильній камері при температурі -20°C протягом 2 годин.
7. Розчин РНК центрифугують при 5000 g і при температурі +4°C протягом 30 хв.
8. Отриманий осад РНК висушити та розчинити в деіонізованій воді.
9. Переосадити РНК таким же об'єму ацетату амонію та етанолу, витримуючи в морозильній камері при температурі -70°C протягом 30 хвилин.
10. Осадити РНК центрифугуванням при 10000 об/хв і температурі +4°C протягом 3 хвилин.
11. Супернатант злити, а осад висушити, розчинити в тридистильованій воді, розлити в пробірки і зберігати в холодильній камері при температурі -20°C.

Лабораторна робота 49.

Гель-електрофорез рослинної РНК

Відомо 2 методи, які найчастіше використовують при розділенні та визначенні молекулярної маси РНК.

1. Електрофорез в агарозному гелі після денатурації РНК гліоксалем і диметилсульфоксидом.
2. Електрофорез в агарозному гелі, який містить формальдегід або гідроксидметил ртуті.

Мета: визначення молекулярної маси РНК методом електрофорезу в агарозному гелі після денатурації РНК гліоксалем і диметилсульфоксидом.

Матеріали та обладнання: прилад для горизонтального електрофорезу, джерело струму, рослинна РНК, 0,8% агароза, піпетки, буфер для нанесення проб, 6 М гліоксаль, диметилсульфоксид ртуті, розчин бромистого етидію.

ХІД РОБОТИ

1. Приготувати розчин гліоксалю, обробляючи його іонообмінною смолою (Bio-Rad AG 501-X8) до нейтральної реакції (рН=7,0), після чого розділити на невеликі аліквоти, зберігаючи в холодильній камері при температурі -20°C.
2. Приготувати розчин фосфату натрію, розчиняючи 0,1 моль NaH_2PO_4 в мінімальному об'ємі води. Довести рН розчину до 7,0 концентрованою фосфорною кислотою (H_3PO_4) і додати дистильованої води до загального об'єму розчину 1л.
3. В пробірці змішати
 - 2,7 мкл 6М гліоксалю

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

- 8,0 мкл диметилсульфоксиду (DMSO)
- 1,6 мкл 0,1 М NaH_2PO_4 рН 7,0
- 3,7 мкл РНК.

4. Отриманий розчин РНК інкубують на водяній бані при температурі $+50^\circ\text{C}$ протягом 60 хвилин.

5. Приготувати 0,8% агарозний горизонтальний гель.

6. Розчин РНК охолодити і додати 4 мкл буферу для нанесення проби РНК на гель.

7. Гель занурити в фосфатний буфер і пропустити через нього електричний струм при напрузі поля 30-40В і постійному перемішуванні буферу.

8. Після закінчення електрофорезу для забарвлення гелю додати фарбник бромистий етидій (концентрація 0,5 мкг/мл) і сфотографувати.

Лабораторна робота 50.

Кількісне визначення рослинної ДНК або РНК

Для визначення кількості ДНК або РНК у виділених рослинних препаратах застосовують два методи. В разі аналізу проб очищеної ДНК або РНК використовують фотометричне визначення, засноване на вимірюванні величини поглинання УФ-променів азотистими основами нуклеїнових кислот. У випадку, коли проба містить домішки або має невелику кількість ДНК чи РНК про їх кількісний вміст можна судити за інтенсивністю флуоресценції бромистого етидію.

Мета: визначення кількості ДНК або РНК в рослинних препаратах спектрофотометричним методом.

Матеріали та обладнання: спектрофотометр, кювети, розчин ДНК або РНК.

ХІД РОБОТИ

1. Налити в кювети досліджуваний розчин нуклеїнових кислот (лабораторні роботи 45, 48).

2. Виміряти оптичну густину розчину в областях з довжиною хвиль 260 та 280 нм. Вимірювання оптичної густини при 260 нм дозволяє розрахувати концентрацію нуклеїнових кислот в досліджуваній пробі.

3. Величина оптичної густини $D_{260}=1$ відповідає ~ 50 мкг/мл дволанцюгової ДНК та 40мкг/мл РНК.

4. Відношення величини оптичної густини, виміряної при 260нм, до величини, виміряної при 280нм (D_{260}/D_{280}) дає можливість оцінити чистоту нуклеїнової кислоти. Зокрема для чистого препарату ДНК величина відношення становить $D_{260}/D_{280}=1,8$. В разі РНК - $D_{260}/D_{280}=2,0$

При наявності в препаратах білка чи фенолу, величина відношення D_{260}/D_{280} набуває менших значень - 1,8 і 2,0 для ДНК та РНК відповідно.

Тема 12. Використання біохімічних маркерів для оцінки стійкості рослин до стресів

Лабораторна робота 51.

Визначення активності пероксидази

Пероксидаза – фермент, який каталізує окислення різних сполук за допомогою пероксиду водню (H_2O_2) або органічних пероксидів. Приймає участь в дихальному процесі рослин.

Метод базується на вимірюванні оптичної густини продуктів реакції, які утворюються при окисленні гваяколу за певний проміжок часу.

Мета роботи: визначення активності пероксидази спектрофотометричним методом.

Матеріали і обладнання: 0,15 М фосфатний буфер з рН 5,4, 0,15% розчин пероксиду водню, розчин гваяколу (183 мг гваяколу на 25 мл води), спектрофотометр СФ-46 або ФЕК (фотоелектроколориметр), рослинний матеріал, піпетки.

ХІД РОБОТИ:

1. Наважку листків або калюсу (500 мг) розтирають в ступці з невеликою кількістю фосфатного буферу, переносять в мірну колбу на 25 мл і доводять фосфатним буфером до мітки. Через 10 хв після відстоювання екстракт центрифугують при 4000 об/хв протягом 10 хвилин.

2. В кювету спектрофотометра з робочою довжиною 1 см вносять піпеткою 0,5 мл субстрату, 1,5 мл 0,15 М буферного розчину (рН 5,4), 0,5 мл ферментативної витяжки (центрифугату) і 0,5 мл 0,15% розчину пероксиду водню.

3. Попередньо встановлюють в нульовому положенні стрілку амперметра приладу за контрольною кюветою, в яку вносять компоненти реакційної суміші, без пероксиду водню, замінюючи його на дистильовану воду (0,5 мл).

4. Облік проводять декілька разів через 20 с протягом 2 хв, вимірюючи оптичну густину розчину при 470 нм.

5. Активність пероксидази (А) виражають у відносних одиницях на 1 г сирої маси за формулою:

$$A = \frac{(D_2 - D_1) V V_2 60}{(t_2 - t_1) V_1 n}, \text{ де}$$

D_1 – оптична густина розчину на початку досліду; D_2 – оптична густина розчину на кінець досліду; t_1 і t_2 – час початку і кінця досліду, секунд; n – маса

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

наважки, г; V – загальний вихідний об'єм витяжки, мл; V_1 – об'єм витяжки для проведення реакції, мл; V_2 – загальний об'єм рідини в кюветі, мл; 60 – коефіцієнт переводу в хвилини.

Лабораторна робота 52.

Вивчення ізоферментного спектру пероксидаз

Мета роботи: вивчення ізоферментного спектру пероксидаз.

Матеріали і обладнання: прилад для вертикального електрофорезу, рослинний матеріал, тріс-гліциновий буфер, бензидін, розчин „А”, „В”, „С”, „Д”, „Е”, „F”, дистильована вода.

ХІД РОБОТИ:

1. Для проведення електрофорезу наважку 2,5 г листків гомогенізують з трьохкратною кількістю тріс-гліцинового буферу (рН 8,3) складу:

- Тріс ·HCl рН 8,0 – 6 г
- гліцин – 28,8 г

доводять дистильованою водою до об'єму 1 л.

2. Гомогенат центрифугують протягом 20 хв при 2000g, використовуючи для електрофорезу супернатант.

3. Для розділення ізоферментів застосовують вертикальні блоки 7,5% поліакриламідного геля (115 x 115 x 2 мм) і систему гелю №1 з тріс-гліциновим електродним буфером рН 8,3, запропоновану Девісом:

Розчин „А”

1N HCl	48 мл
Трісоксиметиламінометан (Тріс)	36,6 г
H ₂ O	до 100 мл
рН 8,9	

Розчин „В”

1M H ₃ PO ₄	25,6 мл
Трісоксиметиламінометан (Тріс)	5,96 г
H ₂ O	до 100 мл
рН 6,7	

Розчин „С”

Акриламід	30,0 г
N,N'-метилен-бісакриламід	0,8 г
H ₂ O	до 100 мл

Розчин „Д”

Акриламід	10,0 г
N,N'-метилен-бісакриламід	2,5 г
H ₂ O	до 100 мл

Розчин „Е”

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

Персульфат амонію 0,14 г
H₂O до 100 мл
Всі розчини готують безпосередньо перед аналізом

Приготування гелів

Розділяючий гель 7,5%		Концентруючий 2,5%	
H ₂ O	1 частина	H ₂ O	3 частини
Розчин „А”	1 частина	Розчин „В”	1 частина
Розчин „С”	2 частини	Розчин „Д”	3 частини
Розчин „F”	4 частини	Розчин „F”	1 частина
ТЕМЕД	4 краплі	ТЕМЕД	4 краплі

4. Електрофорез проводять протягом однієї годин спочатку за напруги 100W, а надалі - 200W до закінчення розподілу ізоферментів. Фронт електрофоретичної рухливості відмічають за барвником бромфеноловий синій.

5. Зони пероксидазної активності виявляють, використовуючи реакцію між бензидином і аскорбіновою кислотою. Для цього 20 мл основного розчину бензидину (2г бензидину розчиняють в 18 мл льодяної оцтової кислоти і додають до нього 72 мл води) змішують з 70,4 мг аскорбінової кислоти, 20 мл 0,6% пероксиду водню, 60 мл дистильованої води. Час, необхідний для розвитку забарвлення гелю прямо пропорційний до концентрації аскорбінової кислоти і обернено пропорційний активності фермента.

6. Ізоферментний спектр досліджуваних пероксидаз характеризують за їх електрофоретичною рухливістю (R_f).

Лабораторна робота 53.

Визначення активності поліфенолоксидази

Поліфенолоксидаза – фермент, який каталізує окислення орто-дифенолів в присутності кисню з утворенням води і орто-хінонів. Механізм дії фермента базується на утворенні комплексів міді фермента з киснем.

Мета роботи: визначення активності поліфенолоксидази

Матеріали і обладнання: проростки рослин, калюсна тканина, ФЕК або СФ-46, субстрати в різним спектром максимуму поглинання: пірокатехін 366–420 нм, ДОФА (діоксіфенілаланін) 436 – 475 нм, хлорогенова кислота 328 – 400 нм, 0,05М розчин пірокатехіну, 1,15М фосфатний буфер рН 7,4, витяжка ферментів, лабораторна центрифуга, фарфорові ступки.

ХІД РОБОТИ:

1. Наважку рослинного матеріалу 500 – 1000 мг розтирають в ступці з невеликою кількістю фосфатного буферу (рН 7,0-7,4), переносять в мірну колбу на 25 мл, доводять до мітки і центрифугують при 30000g протягом 60 хвилин.

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

2. Визначення оптичної густини розчину ферменту при додаванні пірокатехіну проводять при довжині хвилі 420 нм.

3. В кювету спектрофотометра або ФЕКа товщиною 1 см поміщають 0,5 мл ферментного препарату, 2,0 мл фосфатного буферу (рН 7,4) і 0,5 мл розчину пірокатехіну, додаючи його в останню чергу, і з першою краплею включають секундомір. Вимірювання проводять протягом однієї хвилини з інтервалом в 20 секунд. Контролем слугує дистильована вода.

4. Результати виражають або за зміною оптичної густини ферментного розчину за 1 хв на 1 г сирової маси або 1 мг білка чи в кількості окисленого субстрату за 1 хв на 1 мг білка.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Ким і коли були відкриті нуклеїнові кислоти?
2. Хто вперше запропонував дволанцюгову структуру ДНК і у якому році?
3. Назвіть дату заснування генетичної інженерії.
4. Будова нуклеїнових кислот.
5. Дати пояснення принципу комплементарності для молекули ДНК.
6. Дати визначення термінам трансгенез і трансгенні організми.
7. Що таке рекомбінантна ДНК? Її значення?
8. Дати перелік етапів одержання рекомбінантної ДНК.
9. Які ферменти беруть участь у створенні рекомбінантної ДНК?
10. Плазмідний вектор та його властивості.
11. Назвіть особливості різних типів векторних систем.
12. Охарактеризуйте етапи створення трансгенних рослин.
13. Які технології прямого перенесення генів у клітини використовують для одержання трансгенних мікроорганізмів, тварин, рослин?
14. Назвіть особливості будови геному клітин прокаріот та еукаріот.
15. Сформулюйте сутність технології синтезу кДНК.
16. Яке значення має кДНК у клонуванні генів?
17. Що таке геномні бібліотеки і чим вони відрізняються від бібліотек кДНК?
18. Охарактеризуйте особливості технології ампліфікації нуклеїнових кислот.
19. У чому полягає відмінність ампліфікації ДНК від її клонування?
20. Що таке секвенування ДНК?
21. Яке значення мають гібридизаційні ДНК- і РНК-зонди?
22. Розкажіть про можливості використання трансгенних організмів.
23. Дайте визначення плазміди.
24. Назвіть різновиди плазмід і функції, які вони виконують.
25. Чи можна вважати синонімами формулювання «трансформована рослина» і «трансгенна рослина»?

РОЗДІЛ 3. Генетична інженерія

26. Охарактеризуйте селективні і маркерні гени.

27. Для яких цілей використовують гени селективних маркерів при проведенні агробактеріальної трансформації клітин?

28. Від яких факторів залежить ефективність агробактеріальної трансформації?

29. Розкажіть про досягнення генетичної інженерії рослин.

30. Дайте визначення ферментам пероксидаза і поліфенооксидаза та розкажіть про їх функціональні особливості.

РОЗДІЛ 4. КОЛЕКЦІЇ ТА КРІОБАНКИ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

В умовах глобального погіршення екологічної ситуації на Землі особливо актуальною є проблема збереження біорізноманіття і стійкості екосистем, в основу якої покладено принцип комплексної охорони цінного генофонду для запобігання скорочення числа як окремих видів, так і їх генетичної структури. За оцінками екологів, щогодини з планети зникає один біологічний вид, що означає безповоротну втрату від 1 тис. до 10 тис. генів. За прогнозами вчених до 2015 р. число живих об'єктів на Землі може зменшитись на 20%. Тому перед біотехнологами гостро постає завдання вирішення проблеми збереження біорізноманіття рослин на нашій планеті.

Збереження організмів і клітинних культур

В 1992 р. у Ріо-де-Жанейро була прийнята міжнародна Конвенція стосовно збереження біологічної різноманітності і відновлення генетичних ресурсів дикоростучих рослин. Глобальну стратегію по збереженню рослин було прийнято на Шостій зустрічі в рамках Конференції Сторін по Конвенції про біологічне різноманіття, яка була проведена в Гаазі у 2002 р.

Найбільш повноцінний генофонд дикоростучих видів зберігається в природних популяціях на охоронних територіях - у заповідниках, національних парках, ботанічних садах тощо. Однак ці традиційні засоби збереження біологічного різноманіття рослин через властиві їм обмеження вже давно не задовольняють вимог до поставлених завдань.

Одним з ефективних засобів збереження живих об'єктів, у тім числі мікроорганізмів і культури клітин, є підтримання їх у колекціях, про які іще не так давно було поширене уявлення, як про місце хаотичного «складування» таким чином зібраних штамів. Наразі всі колекції перебувають в епіцентрі наукових досліджень, оскільки в них зберігається не тільки генофонд, але й значні обсяги необхідної наукової інформації. У багатьох країнах світу спостерігається Ренесанс колекційної справи і колекції набувають все більшої цінності. Їх існування є необхідною умовою розвитку біотехнології в усіх промислово розвинених країнах. Наприклад, стійке функціонування великих національних колекцій мікроорганізмів є необхідним для проведення дослідницьких і прикладних робіт. Разом з тим необхідно відзначити, що створення колекції - це трудомістка і затратна справа. Наприклад, вартість створення й збереження протягом 25 років колекції, яка складається з 3 тис. мікроорганізмів становить 4 млн. доларів США.

У багатьох країнах світу створюються національні програми із збереження природного багатства генетичних фіторесурсів, обов'язковим компонентом яких є створення банків зародкової плазми (germplasm): насіння, меристем, пилку, зародків, культур тканин і клітин та іншого генетичного

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

матеріалу. Довгострокове зберігання геномів (зародкової плазми) дозволяє зібрати й зберегти без втрати життєздатності генетично повноцінний морфологічний, фізіолого-біохімічний та адаптаційний ресурс природної внутрішньовидової мінливості.

Одним з актуальних завдань сучасної еволюційної біології є створення системи генетичних стандартів. Це пов'язане з тим, що кожний генотип може еволюціонувати при наявності не менше 80-90% обсягу генетичної інформації. Існує необхідність надійного збереження в незмінному стані штамів тканин і клітин - важливих продуцентів речовин народногосподарського значення. Це зумовлено тим, що клітинні штами використовують замість природної рослинної сировини на біотехнологічних заводах. Створення банку продуцентів, що зберігаються в біологічно повноцінному стані протягом необхідного проміжку часу захищає виробництво від ризику їх втрат.

Натепер розроблена біотехнологія для підтримання і зберігання генофонду цінних видів рослин, основою якої є методи культивування *in vitro* клітин, тканин, меристем, зиготичних і соматичних зародків рослин. Однак це досить трудомісткий процес, оскільки вимагає значних затрат ручної праці, енергії та хімічних реактивів, що спонукає вчених до розроблення технологій, які сприяють зниженню економічних затрат. До їх числа можна віднести:

- уповільнення росту різноманітних об'єктів;
- висушування;
- кріозбереження.

Для уповільнення росту об'єктів слугують наступні способи:

- зберігання під шаром мінерального масла (застосовується для бактеріальних і грибних культур, іноді - для клітинних культур вищих рослин);
- зміна газового складу і атмосферного тиску усередині культуральної посудини;
- зміна світлового режиму;
- охолодження до температури припинення активного росту;
- використання гормональних (для рослинних клітин часто застосовують хлорхолінхлорид) і осмотичних (маніт у концентрації 3-6 %) інгібіторів;
- заміна в живильних середовищах CaCl_2 на $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$;
- індукція бульбоутворення в пробірках (дозволяє зберегти генофонд, наприклад картоплі).

Висушування застосовується для збереження об'єктів і проводиться у вакуумних сушильних шафах або в розпилюючій сушарні, що дозволяє пневматично розпилювати розчин у камері з потоком нагрітого повітря. Найбільш часто використовують метод ліофільного висушування, який заснований на тому, що температура кипіння води при тиску 4,6 мм.рт.ст. становить 0°C , а при тиску 0,034 мм.рт.ст. знижується до -50°C . За цих температурних умов вода замерзає, тому процес упарювання є типовою сублімацією. Принцип проведення ліофільного висушування досить простий і економічно вигідний. Водний розчин повністю заморожують тонким шаром і

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

витримують у вакуумі при тиску 0,01-2 мм.рт.ст. Завдяки швидкому випаровуванню води, заморожений розчин постійно охолоджується. Виділені водяні пари уловлюють в охолоджуваних пастках або за допомогою поглинальних речовин. Таким способом можна повністю висушити об'єкт протягом двох годин.

Основні переваги методу ліофільного висушування полягають у тому, що:

- у процесі упарювання об'єкт перебуває при низькій температурі. Це особливо важливо для зневоднення білків, антибіотиків, вірусів, мікроорганізмів і нестабільних фармацевтичних продуктів;
- ліофілізація не супроводжується спінюванням;
- під час всієї операції об'єкт перебуває при низькій температурі, що запобігає його мікробіологічного руйнування, а ферментативне розщеплення речовин зводиться до мінімуму;
- немає небезпеки окислювання нестабільних речовин киснем повітря, оскільки роботу проводять при відносно глибокому вакуумі;
- отримані об'єкти містять близько 0,5% вологи, завдяки чому їх можна зберігати протягом тривалого часу, що запобігає їх руйнуванню або зараженню.

Кріозбереження і його основи

Термін «кріозбереження» (cryopreservation), тобто зберігання об'єктів при дуже низькій температурі (зазвичай при температурі рідкого азоту, яка становить -196°C), характеризує складний багатоетапний процес, що забезпечує необмежено довге зберігання живих клітин, тканин і органів у стані анабіозу. Основою кріозбереження слугує зворотне інгібування процесів життєдіяльності. Тільки в стані глибокого анабіозу, в разі повного призупинення метаболічних процесів та відсутності рідкої фази, створюються умови для тривалого зберігання біологічної системи і повне повернення її до вихідного стану в умовах нормотермії.

Єдиним надійним засобом для рішення цього завдання є глибокий холод (-140°C та нижче), що забезпечується застосуванням рідкого азоту. Найважливіший етап процесу кріозбереження - заморожування. Натепер відомо два методи кріозбереження: програмне (повільне) і надшвидке заморожування. *Програмне* заморожування досить широко застосовують при збереженні тваринних і рослинних клітин. *Надшвидке* заморожування розроблено порівняно недавно і є методом майбутнє.

На етапі заморожування виникають певні труднощі, оскільки існують дві групи об'єктів, які піддають кріозбереженню:

— тканини, вміст води в яких мінімальний (пиллок, ортодоксальне насіння). Для таких об'єктів процес заморожування досить простий. Їх можна занурювати безпосередньо в рідкий азот і розморожувати згодом на повітрі у звичайних умовах;

— більшість рослинних тканин, для яких характерні великі розміри

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

клітин, міцна целюлозна стінка і наявність центральної вакуолі. Причому саме ступінь вакуолізації клітин (оводненість) відіграє основну роль у стійкості до дії низьких температур. Для таких об'єктів прийом простого заморожування малоефективний, тому що не відбувається збереження всіх вихідних властивостей і їх життєздатності.

При проведенні робіт із кріозбереження клітин рослин, особливо тих, що культивуються в умовах *in vitro*, варто відбирати дрібні клітини з маленькою вакуолею та зниженим вмістом води. Необхідно розробляти в кожному окремому випадку умови заморожування і їх наступного відтаювання. Це обумовлено двома ушкоджуючими факторами, що проявляються при заморожуванні. Перший з них - лід, який виникає спочатку в розчині навколо клітин; другий - дегідратація клітин, спричинена формуванням кристалів утвореного позаклітинного льоду. Тому необхідно з найменшою втратою життєздатності оминати при заморожуванні - відтаюванні зону між температурою захисного розчину і температурою -40°C (у виняткових випадках - до -70°C). Саме в цій температурній зоні проявляється дія обох ушкоджуючих факторів заморожування, кожний з яких небезпечним, оскільки проявляє здатність до деструкції зовнішньої клітинної мембрани - плазмалеми а, отже, загибель клітин.

Перше завдання кріозбереження - запобігання утворенню кристалів льоду всередині клітин. В разі клітин рослинного організму вона вирішується більш складним способом, ніж у інших об'єктів, внаслідок наявності в них вільної води. Ці труднощі можна подолати за рахунок зниження швидкості охолодження або попереднім зневодненням клітин. Відомо, що чим більше води в клітині, тим менше повинна бути швидкість заморожування. З іншого боку, попереднє зневоднення клітин може призвести до їх ушкодження, пов'язані з дегідратацією.

Друге завдання кріозбереження - послаблення впливу стресів, спричинених неминучою дегідратацією. Для цього необхідно застосовувати певний склад суміші протекторів і оптимальну швидкість заморожування, а також оптимізація всієї програми процесу кріозбереження.

При проведенні планомірних фундаментальних і прикладних досліджень з'ясовують механізми кріоушкоджень та кріозахисту біологічних систем різних рівнів організації.

1. *Запобігання утворення внутрішньоклітинного льоду.* Загибель клітин відбувається в основному при утворенні льоду в протопласті, оскільки для її структурних компонентів безпечними є лише кристали льоду розміром не більше 0,1 мкм. При швидкому зниженні температури ($20^{\circ}\text{C}/\text{хв}$) у протопласті утворюються дуже дрібні кристали льоду, які є центрами кристалізації. Вони швидко наростають, приєднуючи молекули води із протопласта, утворюючи великі кристали льоду, здатні до механічного ушкодження клітини, в основному мембран та клітинних структур.

При повільному заморожуванні (у парах рідкого азоту або в спеціальних

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

програмних заморозувачах) лід першочергово утворюється в міжклітинниках. Відомо, що менш концентровані розчини в них, замерзають швидше. По мірі охолодження кристали льоду, які виникають в апопласті, наростають за рахунок води. Лід формує градієнт водного потенціалу, спрямований із клітин у міжклітинники, що поступово призводить до дегідратації клітин і, як наслідок, - денатурації білків, порушення функціонування мембран, збільшення концентрації йонів до токсичних величин, порушення синтезу нормальних клітинних білків.

Процес утворення позаклітинного льоду і пов'язаний з ним відтік води із клітин можна стимулювати спеціальними речовинами, які клітини виділяють в апопласт. Вони носять назву *нуклеатори*, а сам процес - *нуклеація*. Ці речовини виконують роль центрів кристалізації води і підвищують поріг зародкоутворення льоду. Завдяки нуклеаторам, лід у міжклітинниках утворюється при більш високій температурі, ніж необхідна для замерзання внутрішньоклітинного середовища. Таким чином, поступова дегідратація протопластів клітин є однією з необхідних умов виживання клітин при заморозуванні.

2. *Біологічні антифризи*. У клітинах деяких рослин відбувається синтез високомолекулярних сполук, які гальмують процеси нуклеації та наростання кристалів льоду і носять назву біологічних антифризів. Вони перешкоджають позаклітинному утворенню льоду, особливо в тих органах і тканинах, для клітин яких характерним є збереження максимальної кількості води й здатність перебувати в переохолодженому стані (бруньки і меристеми). Відомо антифризи білкової, глікопротеїнової і полісахаридної природи. Отже, за допомогою антифризів можна здійснювати блокаду наростання кристалів льоду.

3. *Нагромадження цукрів та інших сумісних осмолітів*. Зниження вмісту води в клітинах при утворенні позаклітинного льоду, що супроводжується дегідратацією, збільшення концентрації йонів у цитоплазмі спричинює різного роду порушення структури та функцій біополімерів. Зокрема відбувається денатурація білків і пригнічення їх ферментативної активності, змінюється структура ліпідного біошару мембран і порушується їх цілісність. Деструктивні зміни в мембранах, у свою чергу, зумовлюють порушення внутрішньоклітинної компартментації речовин.

Регуляція осмотичного тиску в клітинах при холодовій дегідратації здійснюється переважно за рахунок біосинтезу низькомолекулярних органічних сполук, які одержали назву *осмолітів*. Вони добре розчиняються у воді, нетоксичні, не викликають змін в процесах метаболізму і тому одержали другу назву - *сумісні речовини*. До них відносяться моно- і олігоцукри, багатоатомні спирти, амінокислоти, бетаїни, аміни та білки.

Поряд з осморегулюванням, вони виконують захисну (протекторну) функцію стосовно біополімерів цитоплазми. Враховуючи подвійну роль осмолітів, їх часто називають *кріопротекторами* (від грецьк. *kryos* — холод і

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

лат. protector - заступник, захисник).

Найбільш відомі такі кріопротектори, як диметилсульфоксид (ДМСО), різні цукри, гліцерин, етиленгліколь, пролін. Їх умовно підрозділяють на дві групи - проникні і не проникні в клітини. Так, гліцерин проникає в клітину при кімнатній температурі і стає непроникною сполукою при 0°C.

Кріопротектори синтезуються у клітинах при знижених температурах і можуть запобігати або різко сповільнювати ріст кристалів льоду. Чим вище концентрація розчину, тим нижче точка його замерзання. Наприклад, при нагромадженні розчинних цукрів у клітині знижується водний потенціал цитоплазми і точка її замерзання, що перешкоджає утворенню внутрішньоклітинного льоду. Крім того, цукри підвищують осмотичну концентрацію клітинного соку, що сприяє збільшенню водоутримуючої здатності клітин і захищає їх від зневоднення при утворенні позаклітинного льоду. Цукри захищають білки від денатурації, яка настає внаслідок зближення макромолекул при дегідратації, а також від підвищеної концентрації токсичних речовин.

Таким чином, гідрофільні білки, моно- і олігоцукри, яким властива кріопротекторна дія, здатні зв'язувати значну кількість води в міжклітинниках і протидіють її транспортуванню і замерзанню. Вважається, що білки і вуглеводи, які мають кріопротекторним ефектом, здатні при дегідратації клітин стабілізувати інші білки і клітинні мембрани.

4. Зміна складу мембранних ліпідів і текучості мембран. Дегідратація клітин впливає на структурний стан ліпідів мембран, які за нормального функціонування зв'язують до 30-50% води клітин. При взаємодії із зарядженими та полярними групами білків і фосфоліпідів, вода стабілізує структуру мембрани.

Основною причиною ушкоджуючої дії низьких температур на клітини є порушення функціонування клітинних мембран внаслідок їх затвердіння, пов'язаного з фазовими переходами (вода-лід), оскільки при досить низьких температурах ліпідні біошари набувають властивостей твердих тіл. При температурі, вищій за фазовий перехід структура біошару зберігається. Жирні кислоти при цьому "плавляться", в результаті чого обертання і скручування молекул відбувається значно легше, ніж при низьких температурах.

Різноманітність реакцій клітини на дію низьких температур обумовлюється, в першу чергу, відмінностями в складі жирних кислот, що входять до мембранних фосфоліпідів. В разі наявності у фосфоліпідах підвищеного вмісту насичених жирних кислот (таких, як пальмітинова і стеаринова), мембрани характеризуються більш високими температурами фазового переходу. При цьому зменшується текучість мембран, що призводить до порушення функціонування багатьох білків (каналів, переносників, рецепторів, ферментів тощо). Виявлено, що збільшення кількості ненасичених жирних кислот (таких, як ліноленова та лінолева) у складі мембран спричинює зниження температури фазового переходу мембранних ліпідів і, як результат,

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

збільшення їх текучості. При сильній дегідратації порушуються зв'язки між ліпідами і білками мембран. При позаклітинному утворенні льоду в мембранах з'являються ділянки, які не містять білків.

Таким чином, з огляду на вище сказане можна дійти висновку, що головною мішенню кріоушкоджень клітин рослин є плазмалема. Підвищення толерантності до заморожування пов'язано зі змінами характеристик плазмалеми, у тому числі складу ліпідів та їх ненасиченості.

5. *Абсцизова кислота.* Важлива роль в адаптації клітин рослин до низьких температур належить фітогормону АБК (абсцизова кислота). Виявлено, що АБК накопичується в рослинах при несприятливих умовах навколишнього середовища (водному дефіциті, підвищеній концентрації солей, зниженій температурі тощо) і відіграє важливу роль в їх адаптації до стрес-факторів (*гормон стресу*).

Показано, на рослинах різних систематичних груп збільшення внутрішньоклітинної концентрації АБК при знижених температурах. Крім того, значним підвищенням концентрації гормону в рослинних тканинах і синтезом в них нових білків супроводжується дегідратація клітин. Активність експресії багатьох генів і білків при низькій температурі або водному дефіциті, може бути індукована обробкою їх АБК. Таким чином, накопичення АБК у тканині при зниженій температурі призводить до експресії ряду генів і появи кріопротекторних білків.

6. *Окисний стрес.* При низьких температурах у хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах і апопласті спостерігається інтенсивне утворення АФК (активних форм кисню). За умов тривалого холодого впливу на клітини рослин рівень АФК підвищується в багатьох компартаментах, внаслідок чого у клітинах накопичується перекис водню і розвивається окиснювальний стрес.

Важливим фактором стійкості клітин до низькотемпературного впливу є функціонування потужної антиоксидантної системи. До неї входять високомолекулярні (ферменти супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонредуктаза), а також низькомолекулярні (аскорбат, токоферол, глутатіон, фенольні сполуки) антиоксиданти. За умов низькотемпературного стресу активність антиоксидантних ферментів значно зростає і збільшується вміст низькомолекулярних антиоксидантів, що сприяє зниженню ушкодження клітин.

Способи підготовки до глибокого заморожування.

Стійкість клітин *in vitro* до заморожування залежить від їх вихідного морфологічного стану, який визначається особливостями культивування, фазою росту і т.д. Відомо, що найвищою стійкістю до заморожування характеризуються клітини в стаціонарній фазі росту. Можна заморожувати клітини і у логарифмічній фазі росту, підбравши оптимальну швидкість охолодження. Іноді при цьому виникає необхідність у застосуванні кріопротекторів. При проведенні робіт з кріозбереження необхідно насамперед

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

враховувати специфіку рослинних клітин, відбираючи дрібні клітини з невеликими вакуолями і зниженим вмістом води.

Фізіологічні підходи до процесу кріоконсервації відрізняються різноманітністю. Один з них - стадія культивування перед кріоконсервуванням. В ряді випадків кріостійкість організмів залежить від складу культурального середовища. При зміні величини співвідношення вуглецю і азоту в живильному середовищі, доповненні його жирними кислотами, солями кальцію або іншими компонентами змінюється кріочутливість організмів, вирощених в цих умовах. У зв'язку з цим було запропоновано попереднє культивування клітин рослин у відповідних умовах. Встановлено позитивний вплив на кріостійкість як короткої інкубації клітин при зниженій температурі, так і загартування - природної підготовки морозостійких клітин. Загартування суспензій клітин в культурі *in vitro* проводять при поступовому зниженні температури культивування і одночасному збільшенні концентрації сахарози в середовищі, а також додаванні різних кріопротекторів. Однак, слід наголосити, що здатність клітин до загартування є генетично детермінованою ознакою.

Інший фізіологічний підхід підготовки до кріозбереження, заснований на зниженні водного потенціалу середовища при додаванні в нього осмотично активних речовин - кріопротекторів. Серед відомих кріопротекторів виділяються такі легко проникаючі в клітини речовини, як диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), гліцерин (10-20%), а також непроникаючі високомолекулярні сполуки - полівінілпіролідон (ПВП), декстран, поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 6000.

Кріопротекторами можуть також слугувати сахароза, трегалоза та суміші цих розчинів. Крім того, попереднє культивування з маннітом та сорбітом (у концентрації 2-6%) сприяє значному зменшенню розтягнення клітин за рахунок зниження їх оводненості.

Наступний спосіб підготовки пов'язаний з фізіологічною роллю деяких ендогенних амінокислот при стресах, обумовлених водним дефіцитом. Це в першу чергу пролін, а також аланін, аспарагін, серин, гліцин, γ -аміномасляна кислота.

Відомо, що утворення стресових білків, що обумовлюють стійкість до низьких температур, регулюється фітогормоном АБК. В результаті впливу екзогенної АБК можливо домогтися збільшення морозостійкості та формування захисних механізмів у рослинних об'єктів, що є істотним для цілей кріоконсервування.

При спостереженні за клітинами під кріомікроскопом можна простежити за процесом утворення внутрішньоклітинного льоду, що перебуває в прямій залежності від ступеня переохолодження, швидкості заморожування, наявності чи відсутності центру ініціації кристалізації розчину, який оточує клітину.

Важливу роль при кріозбереженні має режим підбору заморожування. Так, для кріозбереження клітин, тканин рослин і мікроорганізмів доцільно застосовувати програмне заморожування з ініціацією кристалізації та

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

швидкістю охолодження. На першому етапі швидкість заморожування становить 0,25-1,0°C/хв (і температура -40°C), на другому - швидкість збільшують до 9-10°C/хв і при досягненні температури біля -60°C матеріал занурюють у рідкий азот. Цей процес проводять на спеціальному устаткуванні, яке забезпечує програмне заморожування.

Етап видалення кріопротекторів і рекультивування вимагає особливої обережності, оскільки клітини, що вижили зазнають сильного стресу і частково ушкоджуються. Для їх збереження необхідно мінімізувати всі фактори для запобігання ушкодження плазмалеми клітині, зокрема повинні бути видалені кріопротектори. Для інтенсифікації процесу рекультивування запропоновано фізіологічний спосіб, заснований на дифузії кріопротекторів з клітин в рідке середовище після висіву суспензії клітин на фільтри, розміщені на поверхні розчину. Це дозволяє замінити розчин, не впливаючи на клітини та уникнути додаткового стресу.

Для визначення життєздатності клітин після відтаювання застосовують простий спосіб - забарвлення вітальним барвником (0,1%-м розчином феносафраніну або 0,25%-м розчином синьки Еванса). При цьому мертві клітини набувають синього кольору. Остаточним критерієм життєздатності клітин після розморожування слугує відновлення їх росту і поділу при рекультивації на штучні живильних середовищах.

Таким чином, якщо до моменту глибокого заморожування клітинні штами зберігають здатність до регенерації, то після кріозбереження є можливість регенерувати рослини незалежно від строків їхнього зберігання в рідкому азоті. Відновлювати ріст клітинних культур можна через роки. Слід наголосити, що ембріогенні та морфогенетичні потенції клітин при кріозбереженні не змінюються за умови, що не порушується режим зберігання. Тобто температура не повинна перевищувати -140°C, а всі етапи кріоконсервування були оптимізовані. Отже, кріозбереження за своєю сутністю є консервацією в стані *анабіозу (кріобіозу)*, коли всі процеси життєдіяльності призупинені, але при відповідному розморожуванні та рекультивуванні їх можна відновити і «оживити» біологічні об'єкти.

Необхідно враховувати морфофізіологічні та генетичні особливості клітин, їх здатність до загартування, ступінь проникності клітинних мембран, підбір суміші кріопротекторів, швидкість зниження температури при заморожуванні і, відповідно, умови розморожування.

Технологія кріозбереженням рослинних об'єктів постійно розвивається і вдосконалюється. Натепер кріобанки, засновані на методі кріозбереження, можуть значно полегшують роботу селекціонерів, надаючи їм можливість для широкого використання пулу генів сортів, у тому числі старої селекції, а також диких і зникаючих видів рослин.

Кріобанки

Проблема надійного і необмежено тривалого зберігання організмів з

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

найменшими затратами і на мінімальній площі вирішується за рахунок використання *кріобанків*. Цей напрямок біотехнології почав розвиватись з початку 1970-х рр. Для врятування зникаючих видів на допомогу традиційним методам було запропоновано збереження в рідкому азоті насіння, апексів, ембріодів клітин, що культивуються *in vitro* і здатні регенерувати рослини. Кріобанки насіння різноманітних сільськогосподарських культур та їх дикоростучих родичів існують у розвинених країнах вже близько 40 років.

Проблема зберігання генофонду рослин та їх клітинних штамів стала, по суті, проблемою кріозбереження насіння, апексів пагонів, ембріонів і клітин *in vitro*. Апекси *in vitro*, на відміну від клітин, регенерують вихідний генотип і забезпечують не тільки збереження сортів, форм і видів, які розмножуються вегетативним способом та інших рослин, але й клонування окремих елітних екземплярів.

Завдяки збереженню кріоконсервованого генофонду, селекціонерам у будь-який час може бути наданий генотип, що має відповідні ознаки, а саме пилок для проведення гібридизації, унікальне та одиначне насіння, у тому числі і те, що не переносить зневоднення, трансформовані, мутантні, гібридні клітини різних видів рослин, здатних до *морфогенезу in vitro*, зиготичні та соматичні зародки тощо.

Крім того, створення на біотехнологічному виробництві запасів посівного кріоконсервованого матеріалу з високою специфічною активністю дозволяє одержувати стандартні високоактивні матеріали, запобігати втратам, пов'язаних зі зниженням специфічної активності на різних етапах схем створення посівного матеріалу. Прийоми кріоконсервування можна застосовувати також на стадії зберігання особливо цінних матеріалів.

Зберігання матеріалу в рідкому азоті практично не лімітується. Наприклад, в рідкому азоті клітини моркви зберігаються близько 25 років, меристеми картоплі більше 10 років та ін.

Таким чином, кріозбереження – сучасний і надійний спосіб тривалого зберігання клітинних штамів, тканин і мікроорганізмів.

Тема 13. Кріозбереження рослинного матеріалу

Лабораторна робота 53.

Вивчення захисної дії кріопротекторів на стійкість рослинних клітин до дії низьких температур

При дії негативних температур в міжклітинниках рослинних тканин утворюються кристали льоду, що призводить до ушкодження клітинних мембран і зневоднення цитоплазми. За відповідного ступеня зневоднення, індивідуального для кожної рослинної клітини, цитоплазма починає коагулювати.

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

Кристали льоду можуть утворюватися і безпосередньо в клітинах. Вони механічно діють на мембрани цитоплазми, порушують проникність плазмалеми, а при тривалій експозиції на морозі спричиняють загибель клітин, швидкість відмирання яких залежить від температури, часу експозиції та водоутримуючої здатності самої клітини. Збільшення кількості кріопротекторів у зимуючих органах рослин підвищує водоутримуючу здатність тканин та призводить до підвищення їх морозостійкості.

Мета роботи: вивчити вплив різних кріопротекторів на стійкість клітин до низьких температур.

Обладнання та матеріали: 1М розчин сахарози, 1М розчин гліцерину, 8%-й розчин NaCl, дистильована вода; пробірки; штативи для пробірок, мікроскопи, термометри, стерильні препарувальні голки, скальпелі, піпетки, скляні палички, предметні і покривні скельця; пробкові свердла; олівці по склу; лід чи сніг; фільтрувальний папір, коренеплоди цукрових буряків.

ХІД РОБОТИ

1. Для приготування охолоджувальної суміші змішують три частини снігу чи льоду з однією частиною кухонної солі. Температура охолоджувальної суміші становить близько -20°C .

2. З коренеплодів цукрових буряків вирізають декілька пластинок товщиною 5 мм.

3. За допомогою пробкового свердла діаметром 5-6 мм роблять висічки з цих пластинок.

4. Висічки ретельно промивають водою до повного видалення решток клітинного соку і по три-чотири поміщають в пробірки.

Пробірки підписують відповідно до схеми досліду.

В пробірку № 1 наливають 5 мл дистильованої води (контроль);

в пробірку № 2 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл води;

в пробірку № 3 – 5 мл 1 М розчину сахарози;

в пробірку № 4 – 2,5 мл 1 М розчину гліцерину і 2,5 мл води;

в пробірку № 5 – 5 мл 1 М розчину гліцерину;

в пробірку № 6 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл 1 М розчину гліцерину.

5. Пробірки з рослинним матеріалом на 15-20 хв поміщають в свіжоприготовлену охолоджувальну суміш, після чого їх обережно виймають і розморожують в стакані води кімнатної температури.

6. Після розморожування візуально проводять порівняння інтенсивності забарвлення висічок і кольору рідин в пробірках, відзначають і пояснюють їх відмінності.

7. Для перевірки життєздатності клітин із аналізованих висічок виготовляють тонкі зрізи за допомогою скальпеля і препарувальної голки поміщають їх на предметне скло, накривають покривельним скельцем

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

поміщають на столик мікроскопу і розглядають при збільшенні $\times 10$ в краплі розчину, в якому вони знаходились. Підраховують в одному полі зору загальну кількість і число знебарвлених клітин, з яких відбулося видалення бетаціаніну.

8. Визначення життєздатності клітин можна проводити також шляхом плазмолізу. Для цього тонкі зрізи клітин із аналізованих висічок поміщають на 10 хв в 8% розчин NaCl. Після чого препарати продивляються під мікроскопом і підраховують відсоток плазмолізованих клітин в полі зору (не менше п'яти полів зору).

9. Результати досліду занотувати і зробити висновки про захисну дію кріопротекторів на цитоплазму рослинних клітин.

Лабораторна робота 54.

Вплив кріопротекторів на білки цитоплазми рослинних клітин за дії негативних температур

При дії на рослину екстремальних температур може відбуватись коагуляція білків, про що свідчить випадання пластівчастого осаду у витяжках рослинної тканини, що характеризує її ушкодження. Кріопротектори стабілізують нативну структуру білків, захищаючи їх від згубного впливу низьких температур.

Мета роботи: вивчити вплив кріопротекторів на ступінь денатурації білків цитоплазми рослинних клітин.

Обладнання і матеріали: 1М розчин сахарози, 1М розчин гліцерину, дистильована вода, пробірки, штативи для пробірок, мікроскопи, термометри, препарувальні голки, скальпелі, піпетки, скляні палички, предметні і покривні скельця, пробкові свердла, олівці по склу, лід або сніг, фільтрувальний папір, бульби картоплі, листя капусти.

ХІД РОБОТИ

1. Картоплю очищають і натирають на тертці. Розтерту масу переносять на подвійний шар марлі і віджимають через неї сік у склянку. Дають відстоятись крохмалю, а надосадову рідину зливають і використовують для досліду.

2. Листя капусти дрібно шинкують, віджимають з них сік і фільтрують через марлю.

3. Пробірки підписують згідно схеми досліду.

В пробірку №1 наливають 2,5 мл клітинного соку картоплі (капусти) і 2,5 мл дистильованої води (контроль);

в пробірку № 2 - 2,5 мл клітинного соку і 2,5 мл 1М розчину сахарози;

в пробірку № 3 - 2,5 мл клітинного соку і 2,5 мл 0,5М розчину сахарози;

в пробірку № 4 - 2,5 мл клітинного соку і 2,5 мл 1М розчину гліцерину;

в пробірку № 5 - 2,5 мл клітинного соку і 2,5 мл 0,5М розчину гліцерину.

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

5. Перемішують вміст в пробірках і ставлять їх на 15-20 хв в охолоджувальну суміш (три частини снігу або льоду і одна частина кухонної солі). Температура охолоджувальної суміші близько -20°C .

6. Потім пробірки обережно виймають з охолоджувальної суміші і, не струшуючи, розморожують в склянці води кімнатної температури і спостерігають за утворенням пластівців коагульованого білка.

7. Результати дослідів занотувати і замалювати вміст пробірок. Зробити висновки про захисному дії кріопротекторів на білки та ступінь морозостійкості різних рослинних клітин.

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. Що вам відомо про умови, в яких найповноцінніше зберігається генофонд дикоростучих видів рослин?

2. Способи збереження живих об'єктів.

3. Які технологічні підходи використовують для зниження економічних затрат при збереженні генофонду рослин?

4. Які способи застосовуються для уповільнення росту клітин?

5. Охарактеризувати метод ліофільного висушування і його застосування.

6. Дайте визначення терміну «кріозбереження».

7. У чому сутність поняття «кріоконсервація»? Яке його біологічне значення?

8. Дати перелік методів, що використовуються при кріозбереженні об'єктів.

10. Які організми або їх тканини і клітини можуть слугувати об'єктами кріоконсервації?

11. Чому заморожування є найважливішим етапом процесу кріозбереження?

12. Які завдання стоять при проведенні кріозбереження живих організмів?

13. У чому полягає складність заморожування рослинних клітин порівняно з клітинами тварин і мікроорганізмів?

14. Порівняти, як впливає на клітини позаклітинний і внутрішньоклітинний лід, що утворюється при заморожуванні об'єктів.

15. Як запобігти утворенню внутрішньоклітинного льоду?

16. Біологічні антифризи та їх роль.

17. Які зміни в метаболізмі живих організмів відбуваються при кріозбереженні?

18. Кріопротектори та їх сутність.

19. Яка функціональна роль кріопротекторів при підготовці живих об'єктів до кріозбереження? В чому полягають особливості їх застосування?

20. Порівняйте технології швидкого і повільного заморожування та перспективи їх застосування.

21. Які зміни відбуваються в мембранах клітин при низьких

РОЗДІЛ 4. Колекції та кріобанки клітинних культур

температурах?

22. Який фітогормон відіграє важливу роль при адаптації клітин до низьких температур і його значення?

23. Дати перелік і обґрунтування етапів технологічного процесу кріоконсервації.

РОЗДІЛ 5. БІОБЕЗПЕКА І ДЕРЖАВНИЙ КОНТРОЛЬ

В умовах науково-технічного прогресу біотехнологічні проекти стрімко пересягнули з області наукових знань в галузь промислового комерційного використання. Результати фундаментальних біологічних і молекулярно-біологічних досліджень знайшли застосування у сільському господарстві, харчовій промисловості, фармацевтиці, медицині та приладобудуванні. Особливо широко досягнення генетики та молекулярної біології використовуються в сфері створення нових сортів сільськогосподарських рослин і порід тварин, які набувають різноманітних нових ознак, відсутніх у батьківських видів/сортів. Натепер одержанням і випробуванням генетично модифікованих рослин займаються сотні комерційних фірм в усьому світі із сукупним капіталом більше 100 мільярдів доларів. Біотехнологічні фірми поставляють на світовий ринок цілу низку генетично модифікованих організмів (ГМО): томати, кукурудзу, картоплю, тютюн, сою, ріпак, кабачки, редис, бавовну. Посіви трансгенних рослин у всьому світі займають площі більше 58 млн. га. В найближчі роки очікується подальше зростання посівних площ під генетично модифікованими формами культурних рослин. Це багато в чому обумовлюється необхідністю забезпечення людства продовольством, що до 2020 року буде становити біля 7,7 мільярдів чоловік, майже половина яких буде проживати в містах. Разом з тим в останні роки різко позначилось питання про безпечність цих технологій та дотримання Міжнародних провідних принципів безпеки ЮНЕП в області біотехнології, прийнятих іще в 1995 році.

Аргументи прихильників дотримання принципів безпеки змушують наразі уряди багатьох країн Європейського союзу, Азії та Африки вносити корективи в сільськогосподарську політику і відмовлятися від виробництва низки сортів ГМО. У світовій літературі розгорнулась гостра дискусія про обґрунтованість декларованих ризиків застосування ГМО. Однак, слід наголосити, що багато доводів щодо додержання принципів безпеки отримали експериментальне підтвердження, яке спонукало дати об'єктивну оцінку можливостей використання ГМО, звертаючи особливу увагу на харчові ризики.

Вбудовування в геном організму - хазяїна нових конструкцій, спрямоване на покращання корисних для людини властивостей і зниження собівартості виробництва. Проте разом з набуттям тієї чи іншої ознаки, організм дістає цілий набір нових якостей, опосередкованих як плейотропною дією нового білка, так і властивостями самої вбудованої конструкції, в тому числі, її нестабільністю і регуляторною дією на сусідні гени. Всі небажані явища і події, що відбуваються при обробітку і споживанні ГМО об'єднують в три групи: харчові, екологічні та агротехнічні ризики.

Харчові ризики

Додаток

1. Безпосередня дія токсичних і алергенних трансгенних білків ГМО.
2. Ризики, опосередковані плейотропною дією трансгенних білків на метаболізм рослин.
3. Ризики, опосередковані накопиченням гербицидів та їх метаболітів у стійких сортах і видах сільськогосподарських рослин.
4. Ризики горизонтального переносу трансгенних конструкцій, в першу чергу, в геном симбіонтних для людини і тварин бактерій (*E. coli*, *Lactobacillus (acidophilus, bifidus, bulgaricus, caucasicus)*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* та ін.)

Екологічні ризики

1. Зниження сортового різноманіття сільськогосподарських культур внаслідок масового застосування ГМО, отриманих з обмеженого набору батьківських сортів.
2. Неконтрольоване перенесення конструкцій, особливо тих, що визначають різні типи стійкості до пестицидів, шкідників і хвороб рослин, внаслідок переzapилення з дикоростучими спорідненими видами, і в зв'язку з цим, зниження біорізноманіття дикоростучих предківських форм культурних рослин та формування "супербур'янів".
3. Ризики неконтрольованого горизонтального перенесення конструкцій в ризосферну мікрофлору.
4. Негативний вплив на біорізноманіття через ураження токсичними трансгенними білками нецільових комах і ґрунтової мікрофлори та порушення трофічних ланцюгів.
5. Ризики швидкої появи стійкості до використовуваних трансгенних токсинів у комах-фітофагів, бактерій, грибів та інших шкідників під дією відбору на ознаку стійкості, високоефективної для цих організмів.
6. Ризики появи нових, більш патогенних штамів фітовірусів, при взаємодії фітовірусів з трансгенними конструкціями, що проявляють локальну нестабільність в геномі рослини-хазяїна і, тим самим, є найбільш вірогідною мішенню для рекомбінації з вірусною ДНК.

Агротехнічні ризики

1. Ризики непередбачуваних змін нецільових властивостей і ознак модифікованих сортів, пов'язані з плейотропною дією введеного гена. Наприклад, зниження стійкості до патогенів при зберіганні і стійкості до критичних температур при вегетації сортів, стійких до комах-шкідників.
 2. Ризики відстрочення зміни властивостей, які проявляються через декілька поколінь, пов'язані з адаптацією нового гена в геномі і з проявом як нових плейотропних властивостей, так і зі зміною вже декларованих.
 3. Неєфективність трансгенної стійкості до шкідників через декілька років масового використання даного сорту.
 4. Можливість застосування виробниками термінальних технологій для монополізації виробництва насіннєвого матеріалу.
- Одним з головних аргументів проти вживання "трансгенних" продуктів

Додаток

харчування є наявність у багатьох з них генів стійкості до антибіотиків (зокрема, до канаміцину, неоміцину). Трансгенні конструкції, що несуть як маркерну ознаку стійкість саме до таких препаратів, широко використовується біотехнологічними компаніями. Передбачається, що гени стійкості можуть при перетравленні їжі передаватись кишечній ендогенній мікрофлорі, в тому числі, і патогенній.

Горизонтальне перенесення генів широко відомо в царстві бактерій. В процесі еволюції обмін генами здійснювався як між ними, так і між бактеріями і еукаріотами. Здатність обмінюватись ділянками геному бактерії зберігають до цієї пори, тому ця властивість має пряме відношення до харчових і екологічних ризиків використання ГМО. Вірогідність вбудовування трансгенної конструкції із рослини в геном людини і тварин дуже мала. Необхідно враховувати, що клітини вищих еукаріот мають декілька ізолюючих бар'єрів, які ефективно перешкоджають горизонтальному перенесенню. Навіть у випадку такого перенесення клітина, як правило, не розмножується, перебуваючи в термінальній стадії диференціювання. Перенесення конструкції в статеві клітини є взагалі неймовірним, враховуючи гемато-тестикулярний бар'єр, непроникний для крупних молекул, але слід зауважити, що людина має ендосимбіонти, зокрема, кишкову бактеріальну флору. Відомо, що бактерії здатні до трансформації як з кільцевими, так і з лінійними формами ДНК з інвертованими повторами. Фрагменти трансгенної були ДНК виявлені у вмісті кишечника, крові і молоці корів та свиней, в раціон яких вводилися корми з ГМО. При цьому, у відповідності з часто застосовуваною методикою відбору трансгенних конструкцій під дією антибіотиків, ці фрагменти несуть репортерні гени стійкості до антибіотиків як маркерні послідовності. В результаті мікроби можуть набути резистентності до даних антибіотиків.

Передача стійкості до антибіотиків між різними бактеріями – цілком доведене явище. Зокрема було продемонстровано перенесення стійкості до антибіотиків від патогенних *Acinetobacter baumannii* до *E.coli* і *Proteus mirabilis*. Ефективна бактеріальна система перенесення генів стійкості до антибіотиків представлена IncQ – подібними плазмідами, що несуть нові гени із конструкцій з новою стійкістю, які передаються між *E.coli* та *Acinetobacter sp.* та іншими штамми бактерій.

Варто наголосити, що вбудовуються в рослини гени стійкості, «налагоджені» для експресії в еукаріотичних, а не бактеріальних клітинах. Крім того ці селективні гени взяті з природних популяцій мікроорганізмів, де вони наразі дуже поширені в результаті активного застосування антибіотиків в медичній практиці. Тому ймовірність потраплення гена стійкості до антибіотику в мікрофлору людини з природного резервуару є більш допустимою, ніж при вживанні генетично модифікованих рослин. Реальною «небезпекою», яку можна чекати від ГМО, де конститутивно експресується ген стійкості до антибіотику - це деяке зниження дози останнього в шлунку людини при одночасному його вживанні з трансгенною рослиною в сирому вигляді.

Додаток

Очевидно, що подібний ефект не завдасть істотної шкоди здоров'ю людини.

У більшості випадків маркерні гени стійкості до антибіотиків наразі замінюють на гени стійкості до гербіцидів. Запропоновано декілька способів вибіркової елімінації маркерного гена після отримання цільової трансгенної рослини. Дуже перспективною є можливість заміни селективних генів на репортерні при відборі трансгенних форм рослин, або використання альтернативних селективних генів, таких як гени синтезу фітогормонів чи гідролізу особливих форм полісахаридів при вирощуванні рослин на культуральному середовищі. Це до деякої міри зменшить небезпеку, пов'язану з генами стійкості до антибіотиків. Для оцінки харчових ризиків при створенні стійких до шкідників і патогенів ГМО необхідно визначити допустимий вплив трансгенних білків на організм, використовуючи як контроль традиційні сорти харчових культур. Принципову роль в таких оцінках відіграє інформація про механізм можливого впливу цих білків на людину і тварину.

Як правило, токсичну або алергенну дію мають трансгенні білки, що використовуються при створенні комерційних сортів харчових і кормових сортів і забезпечують стійкість рослин-реципієнтів до ураження різними видами комах, грибовими і бактеріальними патогенами. Ці білки мають набір специфічних властивостей. Серед них - такі властивості як

- ферментативна активність до найбільш мажорних компонентів клітинної стінки цільових організмів (наприклад, хітинази для комах і грибів);
- лектинова активність (лектини і арселіни), що опосередковує зв'язування з певними рецепторами і мембранними глікопротеїнами. В підсумку відбувається злипання клітин шлунково-кишкового тракту і порушується робота ферментів травлення комах-шкідників;
- інгібування рибосомальних білків (RIPs - білків), внаслідок чого порушується синтез нових білків клітинами, контактуючими з RIPs;
- інгібування травних функцій протеаз і амілаз цільових організмів;
- формування наскрізних каналів в клітинній мембрані (Сру-протоксини *Bacillus thuringiensis*, які активуються після протеолітичного розщеплення), що призводить до лізису атакованих цими поліпептидами клітин;
- проникнення у вигляді ферментів вихідного білка через стінки кишечнику і зв'язування з гангліозидами клітинних мембран (рослинні протоксини: уреази і канатотоксини), що спричинює екзоцитоз клітин різних типів, руйнування кров'яних пластинок і супроводжується загибеллю цільового організму.

Стійкість до патогенів і пестицидів формується завдяки експресії цих білків під дією тканеспецифічних промоторів в цільових тканинах і органах рослин. Наразі практично всі перелічені класи білків використовуються при створенні комерційних сортів харчових і кормових рослин. Трансгенні білки-лектини, які мають інсектицидну активність, були одними із перших трансгенів при забезпеченні стійкості до комах-шкідників. За їх дії відбувається злипання

Додаток

клітин шлунково-кишечного тракту і порушується робота травного тракту. Проте, відомі роботи, присвячені механізмам відповіді імунної системи людини на лектини, як потенційні алергени. Зокрема, лектини хлібного дерева і сої зв'язуються з імуноглобулінами, що призводить до злипання еритроцитів крові. Показано також вплив трансгенної картоплі, модифікованої лектином підсніжників: на гістологічному рівні - на слизову оболонку кишечника, часткову атрофію печінки і зміни тимуса крис, які утримувались на відповідній дієті, порівняно з контрольними, що харчувались не трансформованою картоплею, і на фізіологічному – на відносну масу їх внутрішніх органів.

До токсичності або алергенності трансгенних рослин застосовують жорсткі стандарти, як і для отриманих традиційним шляхом нових сортів культурних рослин або нових видів продуктів харчування. Слід зазначити, що алергія на продукти харчування досить поширене явище, яке невпинно зростає серед населення розвинених країн. В зв'язку з цим необхідно приділити пильну увагу характеристикам трансгенних білків, які мають інсектицидну активність, оскільки приблизно половина патогенез-залежних білків рослин є алергенами. Підвищений їх вміст, стійких до хвороб сортах рослин має прямий ризик підвищення алергенності продуктів харчування, що виготовлюється на основі цих сортів.

Проблема можливого негативного впливу ГМО на навколишнє середовище має декілька аспектів. По-перше, існує побоювання, що стійкі до гербіцидів культурні рослини можуть при міжвидовому запиленні передавати ці гени близькоспоріднених бур'янам, і спричинювати їх перетворення на невикорінні супербур'яни (superweeds). Хоча ймовірність цього для більшості сільськогосподарських культур невисока, генні інженери і вчені-аграрії активно розробляють підходи для виключення подібної небезпеки. При цьому ніякої екологічної катастрофи широке використання таких стійких сортів дотепер не викликало. Показано, наприклад, добру відповідність складу модифікованої сої, стійкої до поширеного гербіциду гліфосату і батьківського традиційного сорту.

Для відведення будь-яких ризиків від трансгенних рослин, вводять в рослини не один, а відразу декілька генів стійкості до різних гербіцидів. Передача декількох генів бур'янам набагато менш імовірна, ніж одного гена. Крім того, мультигербіцидна стійкість дозволяє чергувати різні гербіциди при обробці посівів, що не дасть можливості для поширення якого-небудь певного гена стійкості в бур'янах. Пропонується також вводити гени стійкості не в ядерний, а в хлоропластний геном, що може запобігти небажаному переміщенню генів за допомогою пилку, оскільки хлоропласти успадковуються тільки по материнській лінії. Заслуговує на увагу іще один генно-інженерний шлях боротьби з бур'янами без використання генів резистентності до гербіцидів. Цей шлях можна віднести біотрансгенних тому, що мова йде про використання дрібних тварин, наприклад, кроликів, для поїдання бур'янів на полях. При цьому, щоб відгородити від поїдання культурні рослини, в них вводять який-небудь ген, що робить їх непривабливими (запахом, смаком) для

Додаток

даної тварини. Широке застосування біотрансгенного підходу може зняти більшість висунутих наразі обмежень проти трансгенних культур.

Існують екологічні ризики, що стосуються трансгенних рослин з вбудованими "інсектицидними" генами, здатними, як вважають, провокувати у комах-шкідників виникнення масової резистентності. Запропоновані дієві способи для зменшення цієї небезпеки, наприклад, використання генів декількох різних токсинів і/або індукцибельних промоторів, які швидко активуються при ураженні рослини комахами.

Ще один небажаний наслідок використання трансгенних рослин з генами інсектицидів полягає в тому, що їх пилок може бути токсичним і для корисних комах. Деякі експериментальні дані засвідчують, що така небезпека дійсно існує, хоча про її можливі масштаби говорити зарано. Для вирішення цієї проблеми запропоновано використання трансгенезу через хлоропластну ДНК, або промоторів, які не працюють в пилку.

На початку ХХ ст. А. Пуанкаре писав, що в галузі наукових досліджень «будь-яке правове втручання буде недоречним і трохи безглуздим». Однак наступні події довели, що «найбезглуздіші» проекти здатні стати реальністю. Тому сьогодні стоїть питання про створення кодексу законів, що визначають безпеку і етику наукових досліджень.

У всіх державах на даний час прийняті закони та інші державні акти, які створюють нормативно-правову базу для сучасної біотехнології і біоінженерії. Здебільшого вони адаптовані до міжнародних вимог і правил, зафіксованих у документах ООН, ВОЗ, ЮНЕСКО та інших міжнародних організаціях.

Прийняті такі міжнародні документи, як *Всезагальна декларація з геному людини і прав людини*, міжнародна *Конвенція про біологічне різноманіття*, *Конвенція з прав людини та біомедицини*, *Конвенція з захисту прав і гідності людини у зв'язку з використанням досягнень біології та медицини*.

Натепер одним з найважливіших є питання про генетично модифіковані організми та про використання продуктів, одержаних на їх основі. Експерти вважають, що у зв'язку з їх безконтрольним розповсюдженням світове співтовариство може скоро зіткнутися з абсолютно новим видом тероризму. Тому все частіше лунають заклики до жорсткого контролю ГМ-продуктів. Різні вимоги, що висувуються в деяких країнах світу до ГМ-продуктів, і величезна різниця між посівними площами, які зайняті генетично модифікованими рослинами в різних регіонах, свідчить про те, що проблема є дуже далекою від остаточного вирішення. Світова динаміка росту площ під трансгенними культурами вражає своїм розмахом: з 1996 по 2003 р. вони зросли у 40 разів (з 1,7 до 67,7 млн. гектарів) (табл. 14). Лідерами є США, Аргентина, Канада. Світові продажі трансгенних рослин (в основному сої, бавовни, кукурудзи, рапсу) збільшились з 75 млн. доларів в 1995 р. до приблизно 8 млрд. доларів в 2005 р.

У 2004 р. в Аргентині було вироблено 34,5 млн. тонн генетично модифікованої сої, тобто 49,5% всіх вирощених тут зернових, а під їх посіви

Додаток

було зайнято 14 млн. га, тобто 54% всіх посівних площ країни. Таким чином, генетично модифікована соя стала основною сільськогосподарською культурою Аргентини. При цьому, якщо в США тільки 40% вирощуваної сої є трансгенною, то в Аргентині цей показник досягає 99%.

Потік продуктів, що містять трансгенні компоненти, який заповнив ринок в умовах неоднозначності результатів досліджень в області їх медичної і екологічної безпеки, ставить перед світовим співтовариством низку завдань. По-перше, необхідність глибокого аналізу і оцінки мотивів розробки, виробництва і використання генетично модифікованих продуктів харчування. По-друге, створення правової бази, що регламентує використання таких продуктів.

Таблиця 14.

Посівні площі в деяких країнах світу, зайняті трансгенними культурами

	Площа, млн.га	Генетично модифіковані рослини
США	54,6	Соя, кукурудза, бавовник, рапс (канола), папайя, люцерна
Аргентина	18,0	Соя, кукурудза, бавовник
Бразилія	11,5	Соя, бавовник
Канада	6,1	Канола, кукурудза, соя
Індія	3,8	Бавовник
Китай	3,5	Бавовник
Парагвай	2,0	Соя
Південна Африка	1,4	Кукурудза, соя, бавовник
Уругвай	0,4	Соя, кукурудза
Філіппіни	0,2	Кукурудза
Австралія	0,2	Бавовник
Румунія	0,1	Соя
Мексика	0,1	Бавовник, соя
Іспанія	0,1	Кукурудза
Колумбія	<0,1	Бавовник
Франція	<0,1	Кукурудза
Іран	<0,1	Рис
Гондурас	<0,1	Кукурудза
Чехія	<0,1	Кукурудза
Португалія	<0,1	Кукурудза
Німеччина	<0,1	Кукурудза
Словаччина	<0,1	Кукурудза

Додаток

Міжнародне співтовариство прийняло ряд документів, що визначають правила безпеки при роботі з генетично зміненими організмами. Це Картахенський протокол з біобезпеки до Конвенції про біологічне різноманіття (регулює переміщення ГМО), Декларація Ріо (визначає, що відповідність обґрунтування нешкідливості ГМ-продуктів лежить на виробнику продукції), документи Кодексу Аліментаріус та Комісії ООН з харчових стандартів (визначають стандарти для ГМ-продуктів), а також Директиви Європейського Парламенту і Ради (визначають методи оцінки загрози, правила моніторингу, а також умови, за яких видаються дозволи на випуск ГМО). Розробка і прийняття цих документів супроводжується запеклою боротьбою між виробниками ГМ-продуктів і прибічниками екологічної безпеки.

Міжнародна Конвенція про біологічне різноманіття, підписана 13 червня 1992 р. у Ріо-де-Жанейро, вказує на неприпустимість як заборони, так і повної відмови від регулювання виробництва і використання генетично модифікованих організмів. У Конвенції (ст. 19, п. 3) відзначається про необхідність застосування запобіжних заходів при використанні живих змінених організмів, однак самі заходи не конкретизуються. Таким чином, у цьому міжнародному документі передбачений, хоча і в «згорнутій» формі, правовий захист двох сторін - як виробників, так і споживачів ГМ-продуктів.

Різні країни світу при цьому неоднаковою мірою впроваджують у своє законодавство положення про запобіжні заходи і форми контролю за ГМ-продуктами. У США, наприклад, немає особливих законів, які б визначали критерії безпеки трансгенних продуктів. Для всіх продуктів харчування вони є загальними («Закон про харчові продукти і косметичні препарати»).

Одним з найбільш жорстких законодавств в області ГМ-продуктів є законодавство Євросоюзу. Так, Директива Європейського Парламенту і Ради від 23.04.1990 № 220/90 з випуску в природу генетично модифікованих організмів (ГМО) вимагає дозволу Державного секретаря ЄС з питань навколишнього середовища, транспорту і регіонів на будь-який випуск в навколишнє середовище ГМО - від однієї рослини в горщику до великомасштабного промислового виробництва. Ця процедура звернення за дозволом включає

- оцінку можливого ризику довкіллю;
- опис природи зміненого організму;
- опис походження і типів генних послідовностей, що переносяться;
- опис методики перенесення.

Тобто, цим документом передбачено захист двох груп інтересів - як виробників, так і споживачів (оцінка екологічного ризику).

Директива Європейського Парламенту і Ради від 27.01.1997 № 258/97 доповнюється докладною регламентацією оцінки медико-біологічної безпеки ГМО (моделі споживання, дослідження харчової цінності, алергічні і токсикологічні дослідження, здатність до зміни мікробіоценозу кишечника

Додаток

людини) і критеріїв їх технологічної оцінки (параметри виробництва, оцінка фізичних, хімічних і органолептичних властивостей).

Дослідницька група Кодекс Аліментаріус, перше засідання якої пройшло в 2000 р., відзначила необхідність додаткової оцінки медико-біологічної безпеки ГМ-продуктів з урахуванням метаболічних особливостей різних споживчих груп (діти, вагітні, годуючі матері, люди похилого віку, пацієнти, що страждають на цукровий діабет), а також необхідність довгострокових «хронічних недуг».

Директива Європейського Парламенту і Ради від 12.03.2001 № 18/2001 розширила критерії оцінки екологічної безпеки ГМ-рослин насамперед для захисту споживачів, включенням в число критеріїв оцінку їх впливу на природних мешканців сільськогосподарських земель; оцінку можливого впливу на фермерів і робітників, зайнятих у сільському господарстві; оцінку впливу на біогеохімічні процеси та ін.

Директивою Європейського Парламенту і Ради від 22.09.2003 № 1829/2003 про генетично модифіковані продукти і корми введено з квітня 2004 р. нові правила маркування ГМ-продуктів у країнах Євросоюзу. Маркуванню підлягає вся харчова продукція, отримана з використанням ГМ-продуктів в разі їх вмісту більше 0,9%.

Всесвітня торговельна організація (ВТО) 7 лютого 2006 р. зробила заяву, що Євросоюз наклав мораторій на використання ГМ-рослин і ГМ-продуктів з порушенням торговельних норм. ВТО також ухвалила, що шість окремих країн, серед яких Франція і Австрія, порушили правила, введенням своїх власних заборон на торгівлю та імпорт ГМ-продуктів. Скаргу у ВТО на Євросоюз подали США, Канада і Аргентина.

Законодавча база України з біобезпеки та її реалізація

Основними принципами державної політики в галузі генетично-інженерної діяльності та поводженні з генетично модифікованими організмами на сучасному етапі в Україні є

- пріоритетність збереження здоров'я і охорони навколишнього природного середовища, порівняно з економічними перевагами від застосування ГМО;
- забезпечення заходів щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях;
- контроль за ввезенням на митну територію України ГМО та продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом;
- загальнодоступність інформації про потенційні ризики від застосування ГМО, які передбачається використовувати у відкритій системі, та заходи щодо дотримання біологічної та генетичної безпеки;

Додаток

- державна підтримка генетично-інженерних досліджень та наукових і практичних розробок у галузі біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях.

Регулювання поводження з ГМО здійснюється відповідно до законів України

- Закон України «Про дитяче харчування» від 14.09.2006 р.;
- Закон України «Про захист прав споживачів» в редакції від 01.12.2005 р.;
- Закон України «Про якість та безпеку харчових продуктів та продовольчої сировини» в ред. від 06.09.2005 р.;
- Закон України «Про пріоритетні напрями інноваційної діяльності в Україні» в ред. від 09.02.2006 р.;
- Закон України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» в ред. від 07.02.2002 р.;
- Закон України «Про основи національної безпеки України» в ред. від 15.12.2005 р.;
- Закон України «Про захист населення від інфекційних хвороб» від 09.02.2006 р.;
- Закон України «Про тваринний світ» 13.12.2001 р.;
- Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р.

Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р. регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами генетично модифікованих організмів і продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорт, експорт, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної і генетичної безпеки.

Водночас цей Закон не застосовується до людини, тканин та окремих клітин у складі організму людини.

Закон має виконувати такі завдання: охорона здоров'я людини і навколишнього природного середовища при здійсненні генетично-інженерної діяльності та поводженні з ГМО; забезпечення права громадян на безпечне використання ГМО; створення умов для безпечного практичного використання ГМО в господарських цілях; визначення прав і обов'язків суб'єктів регулювання при поводженні з ГМО та встановлення їх відповідальності за порушення законодавства; захист громадян у разі заподіяння шкоди їх здоров'ю, внаслідок споживання ГМО; встановлення правових основ міжнародного співробітництва в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО.

Додаток

Положення Закону застосовуються на території України до юридичних та фізичних осіб, які здійснюють діяльність, пов'язану з ГМО. Юридичні та фізичні особи України та інших держав, а також особи без громадянства рівні у своїх правах та обов'язках, визначених Законом. Якщо міжнародним договором України встановлено інші правила, ніж передбачені цим Законом, то застосовуються правила міжнародного договору.

Закон містить визначення біологічної та генетичної безпеки, зокрема: біологічна безпека - це стан середовища життєдіяльності людини, при якому відсутній негативний вплив його чинників (біологічних, хімічних, фізичних) на біологічну структуру і функцію людської особи в теперішньому і майбутніх поколіннях, а також відсутній незворотний негативний вплив на біологічні об'єкти природного середовища (біосферу) та сільськогосподарські рослини і тварини; генетична безпека - це стан середовища життєдіяльності людини, за якого відсутній будь-який неприродний вплив на геном людини і будь-який неприродний вплив на геном об'єктів біосфери, а також відсутній неконтрольований вплив на геном сільськогосподарських рослин і тварин, промислових мікроорганізмів, який призводить до появи у них негативних та/або небажаних властивостей (ст. 1).

Регулюванню Законом підлягають:

1. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі. *Закрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, при якій генетичні модифікації вносяться в організм або ГМО, культивуються, обробляються, зберігаються, використовуються, підлягають транспортуванню, знищенню або похованню в існуючих умовах систем захисту, що запобігають контакту з населенням та навколишнім середовищем.

2. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у відкритій системі. *Відкрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт ГМО з населенням та навколишнім середовищем при запланованому вивільненні їх у навколишнє середовище, застосуванні у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сферах обігу ГМО.

3. Державна реєстрація ГМО та продукції, виробленої з їх використанням. *Державна реєстрація ГМО* - це занесення ГМО до реєстру з урахуванням оцінки їх ризику щодо впливу на здоров'я людини та стан навколишнього природного середовища з метою подальшого отримання дозволу на практичне використання ГМО в Україні відповідно до їх господарського призначення.

Згідно з чинним законодавством України розрізняють

- *державний реєстр ГМО* - це спеціалізований перелік ГМО, які пройшли реєстрацію, з визначенням їх подальшого господарського призначення;
- *державний реєстр ГМО джерел харчових продуктів та кормів* — спеціалізований перелік ГМО, щодо яких на підставі міжнародних правил і критеріїв оцінки безпечності для здоров'я людини і тварин

Додаток

зроблено висновок про можливість їх використання як харчових продуктів та/або кормів, та/або їх джерел.

4. Введення в обіг ГМО та продукції, виробленої з їх використанням; експорт, імпорт і транзит ГМО. Обіг ГМО - це переміщення (транспортування) або зберігання та будь-які дії, пов'язані з переходом права власності чи володіння, включаючи продаж, обмін або дарування.

Забезпечення виконання Закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» покладено на центральні органи виконавчої влади у межах повноважень і в порядку, передбаченому законодавством України, зокрема на Кабінет Міністрів України (ст. 7), центральний орган виконавчої влади з питань освіти і науки (ст. 8), центральний орган виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів (ст. 9), центральний орган виконавчої влади з питань охорони здоров'я (ст. 10), центральний орган виконавчої влади з питань аграрної політики (ст. 11).

Порушення вимог зазначеного Закону і прийнятих на його основі нормативно-правових актів тягне за собою цивільну, адміністративну, дисциплінарну або кримінальну відповідальність згідно із законом.

Відповідальність несуть особи, які винні у

- приховуванні або перекрученні інформації, що може спричинити або спричинило загрозу життю та здоров'ю людини чи навколишньому природному середовищу;
- недотриманні або порушенні вимог стандартів, регламентів, санітарних норм і правил використання, транспортування, зберігання, реалізації ГМО;
- використанні незареєстрованих ГМО або продукції, отриманої з їх використанням (за винятком науково-дослідних цілей);
- порушенні правил утилізації та знищення ГМО;
- невиконанні законних вимог посадових осіб, які здійснюють державний нагляд і контроль.

Законом може бути встановлена відповідальність і за інші види порушень законодавства України в галузі генетично-інженерної діяльності.

У Статті 2. «Законодавство України в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО» Закону України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» визначено, що законодавство України у сфері генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО складається з цього Закону, інших законодавчих актів України, які видаються відповідно до нього, а також відповідних міжнародних договорів, згоду на обов'язковість яких надано Верховною Радою України.

Правове регулювання в сфері поводження з генетично зміненими організмами виконується також згідно до постанов Кабінету міністрів України. До них належать

Додаток

– Постанова Кабінету міністрів України від 24 лютого 2010 р. № 279-р «Деякі питання дослідження продукції, яка містить генетично модифіковані організми або отримана з їх використанням»;

– Постанова Кабінету міністрів України від 23 липня 2009 р. № 808 «Деякі питання проведення апробації (випробування) та реєстрації генетично модифікованих організмів сортів сільськогосподарських рослин»;

– Постанова Кабінету міністрів України від 21 листопада 2007 р. № 1330 «Питання маркування сільськогосподарських товарів, вироблених із застосуванням генетично модифікованих організмів»;

– Постанова Кабінету міністрів України від 1 серпня 2007 р. № 985 «Питання обігу харчових продуктів, що містять генетично модифіковані організми та/або мікроорганізми»;

– «Порядок видачі дозволу на проведення державної апробації (випробування) генетично модифікованих організмів у відкритій системі» затверджений Постановою Кабінету міністрів України від 2 квітня 2009 р. № 308;

– «Порядок державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням» затверджений Постановою Кабінету міністрів України від 18 лютого 2009 р. № 114;

– Постанова Кабінету міністрів України від 18 лютого 2009 р. № 114 «Про затвердження Порядку державної реєстрації генетично модифікованих організмів джерел харчових продуктів, а також харчових продуктів, косметичних та лікарських засобів, які містять такі організми або отримані з їх використанням»;

– Постанова Кабінету міністрів України від 16 жовтня 2008 р. № 922 «Про затвердження тимчасових критеріїв безпеки поводження з генетично модифікованими організмами та провадження генетично-інженерної діяльності у замкненій системі».

КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ

1. У чому сутність поняття «біологічна безпека»?
2. Сучасні джерела біологічної небезпеки.
3. Визначте місце біотехнології в питаннях біобезпеки.
4. Які міжнародні документи створюють нормативно-правову базу для сучасної біотехнології і біоінженерії?
5. Наведіть дані по розширенню посівних площ трансгенних культур у світі.
6. Які питання розглядає міжнародна Конвенція про біологічне різноманіття?
7. Законодавча база України з біобезпеки.

Додаток

8. Назвіть основні принципи державної політики в галузі генетично-інженерної діяльності в Україні?
9. Розгляньте можливості і перспективи застосування генетично модифікованих організмів (ГМО) в Україні і у світі.
10. Чому сучасні технології створення ГМО слугують джерелом біологічних і екологічних ризиків?
11. У чому полягає перспектива появи супербур'янів і суперстійких комах?
12. Дайте пояснення поняття «відстрочена дія ГМ-рослин».

Додаток

ДОДАТОК

Приготування розчинів

Розчин	Метод приготування.
5 М ацетат калію рН 4,8	До 60 мл 5М ацетату калію додають 11,5 мл льодяної оцтової кислоти та 28,5 мл дистильованої Н ₂ О. Концентрація калію в цьому розчині складає 3М, а концентрація ацетату - 5М.
1 М тріс·НCl рН 7,6	Розчиняють 121,1 тріс·НCl в 800 мл Н ₂ О і доводять до потрібного значення рН, додаючи 60 мл концентрованої НCl.
10% додецилсульфат натрію (SDS)	100 г електрофоретично чистого SDS розчиняють, нагрівають до 68°С для прискорення розчинення. Доводять рН до 7,2 при додаванні декількох крапель концентрованої НCl. Загальний об'єм розчину складає 1 л.
0,5М ЕДТО рН 8,0	186,1 г ЕДТО·2Н ₂ О розчиняють в 800 мл Н ₂ О при інтенсивному розмішуванні на магнітній мішалці до повного розчинення. Доводять рН розчину до 8,0 за допомогою NaOH (~20 г NaOH) і автоклавують .
Бромистий етидій, 10мг/мл	1г бромистого етидію розчиняють в 100 мл Н ₂ О за допомогою магнітної мішалки, перемішуючи протягом декількох годин. Зберігають в посудині з темного скла в холодильній камері при температурі +4°С.
Трихлороцтова кислота (ТХО), 100% розчин	500 г ТХО розчиняють в 227 мл Н ₂ О. Концентрація ТХО в такому розчині становить 100% (вага/об'єм).
Ампіцилін	25 мг/мл натрієвої солі ампіциліну розчиняють в дистильованій воді, стерилізують за допомогою бактерицидного фільтра і зберігають в морозильній камері при температурі -20°С. Робоча концентрація розчину становить 35-50 мкг/мл.
Буфер TE рН 8,0	Готують буфер при змішуванні 10 мМ тріс·НCl, рН 8,0; 1 мМ ЕДТО, рН 8,0.
Буфер STE (TNE)	Змішують 10 мМ тріс·НCl, рН 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ ЕДТО, рН 8,0.
Середовище LB (Luria-Bertani)	Бакто-триптон – 10 г; бакто-дріжджовий екстракт – 5 г; NaCl – 10 г розчиняють в 1 л дистильованої води і доводять рН розчину до 7,5 з допомогою 1N NaOH.
Лізоцим	50 мг лізоциму розчиняють в 50 мл дистильованої Н ₂ О, розливають в мікропробірки на аліквоти і

Додаток

	зберігають при температурі – 20° С.
Фосфатний буфер	На 1 л буферу необхідно взяти 108 г тріс·НСІ, рН 8,0; 15,1 мл 85 % фосфорної кислоти (1,679 мг/мл); 40 мл 0,5М ЕДТО, рН 8,0.
ТАЕ-буфер	Розчиняють 242г тріс·НСІ рН 7,6 в 500мл дистильованої води і додають 57,1мл льодяної оцтової кислоти, 100 мл 0,5М ЕДТО. Загальний об'єм розчину доводять до 1 л - рН розчину 8,0.

Словник ключових термінів

- Агар-агар** – полісахаридний препарат, який одержують з деяких червоних і бурих морських водоростей. Складається з агарози і агаропектину та є найкращим гелеутворювачем для приготування живильних середовищ.
- Адвентивні бруньки** – бруньки на рослинах, які виникають із клітин і тканин, що зазвичай їх не утворюють.
- Алелі** – гени, які займають однакові місця в гомологічних молекулах ДНК і виконують подібні функції.
- Ампліфікація** – утворення додаткових копій хромосомних послідовностей, які можна виявити в хромосомній або не хромосомній ДНК.
- Андрогенез** – процес виникнення рослини із мікроспори або пилку через соматичний ембріогенез або через утворення калюсу.
- Анеуплоїд** – ядро, клітина, організм з числом хромосом (X), яке відхиляється від нормального каріотипу (X) і від чисел, кратних X .
- Антигени** – білки, які індукують утворення в імунній системі антитіла (імуноглобуліну), здатного до специфічної взаємодії з ними.
- Апекс** – верхівкова частина стебла або кореня.
- Апікальне домінування** – явище пригнічення росту верхівкових бруньок бічних пагонів фітогормонами, які утворюються в апікальній меристемі.
- Ауксини** – фітогормони (ІОК, НОК, 2,4Д), які активують ріст стебел і коренів, стимулюють утворення коренів у проростків.
- Бактеріофаги (фаги)** – віруси, які інфікують бактерії і здатні розмножуватись тільки в бактеріальних клітинах. Фаги широко використовують як вектор при конструюванні рекомбінантних ДНК.
- Бібліотека геному** – набір клонованих фрагментів ДНК, які містять весь геном.
- Біобезпека** – стан захищеності людини, суспільства, цивілізації і навколишнього середовища від шкідливої, небезпечної для життя і здоров'я людини дії токсичних і алергенних біологічних речовин і сполук, які містяться в природних або генно-інженерно модифікованих біологічних об'єктах і одержаних із них продуктах.
- Блоттинг-гібридація** – метод аналізу геному еукаріот, який у поєднанні із технологією клонування дає змогу встановити присутність у певному гені сайтів рестрикції, а також кількість копій цільових генів в геномі.
- Блоттинг ДНК по Саузерну** – процедура перенесення денатурованої ДНК із агарозного геля на нітроцелюлозний фільтр для гібридації з комплементарними нуклеотидними послідовностями.

Список ключових термінів

- Блоттинг РНК по Нозерну** – перенесення РНК із агарозного геля на нітроцелюлозний фільтр для подальшої гібридизації з комплементарною ДНК.
- Вектор** – молекула ДНК, що має здатність до автономної реплікації в клітині-реципієнті, і використовується в генній інженерії для перенесення генів та інших послідовностей від організму донору в організм-реципієнт, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.
- Вектор для клонування** – будь-яка плазміда або бактеріофаг, в які може бути вбудована чужорідна ДНК з метою клонування.
- Вертикальне перенесення генів** – перенесення генетичної інформації від клітини чи організму до потомства за допомогою звичайних генетичних механізмів.
- Гаплоїд** – ядро, клітина, організм, які характеризуються одинарним набором хромосом, що представляє половину повного набору властивого виду і позначається літерою *n*.
- Ген** – одинарна структура генетичної інформації; ділянка хромосоми (молекули ДНК), яка кодує структуру одного або декількох поліпептидних ланцюгів, або молекул РНК, чи певну регуляторну функцію.
- Ген (цитрон)** – фрагмент ДНК, що бере участь в утворенні поліпептидного ланцюга, а до його складу входять ділянки, які розміщені перед і після кодуєчої послідовності, а також інерційні послідовності.
- Генетичний код (ГК)** – система запису спадкової інформації у вигляді послідовності нуклеотидів в молекулах нуклеїнових кислот. Одиницею ГК слугує кодон, або триплет (тринуклеотид). ГК визначає порядок включення амінокислот до синтезованого поліпептидного ланцюга.
- Геном** – сукупність генів (ядерних елементів генетичної конституції організму) в гаплоїдному (одинарному) наборі хромосом даного організму; гаплоїдний набір хромосом з локалізованими в ньому генами. В більш широкому розумінні це сукупність ядерних елементів генетичної конституції організму.
- Генотип** – конкретний набір генів організму.
- Генофонд** – сукупність генів популяції.
- Гібереліни** – фітогормони (гіберелова кислота та ін.) активізують ріст стебел, викликають проростання насіння.
- Гібридизація** – процес взаємодії комплементарних ланцюгів РНК і ДНК, які утворюють гібридну молекулу РНК-ДНК.
- Гіногенез** – процес рененації рослини із клітин зародкового мішка маточки.
- Гомозиготність** – відсутність відмін між ідентичними генами батьків.

Список ключових термінів

Горизонтальне перенесення генів – механізм передавання генів між одночасно існуючими організмами.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих (нездатних до поділу) клітин до проліферації тобто утворення недиференційованих, здатних до поділу калюсних клітин і неорганізованого калюсного росту – втраті спеціалізації клітинами.

Делеція – мутація (тип хромосомної перебудови), що призводить до втрати одного і більше нуклеотидів.

Денатурація ДНК або РНК – перехід молекул із дволанцюгової форми в одноланцюгову.

Державне регулювання генно-інженерної діяльності – регулювання державними органами у відповідності з законами та іншими правовими актами відношень між учасниками генно-інженерної діяльності в сфері розробки і використання транс генних технологій, організмів і продуктів їх життєдіяльності для ефективного природокористування, охорони навколишнього середовища і забезпечення екологічної безпеки.

Диплоїд – ядро, клітина, організм, які характеризуються подвійним набором гомологічних хромосом, представлених числом характерним для даного виду (символ $2n$).

Диференціація – комплекс процесів, що призводять до відміни між дочірніми клітинами, а також між материнськими і дочірніми клітинами.

Диференціювання – стан спеціалізації клітин, який відрізняє їх від інших.

ДНК – молекула дезоксирибонуклеїнової кислоти, яка складається із нуклеотидів (аденін, тимін, гуанін, цитозин), дезоксирибози і залишків фосфорної кислоти.

ДНК комплементарна – штучно синтезована за допомогою зворотної транскриптази (ревертази) і ДНК-полімерази копія іРНК, яка кодується певним безінтронним геном.

ДНК рекомбінантна – макромолекула, утворена в процесі сполучення генів у новій комбінації.

Домінантний ген – ген, що пригнічує дію гена подібного собі і проявляється як ознака за умови коли гомологічні набори мають різні гени.

Експлантат – фрагмент тканини або різних органів вищих рослин, який культивується на живильному середовищі самостійно або використовується для отримання первинного калюсу.

Експресія гена – прояв генетичної інформації, записаної в гені (ДНК), в формі рибонуклеїнової кислоти, білка і фенотипної ознаки шляхом транскрипції і трансляції.

Список ключових термінів

- Електропорація** – метод перенесення генів в клітини за допомогою електричного розряду, який викликає утворення пор в клітинній мембрані.
- Електрофорез** – рух частинок (іонів, заряджених або амфотерних молекул) в електричному полі. На основі електрофорезу розроблені методи розділення речовин, які відрізняються за своєю рухомістю в електричному полі.
- Ембріоїдогенез** – процес утворення зародкоподібних структур (ембріоїдів) не статевим шляхом в культурі тканин і клітин *in vitro*.
- Епігенетичні варіації** – фенотипний прояв диференціальної активності генів. Від мутацій і соматоклональних варіантів відрізняються не спроможністю до збереження в циклі клітина – рослина – клітина.
- Еуплоїд** – ядро, клітина, організм з числом хромосом кратним X .
- Живильне середовище** – багатокомпонентна система, що містить набір мінеральних солей, амінокислот, вітамінів, моно- або дицукри.
- Зигота** – запліднена яйцеклітина.
- Злиття ізольованих протопластів** – формування одної клітини із двох і більше шляхом об'єднання їх поверхневих мембран.
- Ізольований протопласт** – рослинна клітина без клітинної оболонки, яка руйнується за допомогою ферментативного або механічного способу.
- Імобілізація** – Фіксація низькомолекулярних ліганд, макромолекул, клітинних органел і клітин на певному носії.
- Інокулюм** – частина клітинної суспензії, яка використовується для перенесення в свіже живильне середовище.
- Інтрон** – «мовчазна», транскрибуємо ділянка гена, не містить кодонів і видаляється із молекули ДНК при її процесингу.
- Калюс** – група дедиференційованих клітин, які виникають *in vivo* або *in vitro*, шляхом неорганізованої проліферації
- Калюсна тканина** – тканинне новоутворення у рослин в місцях пошкодження, при якому клітини проходять стадію диференціювання.
- Каріотип** – кількість і морфологія галоїдного набору хромосом клітини організму, характерного для даного виду.
- Клон** – велика кількість клітин або молекул, ідентичних одній родоначальній клітині або молекулі. Культура, яка виникла із однієї клітини.
- Клональне мікророзмноження** – одержання *in vitro* соматичним (нестатевим) шляхом рослин, генетично ідентичних вихідній рослині.
- Клонування організмів** – одержання генетично ідентичних популяцій організму.

Список ключових термінів

- Кодон** – триплет нуклеотидів, які кодуєть утворення певної амінокислоти і відповідний термінуючий сигнал; одиниця генетичної структури гена, яка кодує положення однієї амінокислоти в молекулі білка.
- Компетенція** – здатність клітини, тканини, органа, організму до сприйняття індукованої дії і специфічної реакції на неї зміною розвитку.
- Комплементарність** – явище взаємного доповнення відповідних одна одній хімічних структур (молекул, радикалів), яке забезпечує зв'язок між ними на основі їх властивостей.
- Комплементарний ланцюг** – один із ланцюгів ДНК, що використовується як матриця для синтезу РНК і відповідає їй за взаємодією пар нуклеотидів.
- Кросинговер** – обмін матеріалом між гомологічними хромосомами, який відбувається в процесі мейозу і лежить в основі генетичної рекомбінації.
- Культура ізольованих протопластів** – вирощування клітин без клітинних оболонок в рідкому або на агаризованому живильному середовищі, яке містить як додатковий компонент осмотично активну речовину (стабілізатор) в оптимальній для даного виду концентрації. При регенерації клітинних стінок ізольовані протопласти перетворюються в культуру клітин.
- Культура коренів *in vitro*** – асептичне вирощування на штучному живильному середовищі в режимі пересаджування ізольованих коренів.
- Культура меристем** – асептичне вирощування на живильних середовищах із ізольованого апекса або пазушної бруньки пагона конуса наростання з одним або двома листовими примордіями.
- Культура одиночних клітин** – вирощування одиночних клітин при низькій густоті посіву на збагачені живильні середовища з допомогою культури - «няньки» або живильного шару.
- Культура пухлинних тканин** – довготривале вирощування тканин, які були ізольовані із рослинних пухлин різного походження, вільні від патогенів, які індукували розвиток пухлини.
- Культура «звиклих» тканин** – вирощування тканин, які виникли шляхом редиференціації або мутації клітин нормальних калюсних тканин і здатних рости на без гормональних живильних середовищах.
- Лігаза** – фермент, який доповнює розриви в молекулі ДНК утворенням ковалентних зв'язків між 5' - і 3' -кінцями.
- Лізис** – руйнування бактеріальних клітин в кінці фагового інфекційного циклу і вихід зрілих фагових частин.

Список ключових термінів

Лігування – утворення фосфодієфірного зв'язку між двома основами одного ланцюга ДНК, розділеного розривом. Цей термін вживають також у випадку з'єднання тупих кінців і при утворенні зв'язку в РНК.

Лінія – культура, яка виникла із штаму клітини (або мікроорганізму) шляхом селекції або клонування і має маркерні ознаки.

«Липкий кінець» - вільний одноланцюговий кінець дволанцюгової ДНК, комплементарний одноланцюговому кінцю, який належить до цієї ж або іншої молекули ДНК.

Маркер (ДНК) – фрагмент ДНК відомого розміру, який використовується для калібрування фрагментів в електрофоретичному гелі.

Маркерний ген – ген, ідентифікований за місцем розміщення і має чіткий фенотиповий прояв.

Маркування продуктів із ГМО – нанесення спеціальних міток-позначень (символів) на упаковку товарів і продуктів, одержаних із ГМО і продуктів їх переробки при реалізації.

Меристема – утворювальна тканина з активним поділом клітин, яка зберігає здатність до поділу клітин в культурі *in vitro*, завдяки чому відбувається ріст і утворення органів рослин.

Меристема апікальна – верхівкова меристема пагона або частина кореня, розміщена близько точки росту.

Метаболізм – проміжний обмін, тобто перетворення речовин усередині клітин з моменту їх поступання до утворення кінцевих продуктів.

Моноплоїд – ядро, клітина, організм, які характеризуються основним числом хромосом в поліплоїдій серії (символ X).

Морфогенез – процес формування органів (органогенез), тканин (гістогенез) і клітин (цитогенез) або клітинне диференціювання.

Мутагенез – процес виникнення спадкових змін-мутацій. Умовно розрізняють природний (спонтанний) та штучний мутагенез.

Мутагени – фактори, які збільшують частоту виникнення мутацій, викликаючи зміни в ДНК.

Мутація – спонтанна або індукована зміна гена, послідовності нуклеотидів хромосоми, геному, що призводить до зміни тих або інших ознак і збереження їх в потомстві.

Незамінні амінокислоти – амінокислоти, які не синтезуються в організмі людини і тварин.

Органогенез – процес утворення і розвитку зачатків органів листків, стебел, пагонів, коренів та інших органів в недиференційованій ростучій масі калюсних клітин, а також з експлантатів *in vitro*.

Список ключових термінів

- Партеногенез** – форма статевого розмноження і розвиток організму з яйцеклітини без запліднення й утворення насіння.
- Плазмїда** – невелика, кільцева, одноланцюгова молекула ДНК, яка має здатність до автономної реплікації, а також до вбудовування в неї і передачі в геном реципієнта чужорідних генів та інших послідовностей ДНК.
- Полїплоїд** – ядро, клітини, організми, які характеризуються збільшеним основним числом хромосом (символ $3X$, $4X$ та ін.).
- Пролїферація** – новоутворення клітин і тканин шляхом розмноження уже існуючих.
- Промотор** – ділянка гена, відповідальна за початок його транскрипції.
- Профаг** – фаговий геном інтегрований в бактеріальну хромосому.
- Псевдодиплоїд** – ядро, клітина, організм, які характеризуються диплоїдним числом хромосом, що відрізняються від зигот даного виду за каріотипом.
- ПЦР** – полімеразна ланцюгова реакція. Ефективна для діагностики мікоплазменних контамінацій культури клітин.
- Регенерація** – процес утворення цілої рослини з однієї клітини або калюсної культури.
- Регулятори росту рослин** – фізіологічно активні речовини, які стимулюють або гальмують процеси росту і розвитку рослин.
- Редиференціація** – перехід спеціалізованих клітин із одного стану диференціювання в інший з попередніми поділами або безпосередньо.
- Рекомбінація** – перерозподіл генетичного батьківських компонентів рослин, яке призводить до спадкової комбінативної мінливості. На молекулярному рівні результатом рекомбінації є утворення рекомбінантних (гібридних) ДНК.
- Реплікація ДНК** – біосинтез дочірніх ланцюгів ДНК на вихідній матриці, що забезпечує точне відтворення генетичної інформації.
- Рестриктази** – ферменти, які розпізнають специфічні нуклеотидні послідовності і спричинюють розщеплення обох ланцюгів ДНК в сайтах, що мають симетрію другого порядку відносно центру.
- Рецесив** – ген або генетично обумовлена ознака, яка проявляється в диплоїдній клітині або організмі за умови, що обидва набори хромосом несуть зазначені гени.
- Ризогенез** – процес закладання, росту і розвитку коренів.
- Ростовий цикл** – ріст популяції клітин в циклі періодичного вирощування, який характеризується сигмовидною (S-подібною) кривою. Фази ростового

Список ключових термінів

циклу: латентна, експоненціальна, уповільнення росту, стаціонарна, деградації.

Сайт-ділянка – нуклеотидна або амінокислотна послідовність у нуклеїновій кислоті чи білку.

Секвенування – визначення нуклеїнової послідовності ДНК та РНК.

Селективне середовище – культуральне середовище, яке забезпечує ріст і розмноження гібридних та загибель вихідних батьківських клітин.

Сомаклони – рослини-регенеранти, одержані із будь-яких форм вегетативних (соматичних) культивованих клітин і мають певні відміни від вихідних форм.

Сомаклональна варіабельність (мінливість) – розмах коливань у відмінах ознак у рослин, регенованих із культивованих соматичних клітин.

Сомаклональні варіації та варіанти – фенотипний прояв непостійності ядерного та цитоплазматичного геномів клітин, які культивуються *in vitro*. Від генних мутацій відрізняються більшою частотою виникнення та комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

Соматична (парасексуальна) гібридизація – процес одержання гібридних клітинних ліній, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводить до появи гібридних клітинних ліній і соматичних гібридів рослин.

Соматичний гібрид – рослина - регенерант, одержана шляхом гібридизації соматичних клітин.

Соматичний ембріогенез – процес утворення зародкоподібних структур (ембріодів) в культурі соматичних клітин і тканин.

Стресові білки – спеціалізовані білки, які синтезуються організмом в несприятливих умовах і дозволяють знижувати шкідливу дію стресових факторів на організм. Наприклад, білки теплового шоку (БТШ) або холододового шоку (БХШ).

Субкультивування – перенесення трансплантатів або інокулюма в іншу культуральну посудину на свіже живильне середовище.

Субпротопласт – ізольований протопласт, що втратив частину цитоплазми і зберіг ядро.

Суспензійна культура – суспензія клітин або їх агрегатів (невеликих груп) у зв'язаному стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію і перемішування.

Тотипотентність – властивість соматичних рослинних клітин повністю реалізувати свою спадкову програму онтогенетичного розвитку за певних умов вирощування, аж до утворення дорослих рослин і насіння.

Список ключових термінів

- Трансгенез** – процес перенесення донорських, чужорідних генів в клітини реципієнтних рослин, тварин і мікроорганізмів за допомогою різних векторів.
- Трансгенні, генетично модифіковані організми (ГМО)** – рослини, тварини, мікроорганізми і віруси зі зміненою спадковістю, викликаною включенням в їх геном чужорідних генів за допомогою генно-інженерних методів.
- Транскрипція** – утворення матричної РНК-копії ДНК за допомогою ферменту РНК-полімерази. Перший етап реалізації генетичної інформації, передача її з ДНК-матриці на РНК.
- Трансляція** – синтез білка на рибосомах за участю інформаційної, транспортної РНК та інших факторів. Переведення генетичної інформації з нуклеотидного коду, записаного в молекулах мРНК, в певну послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу синтезованого білка.
- Трансплантат (інокулюм)** – частина калюсної (суспензійної) культури, яка використовується для пересадження на свіже живильне середовище.
- Трансформація** – передавання нової генетичної інформації в клітину-реципієнт від клітини-донора за допомогою ДНК.
- Фенотип** – сукупність зовнішніх ознак організму, яка визначається генотипом в умовах вирощування.
- Фітогормони (гормони рослин)** – біологічно активні сполуки, які утворюються в рослинах в невеликих кількостях, і викликають специфічний ростовий або формоутворюючий ефект.
- Хромосоми** – генетичні структурні утворення ядра клітини, які складаються із ДНК і білків. В хромосомах міститься спадкова інформація організму.
- Химери** – організм або його частина, яка складається із генетично різнорідних ділянок тканин або клітин.
- Холодочуттєвий мутант** – організм, який не здатний до розвитку за низьких температур.
- Цибрид** – гібрид, отриманий при злитті ізольованого протопласта з цитопластом (протопласт з інактивованим ядром або з енукліюваним протопластом).
- Цикл вирощування (пасаж)** – період від розміщення клітинного інокулюму або калюсного трансплантату на живильне середовище до наступного субкультивування.
- Цитокініни** – фітогормони (кінетин, 6-БАП, аденін), які активізують розвиток меристем, стимулюють утворення бруньок.

Список ключових термінів

- Цитоплазматична спадковість** – позаядерна спадковість, характерна для ознак, які визначаються за генами мітохондрій (хондром), хлоропластів (пластом) та інших позаядерних органодів.
- Цитопласт** – обмежена мембранами ділянка цитоплазми, яка виникла при фрагментації ізольованого протопласта.
- Час генерації клітин** – інтервал між послідовними клітинними поділами.
- Час подвоєння популяції** – інтервал часу, за який число клітин в популяції подвоюється вдвоє.
- Чисті лінії** – організми, гомозиготні за досліджуваними ознаками.
- Штам** – культура, яка виникла після першого субкультивування і складається із багатьох клітинних ліній, що виникли із клітин первинного калюсу.
- Ювенільна фаза розвитку** – період закладання росту і розвитку вегетативних органів від проростання насіння або вегетативної бруньки до початку утворення репродуктивних органів.
- АТТ-сайти** – ділянки фагової і бактеріальної хромосом, рекомбінація між якими призводить до інтегрування або виключення фага.
- СААТ** – ділянка консервативної послідовності розміщена на відстані приблизно 75 пар нуклеотидних основ перед стартовою точкою в транскрипційних одиницях еукаріот.
- G-білки** – регуляторні білки, які активують фермент, синтезуючий вторинний посередник.
- Ex vivo** – одержання ізольованих клітин, виправлення в них генетичного дефекту за допомогою перенесення потрібного гена, нарощування «виправлених» клітин.
- In situ** – Збереження культивованих видів в тому середовищі, в якому вони набули свої відмінні властивості.
- In vitro** – вирощування рослинних об'єктів на штучних живильних середовищах в асептичних умовах.
- In vivo** – вирощування живого матеріалу в природних умовах.

Історичні віхи розвитку біотехнології

8000 років до н.е.

Жителі Середньої Азії використовують дикі рослини і одомашнюють диких тварин для виробництва продуктів харчування.

5000 років до н.е.

У Китаї та Єгипті проводять відбір насіння більш врожайних рослин для посіву на майбутній рік для збору вищих врожаїв.

4000 років до н.е.

Зародження виноробства і початок застосування біотехнології для закваски тіста та бродіння пива в Стародавньому Єгипті.

3000 років до н.е.

Народи Південної Америки починають вирощувати картоплю як одну із основних сільськогосподарських культур.

2000 років до н.е.

Самаритяни опановують процес бродіння і використовують його в сирі- та пивоварінні.

1000 років до н.е.

У Вавилоні проводять примусове запилення пальм при вибірковому запиленні жіночих дерев пилком деяких чоловічих особин.

500 років до н.е.

Відкрито перший антибіотик - маса із зацвілих соєвих бобів для лікування наливів (Стародавній Китай).

420 років до н.е.

Давньогрецький філософ *Сократ* (470-399 до н.е.) розмірковує на тему, чому діти не завжди схожі на своїх батьків.

400 років до н.е.

Давньогрецький лікар *Гіппократ* (460-377 до н.е.) приходять до висновку, що «внесок» чоловіка в спадковість дитини знаходиться в сім'яній рідині. За аналогією припускає, що є подібна рідина і у жінки, оскільки діти одержують риси від кожного з батьків приблизно у рівній пропорції.

320 років до н.е.

Давньогрецький філософ *Аристотель* (384-322 до н.е.) в полеміці з Гіппократом стверджував, що всі спадкові ознаки набуваються тільки від батька. Сім'я чоловіка визначає форму дитини, тоді як мати забезпечує матеріал для розвитку її організму.

300 років до н.е.

Стародавні греки розробляють методи щеплення і культивування рослин.

100 - 300 р. н.е.

Індійські філософи першими почали полеміку про характер природи відтворення і спадковості, стверджуючи, що діти успадковують характеристики обох батьків. Крім того, на їх думку деякі хвороби можуть бути спадковими.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Початок практики застосування інсектицидів - використання пилку хризантем у Китаї.

1100 – 1700 р.

Перевага концепції «самовільного зародження життя» (spontaneous generation) - догми, яка пояснює, що виникнення живих організмів є результатом процесу, який не має відношення до живого начала. Наприклад, як припускалось, личинки виникали з кінської волосини.

1322 р.

Арабський вождь вперше використовує штучне запліднення для одержання особливо видатних скакунів.

1500 - 1600 р.

Процес ферментації стає загальноживаним і дозволяє одержувати як квашені овочі, так і йогурт.

1630 р.

Англійський лікар *В.Гарвей* (Harvey William, 1578-1657) висловив припущення, що ссавці, як і кури, також розвиваються з яйця. Однак знадобилося більше 200 років, перш ніж змогли виявити «яйце» ссавця.

Голландський натураліст *І.Б. ван Гельмонт* (van Helmont Johann Baptista, 1579-1644) виявив здатність рослин до утворення органічних речовин, а не їх одержання з ґрунту.

1665 р.

Винахідник *Р.Тук* (Hooke Robert, 1635-1703) за допомогою сконструйованого ним мікроскопу зі збільшенням в 30 разів виявив рослинні «клітини на зрізі пробки».

1668 р.

Італієць *Ф.Реді* (Redi Francesco, 1626-1697) при експериментальному порівнянні двох конкуруючих ідей, що пояснюють причину виникнення личинок на гниючому м'ясі відзначив, що на ізольованому від повітря м'ясі, не спостерігається появи личинок, на відміну від неізольованого. Це було розцінено як перше спростування теорії «самовільного зародження життя» і виявилось першим фактом використання керованого експерименту.

1660 - 1675 р.

Італійському біологу *М.Мальпігі* (Malpighi Marcello, 1628-1694) за допомогою мікроскопу вдалось виявити капіляри, деталізувати анатомію шовковичного шовкопряду, описати розвиток курчати в яйці і видати роботу, присвячену анатомії рослин.

1673 р.

Голландець *А. ван Левенгук* (van Leeuwenhoek Anthony, 1632-1723), користуючись лінзами, що дають збільшення в 270 разів, зробив ряд відкриттів у мікробіології. Він був першим вченим, що описав бактерії, відкрив світ найпростіших, допускаючи, що такі мікроорганізми можуть спричинювати бродіння, вперше виявив клітини тварин - еритроцити.

1701 р.

Нині забутий родоначальник садівництва *Т. Фейрчайлд* (Fairchild Thomas) створює першу в Європі рослину - гібрид.

1724 р.

Виявлено явище перехресного запилення у зернових рослин.

1748 р.

Англійський натураліст *Дж.Т.Нідхем* (Needham John Turbevill, 1713-1781) проводить досліді термічної обробки різних фізіологічних розчинів, у яких були присутні мікроорганізми. На основі експериментальних даних приходиться до висновку про «наявність вегетативної сили в кожній мікроскопічній корпускулі», що слугувало підтримкою теорії «самовільного зародження життя».

1761 р.

Німецький ботанік *Дж. Кельрейтер* (Koelreuter Joseph Gottlieb, 1733-1806) повідомляє про успішне схрещування деяких видів хлібних злаків, чим остаточно доводить наявність статі у рослин, а своїми роботами з гібридизації показує участь у заплідненні і розвитку як яйцеклітин, так і пилку рослин.

1798 р.

Англійський лікар *Е. Дженнер* (Jenner Edward, 1749-1823) вводить дитині вірусну вакцину з метою профілактики віспи, а також публікує книгу, у якій аналізує відмінності між вакцинацією та інокуляцією.

1799 р.

Італійський натураліст *Л. Спалланцані* (Spal-lanzani Lázaro, 1729-1799) описує експерименти, проведені з використанням «герметично запечатаних» судин, які нагрівають у киплячій воді для перевірки можливості використання високої температури для знищення мікробів в «екстракті» (фізіологічному розчині).

1809 р.

Французький кондитер *Н. Анперт* (Appert Nicolas, 1749-1841) винайшов спосіб зупинки розвитку (розмноження) мікроорганізмів у харчових та інших продуктах — консервування, за що одержав винагороду від Наполеона у розмірі 12 тис. франків.

1815 р.

Російський хімік *К.Г.С.Кірхгоф* (1764-1833) одержує із пшениці екстракт, здатний перетворювати крохмаль в цукор.

1831 р.

Англійський ботанік *Р. Браун* (Brown Robert, 1773-1858) вперше описує ядро рослинної клітини - обов'язковий компонент майже всіх клітин.

1838 р.

Німецькі ботанік *М. Шлейден* (Schleiden Mathias, 1804-1881) і зоолог *Т. Шванн* (Schwann, Theodor, 1810-1882) вперше констатували, що всі організми складаються з клітин, а рослини і тварини є скупченням клітин, розміщених у певному порядку. Їх вважають авторами «клітинної теорії».

1839 р.

Чеський фізіолог *Я. Пуркіне* (Purkyne Jan, 1787-1869) вводить для позначення живого вмісту клітини термін «протоплазма».

1850 р.

Угорський натураліст *І.Ф.Земмельвейз* (Semmelweis, Ignaz Philipp, 1818-1865) використовуючи епідеміологічні спостереження, висунув гіпотезу про те, що лихоманка може передаватись при безпосередньому контакті.

1852 р.

У Парижі проходить міжнародна виставка кукурудзи («Corn Show»), де було представлено все існуюче різноманіття сортів зерна з різних країн світу.

1856 р.

Французький вчений *Л. Пастер* (Pasteur Louis, 1822-1895) стверджує, що за процес бродіння відповідальні мікроби.

1858 р.

Німецький біолог *Рудольф Вірхов* (Virchow Rudolf Ludwig Karl, 1821-1902) видає постулат: «Кожна клітина з'являється від клітини».

1859 р.

Англійський натураліст *Ч. Дарвін* (Darwin Charles, 1809-1882) публікує свою фундаментальну працю «Походження видів шляхом природного добору».

1861 р.

Л. Пастер відкрив мікроорганізми, що викликають маслянокисле бродіння - анаеробні бактерії, які живуть і розвиваються без доступу кисню. Він запропонував спосіб зберігання харчових продуктів за допомогою теплової обробки (згодом названий пастеризацією).

1863 р.

Німецьким ботаніком *Г. Барі* (de Ваги Heinrich Anton, 1831-1888) було доведено, що причиною захворювань картоплі є грибок.

1864 р.

Л. Пастер висунув теорію, згідно якої причиною гниття організмів є наявність маленьких організованих «корпускул» або мікробів у повітрі.

1865 р.

Австрійський чернець *Г. Мендель* (Mendel Gregor, 1822-1884) в результаті вивчення городнього гороху відкриває закони спадковості. Він представляє ці закони спадковості до розгляду Спілки Природознавства в Австрії. Мендель допускає, що одиниці спадковості, що пізніше стали відомі як гени, представлені в кожній живій особині парами. При утворенні гамет (статевих клітин) складові одиниці кожної пари розходяться і переходять у різні гамети. Робота Менделя залишилась непоміченою і перебувала в тіні значно більше, ніж сенсаційна публікація Дарвіна до 1900 р.

Англійський хірург *Дж. Лістер* (Lister Joseph, 1827-1912) відкрив збудника молочнокислого бродіння, а також почав використовувати дезінфікуючі розчини для обробки ран в операційній хірургії, ґрунтуючись на теорії Пастера.

1866 р.

Біолог-еволюціоніст *Е. Геккель* (Haeckel Ernst, 1834-1919) сформулював «біогенетичний закон», відповідно до якого, зародки в процесі розвитку повторюють еволюційний шлях, пройдений їх предками.

Російський ботанік і ґрунтознавець *М.С.Воронін* (1838-1903) виявив у клубеньках на коріннях бобових рослин дрібні тільця і вперше пов'язав утворення клубеньків з діяльністю бактерій.

1868 р.

Французький паразитолог *К. Давен* (Davaine Casimir Joseph, 1812-1882) вперше використав теплову обробку для звільнення рослин від бактеріальної інфекції.

Швейцарський лікар *Ф. Мішер* (Miescher, Fredrich, 1844-1895), досліджуючи гній з рани, виділив з ядер клітин гною новий тип хімічних сполук, які він у сукупності назвав «нуклеїном» (пізніше ці сполуки одержали назву нуклеїнових кислот).

1870 р.

Німецький цитолог *В. Флеммінг* (Flemming Walter, 1843-1905) виявив ефект мітозу - непрямого поділу ядра клітини.

Розпочато роботи зі схрещування бавовни, що призвело в найближчі 20 років до створення сотні нових високоякісних видів.

1871 р.

Один з перших біохіміків *Е. Хоуп-Сейлер* (Hoppe-Seyler Ernst, 1825-1895) виявив інвертазу - фермент, що розщеплює сахарозу на глюкозу і фруктозу.

Американський селекціонер *Л. Бербанк* (Burbank Luther, 1849-1926) створив сорт червоно-коричневої картоплі і продовжив роботи з гібридизації низки плодових і ягідних культур.

1875 р.

Ч.Дарвін висунув теорію існування «геммул» (гіпотетична спадкова частинка) як частини механізму успадкування.

1878 р.

Дж. Лістер описав техніку ізоляції чистих культур бактерій - важливий крок у розумінні інфекційних захворювань.

1879 р.

Німецький фізіолог *А. Коссель* (Kossei Albrecht, 1853-1927) розпочав вивчення нуклеїну, що призвело до відкриття нуклеїнових кислот.

У штаті Мічиган професор ботаніки *В.Бів* (Beal William James, 1833-1924) провів перше контрольоване схрещування кукурудзи з метою збільшення врожайності і одержав перший гібрид.

1880 р.

Вивчаючи захворювання домашніх птахів (холера), *Л. Пастер* публікує свою роботу про ослаблені форми інфікування організму, які не призводять до хвороби, але захищають від складних форм тієї ж хвороби в майбутньому.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Й.Дж.Ханстейн (von Hanstein Johannes, 1822-1880) вводить термін «ізольовані протопласти» - вміст рослинної клітини, оточений плазмалемою.

1881 р.

Німецький мікробіолог *Р.Кох* (Koch Robert, 1843-1910) описав бактеріальні колонії, які виростають на тонких зрізах картоплі, на середовищі желатину і на середовищі агару. Поживний агар стає звичним інструментом для одержання чистих культур та ідентифікації генетичних мутантів, що значно вплинула на прискорення розвитку мікробіології.

Л. Пастер одержав перші вакцини проти бактеріального патогенезу холери домашніх птахів, що стало початком створення імунології і відкрило нову область в профілактичній медицині.

1882 р.

В. Флеммінг виявляє і описує «хроматин» (частина структури клітинного ядра), який пізніше назвали хромосомами.

Р. Кох, експериментуючи на морських свинках, описує бактерію, яка спричинює туберкульоз людини і першим визначає причину деяких інших захворювань людини. Він встановив, що певні хвороби викликаються певними мікроорганізмами.

Російський біолог *І. І. Мечніков* (1845-1916) спостерігав фагоцитне оточення мікроорганізмів у личинок морської зірки. Пізніше він розробив клітинну теорію для пояснення дії вакцин.

Швейцарський ботанік *А. Кандолл* (De Candolle Alphon-se-Louis-Pierre-Rudolf, 1806-1893) публікує перше дослідження про походження і історію культивованих рослин, що зіграло важливу роль у роботі Н.І. Вавілова про центри походження культурних рослин.

1883 р.

Німецький фізіолог *А. Вейсман* (Weismann, August Friedrich Leopold, 1834-1914) вводить термін «зародкова плазма» («germ-plasm») і формулює теорію «безперервності зародкової плазми», стверджуючи, що чоловіча і жіноча батьківські особини вносять рівнозначний вклад у результати спадковості. Відтворення, таким чином, одержує нові комбінації факторів спадковості, а хромосоми є причиною безпосередньої передачі спадковості.

1884 р.

Р.Кох обнародує свої «постулати», які стверджують, що мікроби є причинним агентом хвороби.

Л. Пастер створює вакцину від сказу.

Датський лікар *Г.Грам* (Gram Hans Christian Joachim, 1853-1938) описує техніку диференціювання бактерій за морфологічними ознаками, відому як метод забарвлення бактерій за Грамом.

1887 р.

Бельгійський зоолог *Е. ван Венеден* (van Beneden Edouard-Joseph-Louis-Marie, 1846-1910) виявив, що кожен живий організм має певну кількість хромосом та відкрив процес формування гаплоїдних клітин.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Німецький бактеріолог *Р. Петрі* (Petri Richard Julius, 1852-1921) описав скляні посудини, які одержали назву «чашки Петрі», для вирощування мікробів на живильному середовищі (агар).

1892 р.

Російський ботанік *Д.І.Івановський* (1864-1920) повідомив про відкриття «вірусу» мозаїчної хвороби рослин тютюну. Він довів, що ця «хвороба» викликається не збудником грибкового або бактеріального походження, а меншими за розміром простими формами живих істот, які проходять крізь фільтр з найдрібнішими порами» і не виявляються за допомогою, існуючої на той час техніки.

Дж. Клеркер (Klerker J.) вперше виділив протопласти під час механічного ушкодження тканини при вивченні плазмолізу в рослинних клітинах.

1892-1902 р.

Німецькі вчені *Г. Хаберландт* (Haberlandt Gotlib, 1854-1945), *Х. Фьохтинг* (von Vöchting, Hermann, 1847-1917) і *К. Рехінгер* (Rechinger Karl, 1867-1952) спробували культивувати в розчині сахарози рослинні тканини, однак безрезультатно. Не досягши експериментальних успіхів, ці дослідники висловили ряд важливих ідей і гіпотез, підтверджених значно пізніше. Так, Хаберландт висунув гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої рослинної клітини.

1893 р.

Дослідники з Інституту Лістера (Lister Institute) виділили антитоксин дифтерії.

1895 р.

Російський мікробіолог *С.Л. Виноградський* (1856-1953) продемонстрував процес фіксації азоту бактеріями *Clostridium* в анаеробних умовах.

1896 р.

Американський цитолог *Е. Вільсон* (Wilson Edmund Beecher, 1856-1939) детально розробив хромосомну теорію спадковості Августа Вейсмана. В опублікованій ним книзі «Клітина в розвитку і спадковості» на основі відомих на той час наукових фактів, здобутих генетиками, цитологами, ембріологами, еволюціоністами, створено основу для цілісної теорії хромосомної спадковості.

1897 р.

Німецький хімік *Е. Бюхнер* (Buchner Eduard, 1860-1917) виготовив із дріжджів безклітинний екстракт, який перетворює цукор у спирт і продемонстрував у такий спосіб факт існування ферментів. Ця подія стала ключовим моментом у процесі розвитку біохімії і ензимології.

1899 р.

Дослідженнями голландського ботаніка і мікробіолога *М. Бейеринка* (Beijerinck Martinius Willem, 1851-1931) було підтверджено роботу Д.І.Івановського про збудник мозаїчної хвороби тютюну та висловлено припущення, що вірус безпосередньо включається в протоплазму клітини рослини-хазяїна.

1900 р.

Рік народження генетики як науки, коли три дослідники: *Г. Де Фриз* (de Vries Hugo, 1848-1935) у Голландії, *К. Корренс* (Correns Carl, 1864-1933) у Німеччині і *Е. Чермак* (von Tschermak Erich, 1871-1962) в Австрії - незалежно один від одного - вдруге «відкрили» закони спадковості Г. Менделя.

Американський військовий хірург *В. Рід* (Reed Walter, 1851-1902) встановив, що жовта лихоманка передається москітами та вперше довів, що ця хвороба людини може бути спричинена вірусом.

Спалахи хвороб у переповнених індустріальних містах призвели до впровадження великомасштабних систем очищення стічних вод, заснованих на діяльності мікроорганізмів.

Розпочато виробництво основних промислових хімічних речовин (гліцерин, ацетон і бутанол) за допомогою бактерій.

1901 р.

М. Бейеринк (M. Bayerink) виділив з ґрунту чисту культуру аеробних неспороутворюючих клубенькових мікроорганізмів, які фіксують молекулярний азот і назвав новий вид азотфіксуючих бактерій він назвав *Azotobacter chroococcum*.

И. Уайлдер (Wildier E.) виявив «нову речовину, необхідну для розвитку дріжджів». Ці фактори росту натепер відомі як вітаміни.

1902 р.

Американець *В. Самтон* (Sutton Walter, 1877-1916) і німецький цитолог та ембріолог *Т. Бовері* (Boveri Theodor, 1862-1915) - незалежно один від одного - припустили, що гени знаходяться в хромосомах і що кожна яйцеклітина або сперматозоїд містять тільки по одній хромосомі кожного типу. Ця ідея започаткувала хромосомну теорію спадковості.

1903 р.

Співробітник МСХ США *Г. Веббер* (Webber Herbert John) запропонував термін «клон» (грецьк. klōn - черешок або пагін, придатний для розмноження рослин) для позначення рослин, отриманих безстатевим розмноженням; пізніше термін почав застосовуватися і для позначення «розмноження» генів.

1904 р.

Англійський біолог *В. Бейтсон* (Bateson William, 1861-1926) продемонстрував, що хромосоми успадковуються як єдине ціле. Гени, локалізовані в одній хромосомі, здатні до спільного успадкування, тому вони становлять одну групу зчеплення. Спільне успадкування генів було названо «зчепленням генів». Це призвело до необхідності «генетичного картування» для визначення кількості і послідовності розташування груп зчеплення генів.

1905 р.

Е. Вільсон і *Н. Стівенс* (Stevens, Nettie Maria, 1861-1912) - незалежно один від одного - розробили теорію, яка встановлює, що Х- і Y-хромосоми визначають стать. Вони показали, що наявність однієї Y-хромосоми визначає чоловічу стать, а двох X-хромосом - жіночу.

Історичні віхи розвитку біотехнології

1906 р.

В. Бейтсон і один з перших англійських генетиків *Р. Паннетт* (Punnett Reginald Crudell, 1875-1967) у дослідях з духм'яним горошком виявили, що деякі ознаки не проявляють незалежного спадкування. Ввели термін «генетика».

1907 р.

Американський генетик *Т. Морган* (Morgan Thomas Hunt, 1866-1945) започаткував вивчення плодової мушки (*Drosophila pseudoobscura*) і довів, що кожна хромосома має певну функцію в процесі спадковості; розробив теорію мутації, що сприяло фундаментальному розумінню механізмів спадковості.

1908 р.

Селекціонер кукурудзи з Інституту Карнегі *Г.Х. Шулл* (Shull George Harrison, 1874-1954) одержав першу в США гібридну кукурудзу методом самозапилення.

Англійський лікар *А. Гаррод* (Garrod Archibald Edward, 1857-1937) вперше висунув припущення про безпосередній зв'язок між генами і ферментами. Аналізуючи історії хвороб близьких родичів, він виявив спадкові біохімічні аномалії, названі ним вродженими помилками метаболізму. Це виявилось першим визнанням важливої ролі генетики в біохімії, але саме припущення залишилося недооціненим до появи роботи *Г. Відла* (Beadle George Wells, 1903-1989) і *Е. Тейтема* (Tatum Edward Lawrie, 1909-1975) в 1941р.

1909 р.

Датський біолог *В. Йогансен* (Johannsen Wilhelm, 1857-1927) вводить термін «гени» і формулює відмінності між поняттями «генотип» і «фенотип». Йогансен є одним з основоположників сучасної генетики; він створив вчення про чисті лінії, заклав основи сучасних принципів селекції.

1910 р.

Т. Морган сформулював сучасну концепцію про лінійне розміщення одиниць спадковості - генів - у хромосомах.

1911 р.

У своїх дослідях з плодовою мушкою *Т. Морган* виявив взаємозв'язок між конкретними генами і конкретними хромосомами. Це стало переконливим доказом справедливості хромосомної теорії спадковості.

1913 р.

Студент *Т. Моргана* *А. Стертевант* (Sturtevant Alfred, 1891-1971) вперше встановив порядок генів у хромосомі - побудував першу карту гена.

1916 р.

Студент *Т. Моргана* *К.Біджес* (Bridges Calvin, 1889-1938) довів взаємозв'язок між конкретними генами і конкретними хромосомами, що послужило підтвердженням справедливості хромосомної теорії спадковості.

1917 р.

Угорський інженер *К. Ерекі* (Ereky Karl, 1865-1933) ввів термін «біотехнологія». За його визначенням, біотехнологія - це «всі види робіт, при яких ті або

Історичні віхи розвитку біотехнології

інші продукти виробляються з сировинних матеріалів за допомогою живих організмів».

Німецький генетик *Г. фон Плауг* (von Plough Н.Н.) продемонстрував обмін ділянками між гомологічними хромосомами, відомий як «кросинговер».

Французький вчений *Ф. Д'Еррель* (D'Herelle Felix Hubert, 1873-1949) звернув увагу на те, що якийсь невидимий агент руйнує культури дифтерійних паличок, з якими він працював. Так ним були відкриті вірусні паразити бактерій, яким вчений дав назву «бактеріофаги».

1921 р.

Генетик *Г. Мюллер* (Muller Herman, 1890-1967), студент Т. Моргана, відзначив дві важливі загальні властивості бактеріофагів та генів: здатність до розмноження, створюючи точні копії самих себе та утворення нових форм в результаті мутацій.

1922 р.

Американський вчений *В. Роббінс* (Robbins William Jacob, 1886-1937) і його німецький колега *В. Котте* (Kotte Walter) показали можливість культивування меристем (кінчиків коренів) томатів і кукурудзи на твердих поживних середовищах.

Т. Морган винайшов методи картування гена і створив карту хромосом плодової мушки.

1925 р.

М.І.Вавилов (1887-1943) почав першу зі своїх численних експедицій у десятки країн земної кулі з метою вивчення світових рослинних ресурсів, озброївши сільськогосподарську науку методом пошуку вихідного матеріалу для селекції рослин.

1926 р.

Т. Морган опублікував «Теорію генів» («The theory of the gene») - результат багаточисленних експериментів, які дозволили розкрити генетичну основу визначення статі та пояснити ряд незвичайних форм успадкування, при яких передача ознаки залежить від статі особини (так звані ознаки, зчеплені зі статтю).

1927 р.

М. Мюллер, опромінюючи живі організми рентгенівськими променями, виявив, що можна штучно викликати в них зміни генів. Застосування рентгена прискорювало мутацію генів в 1500 раз, що дозволяє одержувати безліч нових мутантних генів - додатковий матеріал для вивчення спадковості. Дані про природу мутацій стали основними в розумінні природи і будови самих генів.

1928 р.

Англійський мікробіолог *Ф. Гриффіт* (Griffith Frederick, 1877-1941) показав, що бактеріальні клітини непатогенного штаму пневмококу можуть трансформуватись в патогенні за допомогою трансформуючого фактора.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Радянський цитогенетик *Г.Д.Карпеченко* (1899-1942) схрестив редьку і капусту, вперше одержавши плодючий міжродовий гібрид - фертильне потомство від різних видів.

1928-1935 р.

Американський фізик і хімік *Л. Полінг* (Pauling Linus Cari, 1901-1994) пояснив фізичні закони, що впливають на організацію атомів у молекулах. Він також описав серповидноклітинну анемію і визначив, що ця мутація пов'язана з певними змінами хімічної структури молекул гемоглобіну.

1929 р.

Хімік-органік *Ф. Левін* (Levene Phoebus, 1869-1940) виявив у молекулах нуклеїнових кислот, що не містять рибозу, раніше невідомий моносахарид - дезоксирибозу. Натепер відомо, що цей моносахарид входить до складу нуклеотидів дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК).

Англійський мікробіолог *А. Флемінг* (Fleming Alexander, 1881-1955) помітив, що всі бактерії навколо продуктів цвілі *Penicillium notatum* в чашці Петрі загинули. Почалася ера пеніциліну, хоча пройде ще майже 12 років, перш ніж цей антибіотик стане доступним для широкого використання.

1931 р.

Американський цитогенетик *Б. Мак-Клінток* (McClintock Barbara, 1902-1992) і *Х. Крейтон* (Creighton Harriet) на основі отриманих даних при дослідженні кукурудзи довели, що в основі рекомбінації лежить кросинговер, тобто фізичний обмін ділянками хромосом між двома розірваними хроматидами.

1934 р.

Англійський фізик *Д. Бернал* (Bernal Desmond, 1901-1971) вперше показав, що такі гігантські молекули, як білки, можуть бути досліджені за допомогою рентгеноструктурного аналізу.

1935 р.

Американський вірусолог і біохімік *В. Стенлі* (Stanley Wendell, 1904-1971) вперше ізолював, кристалізував і очистив вірус тютюнової мозаїки. Він виявив, що до складу вірусів входять нуклеїнові кислоти та білки, тобто ті ж сполуки, з яких в основному складаються хромосоми вищих організмів.

Радянський біохімік *А. Н. Белозерський* - основоположник сучасної наукової школи з нуклеїнових кислот (1905-1972) першим виділив чисту ДНК.

1937 р.

Французький вчений *Р. Готре* (Gautheret Roger) з успіхом культивував недиференційовану тканину моркви. Він показав можливість тривалого культивування в умовах *in vitro* рослинних тканин при періодичному пересаджуванні їх на свіже живильне середовище. Це відкриття дало новий поштовх роботам по вивченню культури тканини.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Англійський вірусолог *Ф. Боуден* (Bawden Frederick Charles, 1908-1972), досліджуючи вірус тютюнової мозаїки виявив, що віруси містять рибонуклеїнову кислоту - РНК.

1938 р.

Англійські дослідники *Г. Флорі* (Florey Howard, 1898-1968) і *Е. Чейн* (Chain Ernst, 1906-1979) з Оксфордського університету в 1940 р. виділили з культури цвілевого гриба пеніцилін.

Введено термін «молекулярна біологія».

1939 р.

А.Н.Белозерський відкриває наявність у бактеріях ДНК і РНК.

1940 р.

О. Ейвери, працюючи в Інституті Рокфеллера (Rockefeller Institute, New York), ізолював чисту ДНК.

1941 р.

Американські генетики *Г. Бідл* і *Е. Тейтем*, експериментуючи з аскоміцетом *Neurospora crassa*, розробили гіпотезу «один ген - один фермент - одна реакція», тобто кожен нормальний ген продукує певний фермент, необхідний для організму. За це відкриття в 1958 р. вони визнані лауреатами Нобелівської премії. Ці вчені висунули також гіпотезу, що рентгенівське випромінювання викликає ушкодження генів.

Датський мікробіолог *А. Джост* (Jost Adolf) вводить поняття «генетична інженерія».

Налагоджено великомасштабне виробництво пеніциліну.

1943 р.

Американські генетики *С. Лурія* (Luria Salvador, 1912-1991) і *М.Делбрук* (Delbrück Max, 1906-1981) провели експеримент, що одержав назву «флуктуаційний тест», який доводить, що бактерії містять спонтанно мутуючі гени, так як і всі інші організми. Ця робота ознаменувала народження бактеріальної генетики як самостійної науки.

1944 р.

О. Ейвери (O. Euviry) було доведено, що носієм генетичної інформації є ДНК - спадковий матеріал, який викликає трансформацію бактерій. Ця теорія спочатку не одержала належної уваги, оскільки на той момент на думку вчених ДНК була занадто простою молекулою, щоб містити всю генетичну інформацію, необхідну для організму.

Англійський біохімік *Ф. Сангер* (Sanger Frederick, 1918-1982) вперше застосував метод, названий хроматографією, для визначення амінокислотної послідовності білка інсуліну.

1946 р.

Американський генетик *Дж. Ледерберг* (Lederberg Joshua, 1925) і *Е.Тейтем* продемонстрували, що між членами генетично неоднорідної популяції *E.coli* може відбуватись обмін генетичною інформацією і виникати нові генетичні

Історичні віхи розвитку біотехнології

комбінації (генетична рекомбінація). На той час генетична рекомбінація у бактерій вважалась неможливою.

Американські генетики *М. Делбрук* і *А. Херші* (Hershey, Alfred Day, 1908-1997) - незалежно один від одного виявили, що генетичний матеріал від різних вірусів може взаємодіяти, призводячи до виникнення нової форми вірусу, що підтверджувало можливість генетичної рекомбінації.

Агроном-селекціонер Сільськогосподарської дослідницької служби США *С. Салмон* (Salmon Cecil), будучи радником з сільськогосподарських питань у посольстві США привозить з післявоєнної Японії насіння сорту пшениці Норін 10 (Norin 10) з геном карликовості. На основі цього японського сорту було створено багато цінних короткостебельних або напівкарликових сортів озимої пшениці, введення яких в культуру започаткувало «зелену революцію».

1947 р.

Б. Мак-Клінток (B. Mak-Klinton) зробила повідомлення про відкриття в бактерій рухливих генетичних елементів, відомих сьогодні як транспозони. Однак наукове співтовариство на той момент не оцінило його значення.

1949 р.

Встановлено, що апікальна меристема практично не містить вірусів. На основі цього методу було розроблено техніку культивування і вегетативного розмноження здорових рослин методом культури тканин *in vitro*.

1950 р.

Американський біохімік *Е. Чаргафф* (Chargaff Erwin, 1905-2002) в результаті аналізу ДНК прийшов до висновку, що в ДНК загальна кількість аденіну дорівнює загальній кількості тиміну ($A = T$), а кількість гуаніну дорівнює кількості цитозину ($G = C$). Ці дані внесли вагомий внесок до фактичного матеріалу, на основі якого пізніше була побудована модель структури ДНК Уотсона - Крика.

1952 р.

Дж. Ледерберг (D. Lederberg) продемонстрував перенесення ДНК від однієї бактерії до інших опосередкованим вірусом і назвав його трансдукцією та ввів назву «плазмід».

А. Херші і *М. Чейз* (Chase Martha Cowles, A. Hershey, 1927-2003) на основі експериментальних даних з'ясували, що у бактеріальну клітину при її зараженні проникає тільки компонент ДНК фагової частки, тоді як білкова оболонка залишається ззовні. В результаті цього було підтверджено генетичну роль ДНК і спростовано роль білка.

Англійський мікробіолог *В. Хейс* (Hayes William, 1918-1994) виявив ефект кон'югації - односпрямоване перенесення ДНК з однієї контактуючої бактеріальної клітини в іншу.

Бельгійський цитолог *Дж. Бречет* (Brächet Jean, 1909-1988) припустив, що РНК відіграє важливу роль у синтезі білків.

Французький ботанік *Ж. Морель* (Morel George Michel, 1916-1973) висловив припущення, що, використовуючи культивування меристем, можна одержувати

Історичні віхи розвитку біотехнології

здорові, вільні від вірусної інфекції рослини. Культивування меристем пагона - найбільш ефективний спосіб оздоровлення рослинного матеріалу від вірусів, віроїдів та мікоплазм.

1953 р.

Американські біохімік *Дж. Вотсон* (Watson James Dewey, р. 1928) і генетик *Ф. Крик* (Crick Francis, 1916-2004), працюючи в Кембриджі (Molecular Biology Laboratory in Cambridge, England), описали структуру ДНК як подвійну спіраль (за що в 1962 р. одержали Нобелівську премію). Відкриття структури ДНК призвело до активізації досліджень в області молекулярної біології і генетики, що започаткувало революцію в біотехнології.

В. Хейс (V. Heiys) виявив, що плазміди можна використати для перенесення генетичних маркерів з однієї бактерії в іншу.

1955 р.

Американські фізіологи рослин *Ф. Скуг* (Skoog Folke Karl, 1908-2001) і *К. Міллер* (Miller Carlos) відкрили новий клас фітогормонів – цитокініни, що дало можливість стимулювати поділ клітин, підтримувати ріст калусної тканини, індукувати морфогенез у контрольованих умовах.

1956 р.

Американському біохіміку *Х. Френкель-Конрату* (Fraenkel-Conrat Heinz, 1910-1999) вдалось розділити вірус на його основні компоненти - білок і нуклеїнову кислоту - і потім знову сполучити їх в активний вірус.

1957 р.

Американці *Ф. Крик* (Crick Francis) і фізик-теоретик *Дж. Гамов* (Gamow George, 1904-1968) запропонували концепцію «центральної догми» молекулярної біології, а саме, що інформація про структуру клітинних білків закодована в нуклеотидній послідовності клітинної ДНК. Вони також стверджували, що перенесення генетичної інформації між біологічними макромолекулами відбувається тільки в одному напрямку: ДНК - мРНК - білок.

Американські молекулярні біологи *М. Мезельсон* (Meselson Matthew Stanley, 1930) і *Ф. Сталь* (Stahl Franklin William, 1929) продемонстрували напівконсервативний механізм реплікації ДНК. Він полягає в тому, що обидва ланцюги ДНК розділяються і на кожному синтезується комплементарний їй ланцюг.

1958 р.

Американський біохімік *А. Корнберг* (Kornberg Arthur, 1918) виявив і виділив ДНК-полімеразу - фермент, що використовує одноланцюгову ДНК як матрицю і будує на ній другий ланцюг ДНК.

Встановлено, що серповидноклітинна анемія виникає в результаті заміни однієї амінокислоти.

1959 р.

Французькі мікробіологи *Ф. Жакоб* (Jacob Francois, 1920) і *Ж. Моно* (Monod Jacques, 1910-1976) вперше встановили факт існування механізму регуляції

Історичні віхи розвитку біотехнології

генів, визначили ділянки регуляції транскрипції і сформулювали модель структурно-функціональної організації оперона і репресора.

1960 р.

Англійський вчений *Е. Коккінг* (Cocking Edward C.) розробив ферментативний метод одержання ізольованих протопластів. Це послужило поштовхом до одержання соматичних гібридів, введенню в протопласти вірусних РНК, клітинних органел, клітин прокариот.

1961 р.

І. Д. Мітчелл (I.D. Mitchell) запропонував хеміосмотичну теорію утворення АТФ.

А. Мармур (A. Marmur) і П. Доті (P. Doty) відкрили явище ренатурації ДНК і встановили точність і специфічність реакції гібридизації нуклеїнових кислот.

1962 р.

В. Арбером (V. Arber) вперше отримано дані про ферменти рестрикції ДНК.

1963 р.

Американський біохімік *М. Ніренберг* (Nirenberg Marshall, 1927) розшифрував генетичний код, що виявився універсальним як для бактерій, так і для вищих організмів, в тому числі і для людини (за що одержав Нобелівську премію в 1968 р.). В результаті цього генетична інформація і її зміст, тобто взаємозв'язок між генетичним кодом і структурою білків стали доступними для вивчення.

Нові гібридні сорти пшениці, виведені агрономом і мікробіологом *Н. Борлаугом* (Vorlaug Norman Ernest, 1914), дозволили збільшити врожайність на 70%. За роботу зі створення короткостебельних сортів озимої пшениці у 1970 р. Борлауг одержав Нобелівську премію і став першим в історії Нобелівським лауреатом - селекціонером рослин.

1965 р.

Встановлено, що гени стійкості до антибіотиків у бактеріях локалізовані на дволанцюгових кільцевих молекулах ДНК, які називаються плазмідами, що призвело до початку класифікації плазмід.

1966 р.

М. Ніренберг і *Г. Маттей* (M. Mathaei, G. Heinrich) продемонстрували, що кожну з 20 амінокислот у молекулі мРНК (кодон) кодують три суміжних нуклеотиди.

1970 р.

Е. Коккінг (E. Cocking) здійснив перше штучне злиття протопластів за допомогою індуктора злиття (ф'юзогену), що відкрило новий шлях до створення соматичних гібридів.

Х. Темін (H. Temin), *Д. Балтімор* (D. Baltimore) відкрили процес зворотної транскрипції.

1971 р.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Американські вчені *С. Коен* (Cohen Stanley N., Stanford University, p.1922) і *Г. Бойер* (Boyer, Herbert W., University of California, San Francisco, p.1936) - незалежно один від одного - розробили стратегію перенесення функціональної одиниці спадковості (гена) з одного організму в інший.

1972 р.

Американський біохімік *П. Берг* (Berg Paul, p. 1926) сконструював і одержав біологічно активну гібридну плазмиду шляхом обробки рестриктазою двох плазмід з наступним їх зшиванням ДНК-лігазою. В такий спосіб була створена перша рекомбінантна молекула ДНК.

С. Сінгер (S. Singer) і *Г.Л.Ніколсон* (G.L.Nikolson) запропонували рідинно-мозаїчну модель біомембрани.

1973 р.

С. Коен (S. Kouen) і *Г. Бойер* (G.Boyer) оприлюднили технологію використання рекомбінантної ДНК, що розглядається як дата народження сучасної біотехнології. В 1974 р. Бойеру вдалося запатентувати цю технологію, що дозволило йому створити свою приватну компанію.

1974 р.

Г. Мельхерс (Melchers George) вводить термін «соматична гібридизація», що означає процес злиття протопластів соматичних клітин.

В. Ербер (B. Erber) запропонував використати рестрикційні ендонуклеази як інструмент для аналізу ДНК.

1975 р.

Ц. Мільштейн (C. Milshtein) синтезував перші моноклональні антитіла.

1977 р.

У Гарвардському університеті *В. Джилберт* (Gilbert Walter, p. 1932) зі своїм аспірантом *А. Мексамом* (Maxam Allan) розробили швидкий метод хімічного аналізу ДНК, що дало реальну можливість визначати послідовність до 1000 нуклеотидів у тиждень силами одного дослідника.

1978 р.

Вчені Стенфордського університету (Stanford University) успішно пересадили ген свавця в ДНК бактерії.

Вперше синтезований рекомбінантний інсулін людини.

1979 р.

У Гарвардському університеті *В. Бендер* (Bender Welcome) і *Д. Хогнесс* (Hogness David, p. 1953) розробили метод клонування ДНК, що дозволив виділити і клонувати тисячі різних генів.

Компанія «Дженентек» і Національний медичний центр м. Хоуп (The City of Hope National Medical Center) у Каліфорнії оголосили про успішний синтез гена соматостатину та інсуліну за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Таким чином вперше було продемонстровано експресію гена людини в бактеріальних клітинах.

Вперше синтезований гормон росту людини.

Історичні віхи розвитку біотехнології

1980 р.

Група дослідників корпорації «Сетус» (Cetus Corporation, Беркли, Каліфорнія), очолювана К. Мюллісом (Mullis Kary Banks, р. 1944), розробила спосіб одержання *in vitro* великої кількості специфічних нуклеотидних послідовностей - полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) - найбільш революційний і ефективний інструмент молекулярної біології 1980-х рр. Мюлліс за це відкриття одержав Нобелівську премію у 1993 р.

С. Коену (S. Koehn) і Г. Бойеру (G. Boyer) було видано патент США (№ 4237224) на використання вірусних і плазмідних векторів для створення рекомбінантних ДНК.

1981 р.

У США починають реалізувати перші діагностичні комплекти на основі моноклональних антитіл.

Вперше був маркований автоматично синтезований ген.

1982 р.

Початок ери трансгенних рослин. Вчені створюють першу культурну рослину (продукт біотехнологій) - стійкий до антибіотиків тютюн.

1983 р.

Міжнародний Стенфордський науково-дослідний інститут (Stanford Research Institute International) одержав патент на здатний до експресії вектор, для здійснення синтезу чужорідних білків в *E. coli*.

Американський біохімік М. Каррутерс (Caruthers Marvin, University of Colorado) запропонував метод хімічного синтезу ДНК довжиною до 75 пар нуклеотидів. Разом з Л. Худ (Hood Leroy, California Institute of Technology, р.1938) розробив перший прилад для автоматичного синтезу - ДНК-синтезатор.

1984 р.

Бельгійські генетики М. Ван Монтагю (Van Montagu Mark) і Дж. Шелл (Schell Jeff) відкрили механізм передачі генів від ґрунтових бактерій роду *Agrobacterium* у рослини. Це дозволило створити ефективні методи генетичної трансформації для більшості видів дводольних рослин.

1985 р.

Початок виробництва генно-інженерного мікроорганізму, створеного для боротьби із заморозками.

Проведено перші польові випробування трансгенних рослин, стійких до комах, вірусів і бактерій.

1986 р.

Перший (невдалий) експеримент Міністерства сільського господарства США зі створення трансгенних тварин у місті Белтсвілл (Beltsville, Md., штат Мериленд). В ембріон свині був трансформований ген гормону росту людини. В результаті дві особини загинули не досягаючи статевої зрілості, а третя була паралізована.

Історичні віхи розвитку біотехнології

У США і Франції проведені перші польові випробування генетично модифікованого тютюну, толерантного до гербіцидів.

Створена перша рекомбінантна вакцина для людини (вакцина проти гепатиту В).

Синтезований перший біотехнологічний протипухлинний препарат - інтерферон.

1986-1995 р.

За десятилітній період було проведено 3647 польових випробувань 56 ГМ-рослин у 18 країнах світу, з яких 1952 (54%) - здійснено на території США. Комерційними стали тільки вісім основних культур, на які припадає 28% всіх польових випробувань: кукурудза - 33 %, олійний рапс - 21%, картопля - 11%, томат - 11%, соя - 9%, бавовник - 7%, тютюн - 5% і гарбуз - 3%. Основними набутими характеристиками є: толерантність до гербіцидів - 35%, поліпшені якісні характеристики - 20%, стійкість до комах - 18%, резистентність до вірусних хвороб - 11%, стійкість до грибних інфекцій - 3% та інші (маркерні і селективні гени, стійкість до бактерій і нематод) - 13%.

1987 р.

Американський генетик *М. Олсон* (Olson Maynard Victor, Washington University) сконструював новий тип здатного до експресії вектора, «штучні дріжджові хромосоми» (yeast artificial chromosomes), призначені для клонування великих фрагментів ДНК.

1988 р.

Генетики *Ф. Ледер* (Leder Philip) і *Т. Стюарт* (Stewart Timothy) запатентували першу тварину, отриману за допомогою методів генетичної інженерії - трансгенну мишу з підвищеною частотою виникнення пухлин.

1989 р.

Створення в США Національного центру з дослідження геному людини (National Center for Human Genome Research), який очолив Дж. Уотсон.

1990 р.

Молекулярний біолог *М. Фромм* (Fromm Michael E.) із Центру експресії генів рослин повідомив про стійку трансформацію кукурудзи за допомогою бомбардування мікрочастинками - метод балістичної трансфекції.

Офіційний початок реалізації міжнародної програми «Геном людини» (Human Genome Project) у США. Кінцева програма полягає у визначенні нуклеотидної послідовності всього геному людини до 2005 р., на що країнами-учасницями виділено 13 млрд. доларів.

Компанія «Калджин» провела успішні польові випробування ГМ-рослин, стійких до гербіциду бромоксинілу.

1991 р.

Перша спроба експериментальної генетичної терапії успішно випробувана на чотирирічній дівчинці, що страждає патологією імунної системи.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Створена стійка до комах (Bt) кукурудза.

Схвалено перший харчовий продукт, отриманий за допомогою генетично модифікованих дріжджів.

Проведено перші випробування генетично модифікованого хребетного - форелі - у природних умовах.

1994 р.

Перший біотехнологічний харчовий продукт - помідори FLAVR SAVR - одержав схвалення FDA.

Виявлено перший ген, що визначає схильність до раку грудей.

Отримано схвалення рекомбінантної версії ДНКазу людини, яка розчиняє скупчення білка в легенях хворих мусковісцидозом.

Розпочато застосування коров'ячого соматотропіну.

1995 р.

У США дозволені до комерційного використання генетично модифіковані сорти сої Roundup Ready («Монсанто») і кукурудзи Maximizer («Сіба-Гейґи»). Починається в промислових масштабах використання ГМ-сортів бавовнику - Bollgard («Монсанто») і BXN Cotton («Калджин»).

Проведено першу трансплантацію кісткового мозку мавпи людині, хворій на СНІД.

Й. К. Вентер зі співробітниками завершили секвенування геному бактерій *Neisseria meningitidis* і *Mycoplasma genitalium*.

Генетична терапія, модулювання імунної системи і рекомбінантні антитіла вводяться в клінічну практику для боротьби з онкологічними захворюваннями.

1996 р.

Група вчених повідомляє про визначення повної нуклеотидної послідовності всього набору хромосом еукаріотичного мікроорганізму - пивних (пекарських) дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Це підвищило цінність даного мікроорганізму для наукових досліджень і довело можливість картування великих геномів, більших 12 млн. п. н.

Відкриття гена, асоційованого з розвитком хвороби Паркінсона, що дало нові можливості вивчення причин і розробки потенційної терапії цього нейродегенеративного захворювання.

Перший рік культивування ГМ-культур, які вирощуються в 6 країнах на загальній площі 1,7 млн га.

1997 р.

Дослідники з Інституту Рослін (Шотландія, Scotland's Roslin Institute) повідомили про клонування першого ссавця - вівці Доллі.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощуються в семи країнах світу на загальній площі 11,0 млн. га: соя - 5,1 млн. га (46%), кукурудза - 3,2 млн. га (30%), бавовник - 1,4 млн. га (13%) - це 7-кратний приріст, у порівнянні з попереднім роком.

1998 р.

Дослідники Гавайського університету клонували три покоління мишей з ядра дорослої клітини яєчника. Створено лінії ембріональних стовбурних клітин людини.

Вченим японського університету Кінкі вдалося клонувати вісім ідентичних телят із клітин однієї дорослої корови.

Завершено роботу над секвенуванням геному першої тварини - кільчастого черв'яка *Caenorhabditis elegans*.

Складено приблизну карту геному людини, на якій зазначено розміщення більш ніж 30 тис. генів.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощуються у восьми країнах світу на загальній площі 27,8 млн. га: соя - 14,5 млн. га (52%), кукурудза - 8,3 млн. га (30%), бавовник - 2,5 млн. га (9%) (16-кратний приріст посівних площ, порівняно з 1996 р).

1999 р.

Створена шляхом трансформації перша рослина зі зміненою харчовою цінністю - «золотий рис», що містить бета-каротин, попередник вітаміну А.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощуються в 12 країнах світу на загальній площі 39,9 млн. га: соя - 21,6 млн. га (54%), кукурудза - 11,1 млн. га (28%), бавовник - 3,7 млн. га (9%) (приріст склав 11 % порівняно з попереднім роком).

2000 р.

Розшифровано перший повний геном *Arabidopsis thaliana* - рослини, яка є популярним модельним об'єктом у молекулярній біології. У дослідженнях приймали участь 27 лабораторій у США, Європі і Японії. Отримані результати дозволяють зрозуміти, які гени відповідають за специфічні властивості в багатьох сільськогосподарських культур, оскільки між всіма рослинами багато спільного.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощують більше 3,5 млн. фермерів в 13 країнах світу на загальній площі 44,2 млн. га: соя - 25,8 млн. га (58%), кукурудза - 10,3 млн.га (23%), бавовник - 5,3 млн.га (12%) (26-кратний приріст порівняно з 1996 р).

2001 р.

Китайські дослідники повідомляють про створення нового сорту рису, врожайність якого у два рази вища, ніж у звичайних сортів.

Завершено секвенування ДНК важливих для сільського господарства мікроорганізмів: азотфіксуючої бактерії *Sinorhizobium meliloti* і *Agrobacterium tumefaciens* - безпечного фітопатогену і справжньої знахідки для генних інженерів.

З метою створення культури, здатної рости на засолених ґрунтах, ген з *Arabidopsis thaliana* був вбудований у геном томатів.

Компанією «Синджента» успішно закінчено проект картування геному рису.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощують близько 5,5 млн. фермерів в 13 країнах на загальній площі 52,6 млн. га: соя - 33,3 млн. га (63%), кукурудза - 9,8 млн. га (19%), бавовник - 6,8 млн. га (13%) (31-кратний приріст порівняно з 1996 р).

2002 р.

Міжнародні групи дослідників секвенують геноми малярійного плазмодія і комара, що переносить цього паразита.

Великий прогрес досягнутий у визначенні факторів, що контролюють диференціювання стовбурових клітин та ідентифіковано більше 200 генів, що беруть участь у цьому процесі.

Оголошено позитивні результати застосування вакцини від раку шийки матки, що демонструє можливість створення вакцин для профілактики злоякісних захворювань.

Завершено секвенування геному паразитарного грибка, який щорічно знищує величезну кількість рису; вивчаються молекулярні механізми їх взаємодії.

Виникла необхідність перегляду існуючих поглядів на РНК, оскільки виявлено надзвичайну важливість маленьких фрагментів РНК (si-RNA), які управляють багатьма функціями клітини.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощують більше 6 млн. фермерів в 16 країнах на загальній площі 58,7 млн. га: соя - 36,5 млн. га (62%), кукурудза - 12,4 млн. га (21%), бавовник - 6,8 млн. га (12%) (35-кратний приріст порівняно з 1996 р.). Угіддя країн, що розвиваються становлять 27% від загальної площі

2003 р.

Дослідники виявили ген схильності до депресії і наближаються до розгадки взаємозв'язку між генетичними особливостями і шизофренією.

На ринку Північної Америки появляється GloFish - перша трансгенна декоративна тварина - акваріумна рибка, яка світиться червоним в ультрафіолетовому світлі, що досягається завдяки вбудованому гену флуоресціюючого білка коралу.

Вперше клоновані представники вимираючого виду бантенг (*Bos javanicus*), мули, коні і олені.

Вівця Доллі - «героїня» 1997 р. – була піддана евтаназії через прогресуюче захворювання легенів.

Японські біотехнологи розробили перший сорт кави, що не містить кофеїну.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощують близько 7 млн. фермерів в 18 країнах на загальній площі 67,7 млн. га: соя - 41,4 млн. га (61%), кукурудза - 15,5 млн. га (23%), бавовник - 7,2 млн. га (11%) (40-кратний приріст порівняно з 1996 р.). В 2003 р. у цю групу вступили Бразилія, Філіппіни, Індонезія, Китай і Уганда.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Великобританія схвалює впровадження першої біотехнологічної культури, стійкої до гербіцидів - кормової кукурудзи.

Управління з охорони навколишнього середовища США схвалює трансгенну кукурудзу, стійку до комах-шкідників.

2004 р.

Корейські вчені створюють першу лінію ембріональних стовбурових клітин людини, отриману за допомогою перенесення ядра соматичної клітини (терапевтичне клонування).

FDA схвалює перший антиангіогенний препарат для лікування раку Авастин (Avastin (bevacizumab)).

FDA рекомендує першу мінімізовану тест-систему для генотипування «AmpliChip Cytochrome P450 Genotyping Test», використання якої призначене для полегшення підбору лікарських препаратів і встановлення точних діагнозів при великій кількості патологічних станів.

Секвенований геном лабораторного пацюка.

Завершена робота з секвенування геному шимпанзе - примата, що є найближчим родичем людини.

Канадська біотехнологічна компанія Iogen запустила перше промислове виробництво біоетанолу з пшеничної соломи за допомогою біотехнологічних ферментів.

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури вирощують близько 8,25 млн. фермерів в 17 країнах на загальній площі 81,0 млн. га: соя - 48,4 млн. га (60%), кукурудза - 19,3 млн. га (23%), бавовник - 9,0 млн. га (11%) (47-кратний приріст порівняно з 1996 р.).

2005 р.

Вчені університету штату Джорджія успішно клонували корову з соматичної клітини.

Затверджено Акт про політику в області енергетики, що заохочує виробництво біоетанолу.

На основі інформації, отриманої в результаті секвенування ДНК зі збережених зразків тканин, вчені Центрів з контролю і профілактики захворювань США відновили геном штаму вірусу грипу, який у 1918-1919 р. знищив близько 20 млн. чоловік.

Вченим Гарвардського університету за допомогою методу злиття (фузії) з ембріональними стовбуровими клітинами вдалось трансформувати клітини шкіри в плюрипотентні стовбурові клітини.

ВОЗ оприлюднила звіт «Сучасна харчова біотехнологія, здоров'я і розвиток людини». У звіті проаналізовано результати вивчення впливу споживання ГМО на здоров'я людини і зроблено висновки про безпеку дозволених до комерційного використання трансгенних культур. Перехід на біотехнологічні культури може підвищити збір врожаю, якість їжі та різноманіття продуктів, які можна вирощувати в кожному конкретному регіоні. Такі зміни будуть сприяти

Історичні віхи розвитку біотехнології

поліпшенню стану здоров'я і харчування населення, а також підвищенню стандартів здоров'я і життєвого рівня.

Міністерство сільськогосподарства США разом з компаніями Monsanto і Genesee Pharmaceuticals оголосили про початок роботи над спільним проектом з секвенування геному сої.

Сумарна (за 10 років промислового оброблення) площа, на якій вирощувались генетично модифіковані культури, досягла величини в 1 млрд. акрів (400 млн. га).

Глобальна площа, засіяна біотехнологічними культурами, склала 222 млн. акрів (89 млн. га).

2006 р.

Американська асоціація дієтологів опублікувала повторно підтвержену заяву в підтримку сільськогосподарської і харчової біотехнології. Відповідно до заяви, застосування методів сільськогосподарської біотехнології може підвищити якість, безпеку, поживну цінність і різноманітність харчових продуктів з одночасним збільшенням ефективності виробництва, обробки і розподілу продуктів харчування, а також заходів щодо охорони навколишнього середовища і утилізації відходів.

Renessen LLC (спільне підприємство, організоване компаніями Monsanto і Cargill) одержало схвалення Міністерства сільськогосподарства США на продаж насіння першої генетично модифікованої кормової культури. Це Maverica High Value Corn with Lysine - сорт кукурудзи, що відрізняється підвищеним вмістом амінокислоти лізину, яка є важливим компонентом раціону тварин, особливо свиней і домашніх птахів.

Фахівці створили породу біотехнологічних свиней, сало яких містить велику кількість омега-3 жирних кислот. Цей ефект досягнутий шляхом вбудовування в геном свині гену fat-1, виділеного з генома кільчастого черва *Caenorhabditis elegans*. Генетично модифікованих свиней клонували, при цьому в організмі шести з десяти клонів містилась підвищена кількість омега-3 жирних кислот, які запобігають розвитку серцево-судинних захворювань.

Всесвітня торгівельна організація публікує остаточне конфіденційне рішення в справі США/Канада/Аргентина проти Євросоюзу з приводу схвалення біотехнологічних культур. Відповідно до рішення, Євросоюз повинен змінити свої комерційні зобов'язання з урахуванням появи 21 сільськогосподарського біотехнологічного продукту, у тому числі сортів олійного рапсу, кукурудзи і бавовни.

2007 р.

Створена повна модель обміну речовин у людини. Така титанічна робота проведена вперше. Вченим під керівництвом професора Бернарда Палссоном (Bernhard Palsson) вдалося зібрати дані і створити базу, що включає 3300 різних хімічних реакцій обміну речовин. Встановлено, що основним регулятором репродуктивної функції жіночого організму є ген EAP1, який знаходиться в 14-й хромосомі. Знайдено спосіб диференціювання

Історичні віхи розвитку біотехнології

мезенхімальних стовбурових клітин в клітини кісткової тканини без застосування хімічного впливу, тобто тільки за рахунок зміни нанорозмірних характеристик поверхні заготовки майбутньої кістки.

Нобелівську премію з фізіології і медицини за 2007 рік отримали Маріо Капеккі, Олівер Сміттс і Мартін Еванс «за відкриття принципів впровадження специфічних модифікацій генів у мишей з використанням ембріональних стовбурових клітин». Застосування так званих біочипів, що містять тривимірні культури клітин різних тканин, дозволяє уникнути тестування лікарських і косметичних препаратів на тваринах. Нова методика була спільно розроблена дослідниками з Rensselaer Polytechnic Institute, University of California at Berkeley і Solidus Biosciences Inc. (США).

Дослідники з Ірландського Центру Дослідження Раку (Cancer Center of University Hospitals Case Medical Center) виявили, що при трансфекції певним геном стовбурових клітин пацієнта, який страждав від онкологічного захворювання, організм такого пацієнта стає більш стійким до хіміотерапії. Даний метод дозволяє застосовувати жорстку хіміотерапію з найменшими побічними ефектами.

Дослідники з університету Rey Juan Carlos Universidad (Іспанія) розробили нові біосумісні полімерні матеріали, які можуть у перспективі широко застосовуватись в хірургії та трансплантології в якості біодеградованих полімерних матриць.

2008 р.

Міждисциплінарна група дослідників з Медичного Центру Університету у Стоуні - Брук (Stony Brook University Medical Center) (США) виявила сімейство генів, пов'язаних з розвитком раку печінки, або так званої гепатоцелюлярної карциноми. Керівником роботи Wadie F. Bahou і його колегами було показано в експериментах на мишах, що втрата одного специфічного гена (*Iqgap2*) призводить до розвитку гепатоцелюлярної карциноми, а гіперекспресія іншого гена з цієї ж родини (*Iqgap1*) впливає на розвиток найбільш агресивної форми цієї неоплазії.

Розроблено новий клас синтетичних молекул - пептоїдів, що мають високу антимікробну активність. В даний час пептоїди тестують на моделях бактеріальних інфекцій тварин.

Американські вчені розробили новий метод запису бінарного коду в ДНК, заснованого на фрагментації її молекули, який не вимагає використання секвенування.

У США оголошено про технологічний прорив у справі створення «зеленого бензину», що виробляється з рослинної сировини. Університет Массачусетс в Амхерсті (University of Massachusetts - Amherst) повідомив про розробку методу прямої переробки целюлози в основні компоненти автомобільного бензину.

Група дослідників із Університету Чикаго (University of Chicago) розшифрувала тривимірну структуру білка, який відновлює ДНК пухлинних

Історичні віхи розвитку біотехнології

клітин у разі її ушкоджень, репаруючи ті, які можуть бути результатом протиракової терапії.

Дослідники з Carnegie Mellon University виявили недоліки стандартних методів, які використовуються для аналізу еволюції генів. Ці методи не працюють у разі генів, що кодують мультидоменні білки. У роботі, яку очолив фахівець з комп'ютерного моделювання в області біології Денні Дюран (Dannie Durand), було вперше показано, яким чином вивчати еволюцію мультидоменних генів і білків.

Дослідники з Schepens Eye Research Institute (США) виявили в тканинах мозку специфічні молекули, необхідні для активації стовбурових клітин, які можуть давати початок нейронам і відновлювати таким чином ушкоджену нервову тканину.

2009 р.

Вчені з Бостонського університету та Національного Інституту Здоров'я в США (NIH) розробили новий метод виявлення функціональних областей геному, заснований на вивченні просторової структури ДНК.

Дослідники з Медичної Школи при Університеті Пенсільванії (University of Pennsylvania School of Medicine) у США відтворили в лабораторних умовах живу нервову тканину, яка підходить для трансплантації і сприяє регенерації ушкоджених нервів.

Вченим вдалося розробити метод передачі сигналу через штучну ліпідну мембрану, подібну мембрані живої клітини, використовуючи кремнієві нанотрубки товщиною 20-40 нанометрів.

Група дослідників з Університету Уельва (Іспанія) розробила екологічно безпечне машинне (консистентне) мастило на основі рицинової олії і похідних целюлози.

Вчені з Університету Торонто (University of Toronto, UofT) використали наноматеріали для розробки високочутливого чіпу, за допомогою якого можна визначати тип і ступінь тяжкості онкологічного захворювання на ранніх стадіях процесу.

Біоінженер *Франк Алексіс* (Frank Alexis) з Університету Клемсона в США (Clemson University) розробив нові, більш безпечні способи транспортування лікарських препаратів в організм.

2010 р.

Компанія Bionic Vision Australia (BVA) розробила концепцію протезу сітчастої оболонки ока, або так званого «біонічного ока», який дозволить зберегти зір людям з дегенеративними або спадковими захворюваннями сітківки.

Інженери з Каліфорнійського Університету в Берклі (University of California) розробили чутливий до тиску електронний матеріал з напівпровідникових нанодротів, здатний в майбутньому стати основою штучної шкіри.

2011 р.

Історичні віхи розвитку біотехнології

Іспанські вчені виявили штам бактерій - пробіотиків, які проявляють здатність до загоювання виразки епітелію шлунка та дванадцятипалої кишки, спричинену мікроорганізмом *Helicobacter pylori*.

Вчені з Малайзії дослідили можливість виявлення пестицидів за допомогою квантових точок ZnCdSe, про що було повідомлено на сторінках журналу *Advances in Natural Sciences : Nanoscience and Nanotechnology*.

2012 р.

Канадські біологи розробили методику одержання білків - ферментів людини у кукурудзі. Новий підхід дозволить здешевити виробництво препаратів ферментозамінної терапії для лікування лізосомних хвороб накопичення.

2013 р.

Дослідники з Оксфордського Університету (Oxford University, Велика Британія) представили тривимірний принтер, здатний створювати матеріали з деякими властивостями живих тканин.

Вчені з Університету Міссурі (University of Missouri, США) створили компактне джерело рентгенівського та інших видів випромінювання, який наближає час появи ручних сканерів (або трікордерів - універсальних приладів, які дозволяють проводити різні вимірювання).

Перелік найуживаніших стандартів, що використовуються у лабораторній практиці із вивчення біотехнології в агросфері

ЗАГАЛЬНІ ДОКУМЕНТИ

ДСТУ 2881-94. Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення.

ДСТУ 2636 -94. Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3803-98. Біотехнологія. Терміни і визначення.

ДСТУ 2424-94. Промислова мікробіологія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3180-95. Пестициди. Терміни та визначення.

ДСТУ 4756:2007. Захист рослин. Терміни та визначення понять.

ДСТУ 7066:2009. Генетичні ресурси рослин. Терміни та визначення

понять.

ISO Guide 64:2008. Руководство по включению экологических вопросов в стандарты на продукцию.

ISO/IEC Guide 51:1999. Аспекты безопасности. Руководящие указания по включению их в стандарты.

ISO 29701:2010. Нанотехнологии. Испытания эндотоксинов на образцах наноматериалов для систем in vitro. Испытание *Limulus amoebocyte lysate* (LAL).

ISO 5479:1997. Статистическая обработка данных. Критерии отклонения от нормального распределения.

ISO 10012:2003. Системы менеджмента измерений. Требования к измерительным процессам и измерительному оборудованию.

ГОСТ 17.0.0.01-76. Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения.

ДСТУ 2681-94. Метрологія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3518-97. Термометрія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3647-97. Ваги та дозатори вагові. Терміни та визначення.

ДСТУ EN 472:2004. Манометри. Словники термінів (EN 472:1994, IDT).

ISO 14001:2004. Системы экологического менеджмента. Требования и руководство по применению.

ДСТУ ISO 9000 – 2001. Системи управління якістю. Основні положення та словник.

ДСТУ ISO 9001 – 2001. Системи управління якістю. Вимоги.

ДСТУ 3410 – 96. Система сертифікації УкрСЕПРО. Основні положення.

ГОСТ 28471-90. Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.

Перелік найуживаніших стандартів

ГОСТ 17.0.0.01-76. Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения

ГОСТ 17.0.0.04-90. Охрана природы. Экологический паспорт промышленного предприятия. Основные положения

ПРИЛАДИ І ОБЛАДНАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

ДСТУ ISO 9334:2005. Оптика та оптичні прилади. Функція передатна оптична. Визначення понять та математичні співвідношення (ISO 9334:1995, IDT).

ДСТУ ГОСТ 4.450:2009 СПКП. Приборы и аппаратура для спектрального анализа. Номенклатура показателей (ГОСТ 4.450-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 20903:2009. Кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров. Основные размеры. Технические требования (ГОСТ 20903-75, IDT)

ДСТУ ІЕС 61010-2-051:2007. Вимоги безпеки до електричного обладнання для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-051. Вимоги до лабораторного обладнання для розмішування та збовтування (ІЕС 61010-2-051:2005, IDT)

ГОСТ 26703-93. Хроматографы аналитические газовые. Общие технические требования и методы испытаний.

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT)

ДСТУ-Н ISOGuide 34:2006. Загальні вимоги до компетентності виробників стандартних зразків (ISOGuide 34:2000, IDT)

ГОСТ 200-76. Натрий фосфорноватистокислый 1-водный. Технические условия.

ГОСТ 3118-77. Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 28366-89. Реактивы. Метод тонкослойной хроматографии.

ДСТУ 2870-94. Метрологія. Вимірювання часу та частоти. Терміни та визначення.

ГОСТ 27681-88. Спектрометры гамма-резонансные. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 27176-86. Приборы спектральные оптические. Термины и определения.

ГОСТ 14686-69. Средства измерений световых величин. Термины.

ГОСТ 11200-75. Объективы и тубусы микроскопов. Присоединительные размеры.

Перелік найуживаніших стандартів

ГОСТ 8.298-78 ГСИ. Колориметры фотоэлектрические лабораторные. Методы и средства поверки

ГОСТ 4.452-86 СПКП. Приборы фотометрические. Номенклатура показателей

ГОСТ 10771-82. Лампы накаливания светоизмерительные рабочие. Технические условия.

ГОСТ 4.451-86 СПКП. Микроскопы световые. Номенклатура показателей
ГОСТ 9.048-89. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов.

ГОСТ 6672-75. Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия.

ГОСТ 9284-75. Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия.

ГОСТ 14919-83. Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.

ТУ 4215-051-89650280. Измерительная техника. Назначение и область применения.

ДБН В.2.5.-28-2006. Природне і штучне освітлення.

ГОСТ 11292-65. Изделия электротехнические. Требования безопасности.

ТУ 25-06.1101-79. Весы лабораторные.

ДСТУ EN 45501:2007. Прилади неавтоматичні зважувальні. Загальні технічні вимоги та методи.

ТУ 64-1- 3329-81. Дозаторы пипеточные.

ГОСТ 14919-83. Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.

ДСТУ EN 61010-2-043-2001 Требования безопасности к электрическому оборудованию для измерения, управления и лабораторного использования. Часть 2-043. Особые требования к стерилизаторам, использующим сухой жар горячего воздуха или горячего инертного газа для обработки медицинских материалов и для проведения лабораторных процессов (EN 61010-2-043:1997, IДТ).

ДСТУ 3152-95. Автоклавы продовольственные. Общие технические требования и требования безопасности.

ГОСТ МЭК 61010-2-041-2002. Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Часть 2-041. Частные требования к лабораторным автоклавам, в том числе использующим пар для обработки медицинских материалов.

ГОСТ 4.164-85 СПКП. Анализаторы радиоспектрометрические. Номенклатура показателей.

ГОСТ 4.170-85 СПКП. Анализаторы аэрозолей твердых и сыпучих веществ. Номенклатура показателей.

Перелік найуживаніших стандартів

ГОСТ 4.319-85 СПКП. Приборы и аппараты лабораторные из стекла, кварца и фарфора. Номенклатура показателей.

ГОСТ 8.221-76 ГСИ. Влагометрия и гигрометрия. Термины и определения.

ГОСТ 8.472-82 ГСИ. Гигрометры пьезосорбционные. Методы и средства поверки.

ГОСТ 6859-72. Приборы для отмеривания и отбора жидкостей. Технические условия.

ГОСТ 7995-80. Краны соединительные стеклянные. Технические условия.

ГОСТ 13350-78. Анализаторы жидкости кондуктометрические. ГСП. Общие технические условия.

ГОСТ 15624-75. Масс-спектрометры. Термины и определения.

ГОСТ 16851-71. Анализаторы жидкости. Термины и определения.

ГОСТ 16865-79. Аппаратура для рентгеноструктурного и рентгеноспектрального анализиров. Термины и определения.

ГОСТ 18325-80. Мебель лабораторная для работы с радиоактивными веществами. Общие технические требования.

ГОСТ 22018-84. Анализаторы растворенного в воде кислорода амперометрические ГСП. Общие технические требования.

ГОСТ 24104-88. Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 29024-91. Анализаторы жидкости турбидиметрические и нефелометрические. Общие технические требования и методы испытаний

ДСТУ 2605-94 Аналізатори газів. Шлангові та нарізні з'єднання. Основні параметри та приєднувальні розміри.

ДСТУ 2607-94 Системи вимірювальні газоаналітичні. Загальні технічні вимоги.

ДСТУ 3929-99 Індикатори горючих газів і парів термохімічні. Загальні технічні умови.

ДСТУ ГОСТ 4.450:2009 СПКП. Приборы и аппаратура для спектрального анализа. Номенклатура показателей (ГОСТ 4.450-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 8.229:2008 Спектрофотометры инфракрасные. Методы и средства поверки (ГОСТ 8.229-81, IDT).

ДСТУ ГОСТ 8.258:2008 ГСИ. Поляриметры и сахариметры. Методика поверки (ГОСТ 8.258-77, IDT).

ДСТУ ГОСТ 8.354:2008 ГСИ. Анализаторы жидкости кондуктометрические. Методика поверки (ГОСТ 8.354-85, IDT).

ДСТУ ГОСТ 13320:2008. Газоанализаторы промышленные автоматические. Общие технические условия (ГОСТ 13320-81, IDT).

ДСТУ ГОСТ 17792:2009. Электрод сравнения хлорсеребряный насыщенный образцовый 2-го разряда (ГОСТ 17792-72, IDT).

ДСТУ ГОСТ 20903:2009. Кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров. Основные размеры. Технические требования (ГОСТ 20903-

Перелік найуживаніших стандартів

75, IDT).

ДСТУ ГОСТ 22171:2009. Анализаторы жидкости кондуктометрические лабораторные. Общие технические условия (ГОСТ 22171-90, IDT).

БЕЗПЕКА РОБОТИ В БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

ДНАОП 0.00 - 1.21 Правила безпечної експлуатації електроустановок-споживачів.

ДСТУ 2867-94. Шум. Методи оцінювання виробничого шумонавантаження. Загальні вимоги.

ДСТУ 3191-95. Обладнання для кондиціонування повітря та вентиляції. Загальні вимоги безпеки.

ГОСТ 12.1.018-93 ССБТ. Пожаро- и взрывобезопасность статического электричества. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.012-90 ССБТ. Вибрационная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление.

ГОСТ 12.2.003-91 ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.2.007.0-75 ССБТ. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.2.062-81 ССБТ. Оборудование производственное. Ограждения защитные.

ГОСТ 12.4.026-76 ССБТ. Цвета сигнальные и знаки безопасности.

ГОСТ 10616 -90. Вентиляторы радиальные и осевые. Размеры и параметры.

ГОСТ 14254-96 Степени защиты, обеспечиваемые оболочками

ГОСТ 21130-75. Изделия электротехнические. Зажимы заземляющие и знаки заземления. Конструкция и размеры.

ГОСТ 6433.2-71. Материалы электроизоляционные твердые. Методы определения электрического сопротивления при постоянном напряжении.

ДНАОП 0.00 - 1.18-98. Правила будови, виготовлення, монтажу, ремонту і безпечної експлуатації вибухозахищених вентиляторів.

ДНАОП 0.00-1.21-98. Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів.

ДНАОП 0.00-4.12-99. Типове положення про навчання з питань охорони праці.

ДНАОП.0.00-1.32-01. Правила будови електроустановок. Електрообладнання спеціальних установок.

НАПБ А.01.001-95. Правила пожежної безпеки в Україні.

СНиП 2.04.05-91. Отопление, вентиляция и кондиционирование.

СНиП 3.05.01-85. Внутренние санитарно-технические системы.

СНиП II-4-79. Естественное и искусственное освещение.

Перелік найуживаніших стандартів

ГОСТ 12.3.00275. Система стандартів безпеки праці.

ГОСТ 12.1.008-76. Биологическая безопасность. Общие требования.

ДСП 9.9.5.080-2002. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю.

ДСП №9.9.5-064-2000. Порядок видачі дозволів на роботу з мікроорганізмами I-IV груп патогенності та рекомбінантними молекулами ДНК. Водопровідна вода повинна відповідати вимогам ГОСТ 2874-82 і ДСанПіНу № 136/140 від 15.04.97.

Умови очищення і скидання стічних вод повинні відповідати вимогам. Водного кодексу України та інших чинних нормативних актів.

Електропроводи, електрообладнання та їх експлуатація повинні відповідати вимогам Правил улаштування електроустановок (ПУЕ), Правил технічної експлуатації електроустановок споживачів (ПТЕ) і ДНАОП 0.00-1.21-98, а газове господарство ДНАОП 0.00-1.20-98.

Експлуатація обладнання, що працює під тиском, повинна відповідати вимогам ДНАОП 0.00-1.07-94.

Експлуатація електронно-обчислювального обладнання повинна відповідати вимогами правил, затверджених наказом Держнаглядохоронпраці від 10.02.99 №21.

Протипожежні правила безпеки в лабораторіях (установі) необхідно складати з урахуванням ГОСТ 12.1.004-76

Вимоги до планування приміщень мікробіологічних лабораторій викладені в СН 535-81, СанПіН 5179-90.

Рівні шуму у виробничих приміщеннях повинні відповідати вимогам ДСН 3.3.6.037-99, а рівні вібрації - ДСН 3 3.6.039-99.

ДСТУ-Н ІЕС Guide 109:2006. Екологічні аспекти для внесення в стандарти на електротехнічні вироби (ІЕС Guide 109:2003, ІДТ).

ДСТУ-Н ІЕС Guide 113:2007. Анкети декларування матеріалів. Основоположні настанови (ІЕС Guide 113:2000, ІДТ).

ДСТУ-Н ІЕС Guide 114:2007. Проектування із врахуванням екологічних вимог. Екологічні аспекти, які треба враховувати під час проектування та розроблення електротехнічних виробів (ІЕС Guide 114:2005, ІДТ).

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-010:2004. Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-010. Окремі вимоги до лабораторного устаткування для нагрівання матеріалів (ГОСТ МЭК 61010-2-010-2002, ІДТ).

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-020:2004. Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-020. Окремі вимоги до лабораторних центрифуг (ГОСТ МЭК 61010-2-020-2002, ІДТ).

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-051:2004. Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-051. Окремі вимоги до лабораторного устаткування для перемішування та

Перелік найуживаніших стандартів

збовтування (ГОСТ МЭК 61010-2-051-2002, IDT).

ДСТУ ГОСТ МЭК 61010-2-061:2004. Безпечність електричного обладнання для вимірювання, керування і лабораторного застосування. Частина 2-061. Окремі вимоги до лабораторних атомних спектрометрів з термічною атомізацією та іонізацією (ГОСТ МЭК 61010-2-061-2002, IDT).

ДСТУ EN 61010-2-010:2005 Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-010. Додаткові вимоги до лабораторного устаткування для нагрівання матеріалів (EN 61010-2-010:1994, IDT)

ДСТУ EN 61010-2-020:2005. Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-020. Додаткові вимоги до лабораторних центрифуг (EN 61010-2-020:1994, IDT).

ДСТУ IEC 61010-1:2005. Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 1. Загальні вимоги (IEC 61010-1:2001, IDT).

ДСТУ IEC 61010-2-051:2007. Вимоги безпеки до електричного обладнання для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-051. Вимоги до лабораторного обладнання для розмішування та збовтування (IEC 61010-2-051:2005, IDT).

ДСТУ IEC 61010-2-061:2007. Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-061. Додаткові вимоги до лабораторних атомних спектрометрів з тепловою атомізацією та іонізацією (IEC 61010-2-061:2005, IDT).

ДСТУ IEC 61010-2-081:2008. Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 2-081. Додаткові вимоги до автоматичного й напівавтоматичного лабораторного устаткування для аналізування та інших потреб (IEC 61010-2-081:2001, IDT).

ДСТУ IEC/TR 61010-3-031:2007. Вимоги безпеки до електричного устаткування для вимірювання, керування та лабораторного застосування. Частина 3-031. Звіт щодо оцінювання відповідності згідно з IEC 61010-031:2002 (IEC/TR 61010-3-031:2003, IDT).

НОРМАТИВНІ ДОКУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ПРИ ВИВЧЕННІ ДИСЦИПЛІНИ «БІОТЕХНОЛОГІЯ В АГРОСФЕРІ»

ДСТУ 2881-94. Екологія мікроорганізмів. Терміни та визначення.

ДСТУ 2636 -94. Загальна мікробіологія. Терміни та визначення.

ДСТУ 3803-98. Біотехнологія. Терміни і визначення.

ISO Guide 64:2008. Руководство по включению экологических вопросов в стандарты на продукцию.

ISO 14001:2004. Системы экологического менеджмента. Требования и руководство по применению.

Перелік найуживаніших стандартів

ДСТУ ISO 9000 – 2001. Системи управління якістю. Основні положення та словник.

ДСТУ ISO 9001 – 2001. Системи управління якістю. Вимоги.

ДСТУ 3410 – 96. Система сертифікації УкрСЕПРО Основні положення.

ГОСТ 28471-90. Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.

ГОСТ 17.0.0.01-76. Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения.

ГОСТ 17.0.0.04-90. Охрана природы. Экологический паспорт промышленного предприятия. Основные положения.

ДСТУ ISO Guide 64:2010. Настанови щодо враховування екологічних питань у стандартах на продукцію (ISO Guide 64:2008, IDT).

ГОСТ 4.164-85 СПКП. Анализаторы радиоспектрометрические. Номенклатура показателей.

ГОСТ 4.170-85 СПКП. Анализаторы аэрозолей твердых и сыпучих веществ. Номенклатура показателей.

ГОСТ 4.319-85 СПКП. Приборы и аппараты лабораторные из стекла, кварца и фарфора. Номенклатура показателей.

ГОСТ 8.221-76 ГСИ. Влагодетерминация и гигрометрия. Термины и определения.

ГОСТ 8.472-82 ГСИ. Гигрометры пьезосорбционные. Методы и средства поверки

ГОСТ 6859-72. Приборы для отмеривания и отбора жидкостей. Технические условия.

ГОСТ 7995-80. Краны соединительные стеклянные. Технические условия.

ГОСТ 13350-78. Анализаторы жидкости кондуктометрические. ГСП. Общие технические условия

ГОСТ 15624-75. Масс-спектрометры. Термины и определения.

ГОСТ 16851-71. Анализаторы жидкости. Термины и определения.

ГОСТ 16865-79. Аппаратура для рентгеноструктурного и рентгеноспектрального анализиров. Термины и определения.

ГОСТ 18325-80. Мебель лабораторная для работы с радиоактивными веществами. Общие технические требования.

ГОСТ 22018-84. Анализаторы растворенного в воде кислорода амперометрические ГСП. Общие технические требования.

ГОСТ 24104-88. Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 26703-93. Хроматографы аналитические газовые. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 29024-91. Анализаторы жидкости турбидиметрические и нефелометрические. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 4.321-85 СПКП. Посуда и оборудование лабораторные из кварца и

Перелік найуживаніших стандартів

фарфора. Номенклатура показателів.

ГОСТ 8.269-77 ГСИ. Бюретки измерительные стеклянные для химических неавтоматических газоанализаторов. Методы и средства поверки.

ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 7329-91. Изделия из стекла химико-лабораторного и электровакуумного. Метод поляризационно-оптического измерения разности хода лучей.

ГОСТ 7851-74. Посуда стеклянная химико-лабораторная. Горловины. Внутренние диаметры.

ГОСТ 8682-93 (ИСО 383-76). Посуда лабораторная стеклянная. Шлифы конические взаимозаменяемые.

ГОСТ 9147-80. Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 9737-93 (ИСО 641-75). Посуда лабораторная стеклянная. Шлифы сферические взаимозаменяемые.

ГОСТ 12738-77. Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия.

ГОСТ 18954-73. Прибор и пипетки стеклянные для отбора и хранения проб газа. Технические условия.

ГОСТ 19908-90. Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия.

ГОСТ 21400-75. Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 23932-90. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия.

ГОСТ 25336-82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 28165-89. Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования.

ГОСТ 29044-91 (ИСО 384-78). Посуда лабораторная стеклянная. Принципы устройства и конструирования мерной посуды.

ГОСТ 29169-91 (ИСО 648-77). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.

ГОСТ 29224-91 (ИСО 386-77). Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения.

ГОСТ 29225-91 (ИСО 1775-75). Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные. Общие требования и методы испытаний

ГОСТ 29226-91. Вискозиметры жидкостей. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки

Перелік найуживаніших стандартів

градуированные. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 29228-91 (ИСО 835-2-81). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания.

ГОСТ 29229-91 (ИСО 835-3-81). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 3. Пипетки градуированные с временем ожидания 15 с.

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4-81). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.

ГОСТ 29251-91 (ИСО 385-1-84). Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 29252-91 (ИСО 385-2-84). Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 2. Бюретки без времени ожидания.

ГОСТ 29253-91 (ИСО 385-3-84). Посуда лабораторная стеклянная. Бюретки. Часть 3. Бюретки с временем ожидания 30 с.

ДСТУ 2215-93. Розчини та індикатори. Терміни та визначення.

ДСТУ 2216-93. Реактиви та особливо чисті речовини. Позначення та методи визначення чистоти. Терміни та визначення.

ДСТУ ГОСТ 8.531-2003. Метрологія. Стандартні зразки складу монолітних та дисперсних матеріалів. Способи оцінювання однорідності (ГОСТ 8.531-2002, IDT).

ДСТУ ГОСТ 8.532-2003. Метрологія. Стандартні зразки складу речовин і матеріалів. Міжлабораторна метрологічна атестація. Зміст і порядок проведення робіт (ГОСТ 8.532-2002, IDT).

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008. Реактиви и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT).

ДСТУ ГОСТ 22001:2008. Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-абсорбционной спектрометрии определения примесей химических элементов (ГОСТ 22001-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27025:2009. Реактивы. Общие указания по проведению испытаний (ГОСТ 27025-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27026:2009. Реактивы. Определение нелетучего остатка (ГОСТ 27026-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27184:2009. Реактивы. Определение остатка после прокаливания (ГОСТ 27184-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27565:2008. Вещества особо чистые. Концентрирование микропримесей методом упаривания (ГОСТ 27565-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27566:2008. Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 28687:2009. Реактивы. Метод определения пероксидов в органических растворителях (ГОСТ 28687-90, IDT).

ДСТУ ГОСТ 28738:2009. Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT).

Перелік найуживаніших стандартів

ДСТУ ISO 3696-2003. Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT).

ДСТУ-Н ISO Guide 31:2008. Метрологія. Стандартні зразки. Зміст сертифікатів і етикеток (ISO Guide 31:2000, IDT).

ДСТУ-Н ISO Guide 34:2006. Загальні вимоги до компетентності виробників стандартних зразків (ISO Guide 34:2000, IDT).

ДСТУ-Н ISO Guide 35:2006. Атестація стандартних зразків. Загальні та статистичні принципи (ISO Guide 35:1989, IDT).

ГОСТ 8.134-98 ГСИ. Шкала рН водних розтворів.

ГОСТ 8.315-97 ГСИ. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения.

ДСТУ ГОСТ 4919.2:2008. Реактиви и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов (ГОСТ 4919.2-77, IDT).

ДСТУ ГОСТ 22001:2008. Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-абсорбционной спектрометрии определения примесей химических элементов (ГОСТ 22001-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27025:2009. Реактивы. Общие указания по проведению испытаний (ГОСТ 27025-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27026:2009. Реактивы. Определение нелетучего остатка (ГОСТ 27026-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27184:2009. Реактивы. Определение остатка после прокаливания (ГОСТ 27184-86, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27565:2008. Вещества особо чистые. Концентрирование микропримесей методом упаривания (ГОСТ 27565-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 27566:2008. Реактивы и особо чистые вещества. Метод атомно-эмиссионной спектроскопии для определения примесей химических элементов в жидкофазных веществах (ГОСТ 27566-87, IDT).

ДСТУ ГОСТ 28687:2009. Реактивы. Метод определения пероксидов в органических растворителях (ГОСТ 28687-90, IDT).

ДСТУ ГОСТ 28738:2009 Реактивы. Методы определения примеси общей серы в органических растворителях (ГОСТ 28738-90, IDT).

ДСТУ ISO 3696-2003. Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевірення (ISO 3696:1987, IDT).

ДСТУ ISO 9998:2005. Якість води. Настанови щодо оцінювання та підрахування колоній мікроорганізмів на середовищі, яке використовують для визначення якості води (ISO 9998:1991, IDT).

ГОСТ 248-81. Вода питьевая. Полевые методы санитарно-микробиологического анализа.

ДСТУ ISO 9887-2002. Якість води. Оцінювання здатності до аеробного біологічного розкладання органічних сполук у водному середовищі. Напівбезперервний метод із використанням активного мулу (ISO 9887:1992, IDT).

Перелік найуживаніших стандартів

ДСТУ ISO 10712-2003. Якість води. Тест на пригнічення росту *Pseudomonas putida* (тест на пригнічення розмноження клітин *Pseudomonas*) (ISO 10712:1995, IDT).

ДСТУ ISO 14507:2005. Якість ґрунту. Попереднє оброблення проб для визначення органічних забруднювальних речовин (ISO 14507:2003, IDT).

ДСТУ ISO 4225:2008. Якість повітря. Загальні положення. Словник термінів (ISO 4225:1994, IDT).

ГОСТ 24481-80. Вода питьевая. Отбор проб.

ДСТУ ISO 17616:2010. Якість ґрунту. Настанови щодо вибору та оцінювання методів біологічних аналізів для екотоксикологічного характеризування ґрунтів і ґрунтових матеріалів (ISO 17616:2008, IDT).

ДСТУ ISO 14001:2006. Системи екологічного керування. Вимоги та настанови щодо застосовування.

ДСТУ ISO 14004-97. Системы управления окружающей средой. Общие руководящие указания по принципам управления, системам и средствам обеспечения.

ДСТУ ISO 14004:2006. Системи екологічного управління. Загальні настанови щодо принципів, систем та засобів безпеки.

ДСТУ ISO 14001-97. Системы управления окружающей средой. Состав и описание элементов, руководящие указания по их применению

ДБН А.2.2-1-2003 Проектування. Склад і зміст матеріалів оцінки впливів на навколишнє середовище (ОВНС) при проектуванні і будівництві підприємств, будинків і споруд

Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів. Методичні вказівки

ДСанПіН 9.9.5-153-2008 Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами

Перелік найуживаніших стандартів

Література

1. Биотехнология растений: культура клеток. Под ред. Бутенко Р.Г. М.: ВО «Агропромиздат», 1989. – 280 с.
2. Божков А.И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. Харьков, 2008. – 363 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБк-Пресс, 1999 – 259 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных клеток и физиология морфогенеза растений. М.: Изд-во Наука, 1964. – 271 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. – 589 с.
6. Дрейпер Дж., Скот Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. М.: Мир, 1991 – 270 с.
7. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.:Academia, 2006. – 208 с.
8. Жученко А.А. Экологическая генетика. М.: Агрорус, 2004. – 340 с.
9. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. М.: ОНИКС, 2009. – 493 с.
10. Калашникова Е.Б., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. – 144 с.
11. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2003. – 400 с.
12. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии // [www. biotechnology. ru](http://www.biotechnology.ru).
13. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. К., Наукова думка, 1997. - 152 с.
14. Кушнір, В.В. Сарнацька. Мікроклональне розмноження рослин. К., Наукова думка, 2005. - 528 с.
15. Левенко Б.А. Трансгенные растения. Современное состояние. Проблемы. Перспективы. К., 2000. – 305 с.
16. Лутова Л.А. Генетическая инженерия: свершения и надежды //Соросовский образовательный журнал, 2000. - № 10. – С.10-17.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – 479 с.
18. Мельничук М.Д., Григорюк І.П., Новак Т.В., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Спиридонов В.Г., Клюваденко А.А., Антіпов І.О., Оверченко В.В. Біотехнологія рослин. Практикум. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012.–215 с.
19. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Антіпов І.А. Біотехнологія. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 350 с.
20. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Коломієць Ю.В., Антіпов І.А. Біотехнологія. Практикум. К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. – 150 с.
21. Мельничук Д.О., Мельничук С.Д., Калачнюк Л.Г., Шевряков М.В., Калачнюк Г.І. Біохімія. Практикум. К., НУБіП України, 2012. – 528 с.

Література

22. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.О. Біотехнологія рослин. К., Поліграфконсалтинг, 2003. – 512 с.
23. Ментел С., Смит Г. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М., Агропромиздат, 1987 – 302 с.
24. Пирузян С.С. Основы генетической инженерии растений. М., Наука, 1986. – 260 с.
25. Сельскохозяйственная биотехнология. Под ред. Шевелухи В.С. М.: Высшая школа, 2008. – 708 с.
26. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. К.:Наукова думка, 1990. – 270 с.
27. Шевелуха В.С., Калашникова А.Е., Кочиева Е.А. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Высшая школа, 2008. – 710 с.
28. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск, Сибирское университетское изд-во, 2004. – 380 с.
29. R. A. Dixon. Plant cell culture a practical approach. Oxford – Washington, 1987, 236 p.
30. Nucleic acid hybridization, a practical approach. Edited by B. D. Hames and S. I. Higgins. IRL Press Oxford – Washington DC, 1985. – 245 p.