

КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

КАФЕДРА ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА БІОРІЗНОМАНІТТЯ

Біотехнологія рослин

Курс лекцій

Спеціальність 8. 092903 - Екобіотехнологія

Київ - 2009

УДК 631.147: 378.022

Викладено курс лекцій. Видання розраховане на студентів спеціальності 8.092903 - Екобіотехнологія.

Рекомендоване Вченою радою ННІ охорони природи та біотехнології Національного університету біоресурсів та природокористування України (протокол № 5 від 8 травня 2009 р.)

Укладачі: Кляченко О.Л., канд. біол. наук, доцент

Рецензенти: Панюта О.О., доцент, канд. біол. наук

Бойко О.О., доцент, канд.біол. наук

Навчальне видання

Біотехнологія рослин

Укладач: КЛЯЧЕНКО ОКСАНА ЛЕОНІДІВНА, канд. біол. наук, доцент

Відповідальний за випуск Кляченко О.Л.

Видавництво Українського фітосоціоцентру

03028, Київ - 28, а. с. 2

Підписано до друку 11.05.2009р. Формат 60 x 84 1/16. Друк різнографічний.

Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Тираж 100 прим.

Умов. друк. арк. 2,47. Зам. №697\3.

Надруковано в друкарні

Українського фітосоціологічного центру

Лекція 1

Предмет та методи біотехнології

План лекції

1. Історія розвитку біотехнології
2. Предмет біотехнології
3. Основні проблеми біотехнології стосовно рослинництва
4. Основні методи, які використовуються в біотехнології рослин.
5. Короткий словник біотехнологічних термінів.

Термін біотехнологія появився приблизно 30 років тому. Серед вчених і спеціалістів немає єдиного точного визначення поняття „біотехнологія” можна сказати, що біотехнологія вивчає методи одержання корисних для людини продуктів в керованих умовах, використовуючи мікроорганізми, клітини. Ріст численності населення нашої планети і збільшення споживання тварин і рослин або ізольовані із клітин біологічні структури.

Ріст численності населення нашої планети і збільшення споживання природних ресурсів не дозволяють розвивати народне господарство традиційними методами. Необхідно збільшити продуктивність як агросфери - головного джерела живлення, кормів і сировини для переробної промисловості, так і техносфери. Використання наукових досягнень в біотехнології тісно пов'язане з фундаментальними дослідженнями на самому високому рівні сучасної науки. Передумовою появи біотехнології як науки послужили успіхи таких наук як молекулярна біологія, мікробіологія, генетика біохімія, хімія, цитологія, електроніка, біофізика, біохімічна технологія, хімічна технологія, механічна технологія, технологія харчової промисловості, наукові основи одержання продуктів. Не всі ці галузі науки вносять свій вклад в здійснення кожного технологічного процесу або в одержання того чи іншого продукту, але як правило таких галузей декілька.

В промисловому масштабі, біотехнологія являє собою біоіндустрію, яка включає в себе з однієї сторони галузі, в яких біотехнологічні методи замінюють традиційні методи, а з другої – галузі, де біотехнологія відіграє провідну роль. Людина користувалась біотехнологією багато тисяч років. Наші предки займались пивоварінням, пекли хліб. Здатність дріжджів утворювати спирт в цукровмісних розчинах знали шумери і вавілонці за шість тисяч років до нашої ери. Єгиптяни почали використовувати дріжджі для випічки хліба в четвертому тисячолітті до н. ери. Наші предки не мали уяви про процеси, які лежали в основі таких технологій. Люди користувались одноклітинними мікроорганізмами і реакціями їх обміну в анаеробних умовах, не підозрюючи про їх існування. Знайомство людини з мікросвітом, а також усвідомлення незамінності мікроорганізмів в само регульованих механізмах стали можливими завдяки відкриттям французького вченого Луї Пастера, який в кінці 19 століття встановив, що мікроби відіграють

ключову роль в процесах бродіння і показав, що в утворенні окремих продуктів беруть різні їх види. Його дослідження послужили реальною передумовою подальшого розвитку прикладної мікробіології. Після відкриття Л. Пастера були здійснені нові видатні відкриття, на основі яких мікроорганізми стали свідомо застосовувати для виробництва ряду важливих продуктів. Таким чином, біотехнологія виникла в процесі розвитку технічної мікробіології.

На III з'їзді Європейської асоціації біотехнологів (1984р) було запропоновано історію біотехнології розділити на 5 періодів або ер:

I. Допастерівська ера (до 1865 р.). Використання спиртового і молочнокислого бродіння в пивоварінні, виробництві спиртових напоїв, хлібопекарських і пивних дріжджів, сиру. Одержання ферментативних продуктів і оцету.

II. Післяпастерівська ера (1866-1940 рр.). Виробництво етанолу, бутанолу, ацетону, гліцерину, органічних кислот і вакцин. Аеробне очищення каналізаційних вод. Виробництво кормових дріжджів із вуглеводів.

III. Ера антибіотиків (1941-1960 рр.). Виробництво пеніциліну, ампіциліну, тетрацикліну та інш. антибіотиків шляхом глибинної ферментації. Культивування рослинних клітин, одержання вірусних вакцин, мікробіологічна трансформація стероїдів.

IV. Ера керованого біосинтезу (1961-1975). Виробництво бактеріальних полі цукрів, амінокислот з допомогою мікробних мутантів. Одержання чистих ферментів. Промислове використання іммобілізованих ферментів і клітин. Аеробна очистка каналізаційних вод та отримання біогазу.

V. Ера нової біотехнології (після 1976р.). Використання генетичної і клітинної інженерії з метою отримання агентів біосинтезу. Одержання гібридів, моноклональних антитіл, гібридів із протопластів та меристемних культур, трансгенних рослин та тварин. Трансплантація ембріонів.

Нова ера біотехнології почалася після відкриття американськими біохіміками в 1953 р. будови ДНК і створення методами генетичної інженерії *in vitro* рекомбінантних молекул ДНК, здатних реплікуватися в клітині і точно відтворити генетичну інформацію. Передумовою прогресу в цій області послужило відкриття в 1972 р. американськими вченими Смітом і Натансоном ферментів рестрикції, які розщеплюють ДНК в специфічних ділянках. Не менш важливе відкриття лігаз – ферментів, здатних зшивати фрагменти ДНК та зворотної транскриптази, яка синтезує ДНК на матриці РНК. В 1972р. Дж.Едельман і Р.Портер встановили хімічний склад моноклональних антитіл – важливого фактору імунної системи. В 1975р. шляхом гібридизації соматичних клітин одержані гібридами, які секретують моноклональні тіла.

В сучасній біотехнології перше місце належить генетичній інженерії (технології рекомбінантних молекул ДНК), яка дала дослідникам нову, виключно

цінну можливість – змінювати генетичну програму бактеріальних, рослинних і тваринних клітин і тим самим як би завершила формування біотехнології. Розробка технології рекомбінантних ДНК – одне із найбільших досягнень молекулярної біології. Слід підкреслити, що і в інших областях науки в ХХ ст. Було зроблено ряд великих відкриттів, які вплинули на розвиток біотехнології. Великим успіхом стало створення іммобілізованих ферментів, що дозволило вирішити частину технологічних проблем.

Таким чином, області науки, в яких недавно були одержані нові результати важливі для розвитку біотехнології, це:

1. Генетична інженерія (технологія рекомбінантних ДНК).
2. Біокаталіз – ферменти (виділення, іммобілізація, стабілізація), цілі клітини мікроорганізмів (іммобілізація, стабілізація)
3. Імунологія (моноклональні антитіла).
4. Технологія ферментації (отримання ферментів та переробка відходів з допомогою ферментів).
5. Біоелектрохімія.

Тісно пов'язана з біотехнологією **біоінженерія**. Її завдання – створення біореакторів, устаткувань для стерилізації поживних середовищ, розробка контрольної та вимірювальної апаратури, а також моделювання біотехнологічних процесів.

Біотехнологічні методи широко застосовують в самих найважливіших галузях **медицини** (діагностика, лікування патології важких хвороб). На основі рекомбінантних ДНК отриманий інсулін людини та синтезований інтерферон людини. Моноклональні антитіла використовуються для проведення радіо імунологічного аналізу, гістопатологічної діагностики захворювань людини, діагностики злоякісних утворень. Біотехнологічні методи використовуються в фармацевтичній промисловості, харчовій і переробній промисловості (створення нових методів переробки і зберігання харчових продуктів, харчових добавок, використання білку, синтезованого одноклітинними організмами і ферментів при переробці харчової сировини). Зростає роль біотехнології в захисті навколишнього середовища, хімічній промисловості (виробництво хімічних речовин – органічних кислот, наприклад, лимонної, ітаконової), використання ферментів в складі миючих засобів. Біотехнологія активно вникає в **металургію** (вилуговування руд, подальше вивчення і контроль біорозкладу) і гірничо-добувну промисловість, добування нафти, розвивається нова галузь – біогеотехнологія.

Біотехнологічні методи використовуються в **енергетиці** (розробка біотопливних елементів, з допомогою яких можна з високою ефективністю і при звичайній температурі одержувати із ряду видів томлива і біомаси електричну енергію. Розробляється проблема підвищення ефективності використання сонячної енергії шляхом конверсії сонячного світла в біомасу, наприклад, вирощування водоростей при високій концентрації CO₂ і обмеженій освітленості

в біореакторах із строго контрольованими умовами росту. Взаємозв'язки біотехнології і сільського господарства дуже різноманітні. Так, продукція сільського господарства використовується в промисловості (виробництво спирту та інш). Більша частина продукції сучасного сільського господарства служить сировиною для розвиненої харчової промисловості, як сировина використовуються і відходи сільського господарства, наприклад одержання топливного газу із гною із збереженням його цінності як добрива.

В ветеринарії біотехнологія використовується для одержання вакцин і сироваток, трансгенних тварин для збільшення виходу м'яса (гормони росту), трансплантації ембріонів. Сучасна біотехнологія дає нам і корм для тварин, наприклад, білково-вітамінний концентрат.

Біотехнологія в рослинництві –це процес використання досягнень молекулярної біології, методів генетичної інженерії, культури тканин, клітин та протопластів, спрямований на створення високопродуктивних сортів. Розробка біотехнології конструювання рекомбінантних ДНК стосовно до рослин сприяє подоланню перешкод, які заважають міжвидовому схрещуванню, збільшує генетичну різноманітність. Клонована ДНК успішно використовується для ідентифікації вірусів і кваліфікованого відбору ураженого матеріалу. За допомогою культури рослинної тканини у порівняно короткий час і на обмеженому просторі можна мати багато популяцій, у тому числі мутанти, придатні для селекції. У тканинній культурі можуть бути ідентифіковані лінії з підвищеною інтенсивністю фотосинтезу і вищою продуктивністю. Сучасні методи культури тканин дають змогу від уражених вірусами рослин мати неінфікований матеріал. Так з уражених рослин були одержані безвірусні жоржини, картопля, томати та інші рослини. Придатною для культивування *in vitro* вважається невелика ділянка апікальної меристеми розміром не більше 0,1мм, яка практично не містить вірусів.

В результаті новітніх досягнень біохімії, біотехнології, зокрема технології рекомбінантних ДНК і комп'ютерної техніки створюються стійкі сорти сільськогосподарських культур, шляхом включення в процес селекції генів стійкості від взаємоопилених видів або від неродинно-близьких рослин, формування абсолютно нових комбінацій генів. Так, зокрема, у Великобританії (1993р.) розроблений метод для ефективної селекції цукрових буряків на стійкість до вірусних хвороб – жовтухи і різоманії, оснований на введенні в геном рослини гену, який обумовлює синтез білку капсули віруса. Інший метод- це введення в рослину частини генетичного матеріалу віруса, що сприяє перериванню його життєвого циклу і таким чином робить рослину несприйнятливою. З використанням цієї технології уже одержані лінії цукрових буряків стійкі до різоманії, вірусу тютюнової мозаїки, жовтухи та інш. Розпочаті роботи по створенню ліній цукрових буряків стійких до враження комахами, в тому числі тлями – переносниками вірусної інфекції. Цього досягають шляхом введення в геном рослини генів, які обумовлюють синтез речовин ядовитих для комах або

заставляють їх припинити живлення або створюють перепони для завершення їх життєвого циклу.

За сучасними уявленнями – **предмет біотехнології с.г. рослин** – це поєднання методів культури клітин і тканин рослин та протопластів з методами молекулярної біології і технікою рекомбінантних молекул ДНК.

Методи культури рослинних тканин розробляються і застосовуються в фізіології і біохімії рослин понад 100 років, починаючи з кінця XIX ст. Розробка основ методу культури тканин рослинних організмів починається з досліджень, виконаних Габерландом у 1902р. В 1937р. Готре культивував недиференційовану тканину моркви. Одержаний при цьому калус вдалося фрагментувати і культивувати. Деякі лінії отримані Готре, підтримуються в культурі до цього часу. В 1954р. Хільдебрант та Мюїр одержали культуру із окремих рослинних клітин, що дало можливість використати цей метод для синтезу різних речовин (глікозидів, алкалоїдів, вторинних метаболітів, екзотичних ідіолітів). В 1957р. Скуг та Міллер обробивши калус рослинними гормонами (ауксином і кінетином) досягли утворення корінців і стебел. В 1960р. Кокінг створив простий метод ферментативного одержання протопластів в великих кількостях.

Основні проблеми, які розробляються в культурі *in vitro* стосовно с.г.рослин наступні:

1.Збереження генетичної інформації клітин (метод мікроклонального розмноження та депонування, культура зародків, пиляків та насінневих зачатків).

2.Зміна генетичної інформації шляхом мутагенезу під впливом фізичних та хімічних факторів (культура калусів, клітинних суспензій, протопластів).

3.Перенесення та інтеграція генетичної інформації (генноінженерне конструювання), яке включає:

- одержання трансгенних рослин – продуктів переносу індивідуальних генів, які кодують господарсько-важливі ознаки;

- соматична гібридизація та цибридизація.

Основні методи, які використовуються в біотехнології рослин:

1.Метод ізольованих тканин і клітин.

Суть методу полягає у вирощуванні *in vitro* ізольованих органів рослин і окремих рослинних клітин на відповідних поживних середовищах при оптимальній температурі і вологості. Метод включає культуру калусних тканин і культуру клітинних суспензій. Калусна тканина утворюється в результаті поділу диференційованих клітин і складається із недиференційованих вакуолізованих клітин, які ростуть хаотично. Здатність ряду калусних культур до органогенезу обумовлюють їх використання для одержання нових форм рослин. В даний час калусні культури індукуються практично із будь-якого органу та тканини

рослини (стебла, листка, вусика, корінця). Рослинні суспензійні культури – це культивування поодиноких клітин в рідких поживних середовищах. Вирощування клітин в суспензійній культурі дає можливість впливати на метаболізм і ріст популяцій екзогенними факторами, проводити різні експерименти.

2. *Клітинна селекція* – вичає теоретичні і практичні аспекти виникнення генотипової і фенотипової мінливості клітин, які культивуються *in vitro* і методи відбору із популяцій клітин з новими цінними властивостями. При модифікуванні складу поживних середовищ можна направлено впливати на репродукцію клітин із заданим числом хромосом в ядрі. Теоретичною базою розробки даної проблеми є положення про тотипотентність культивованої рослинної клітини. Згідно з цим, рослинна клітина, переведена в умови культури, зберігає всю основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може її реалізувати. Генетичні зміни, в першу чергу мутації, які при цьому виникають, після регенерації можуть проявитись у вигляді нових ознак у створених рослин, що дає можливість методом культури клітин одержувати нові селекційно перспективні форми сільськогосподарських рослин.

3. *Метод мікроклонального розмноження рослин* – це безстатеве вегетативне розмноження, при якому отримують генетично ідентичні форми, що сприяє збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. З допомогою даного методу можна розмножити за короткий термін високоцінні рослини, стерильні генотипи, подолати період спокою рослин і проводити розмноження в контрольованих умовах на протязі року.

4. *Соматична гібридизація (парасексуальна гібридизація)* – це технологія злиття соматичних клітин еукаріот в асептичних умовах та одержання на цій основі гібридних клітин. Парасексуальні гібриди відрізняються від статевих не тільки способом їх отримання, але і по характеру успадкування ядерних та цитоплазматичних генів.

5. *Генетична інженерія* – метод заснований на застосуванні технології рекомбінантних молекул ДНК для генетичної реконструкції рослин. Основним компонентом генно-інженерної технології є набір прийомів, які дозволяють здійснювати перенесення генів із однієї біологічної системи в іншу. У вищих рослин таким переносником, або як його називають вектором генів є бактерія *Agrobacterium tumefaciens* та *Agrobacterium rhizogenes*, які містять Ti- та Ri-плазміді відповідно.

Інтенсивний розвиток біотехнології в нашій країні починається із 60-х років. ЕксСРСР – єдина в світі країна де виробляється мікробіологічний білок промисловим методом на основі гідролізату деревини, сільськогосподарських відходів і очищених нормальних парафінів нафти. Проводяться роботи по виробництву білку на базі етанолу, метанолу та природного газу. Додавання в корми с.-г. тварин мікробіологічного білку значно прискорює ріст тварин, економить фуражне зерно. Ефективним продуктом в комбікормовій промисловості є незамінна кислота – лізин, широкомасштабне виробництво якої в

нашій країні налагоджено із м'яса або оцтової кислоти. Створена промисловість по випуску антибіотиків для медицини та ветеринарії, налагоджено виробництво біологічних інсектицидів. Бактеріальні інсектициди використовуються для захисту лісів, овочевих культур, бавовни. Створена промисловість ферментних препаратів, які широко використовуються в харчовій промисловості, пивоварінні, виготовленні соків, як добавки в миючі засоби, в текстильній промисловості. Налагоджено промислове виробництво женьшеню на основі культивування клітин, виробляються бактеріальні добрива (живі азот фіксуючі бактерії). Випускаються як симбіонти бобових (нітрогін), так і добрива для овочевих культур на базі вільноживучих азот фіксаторів – азотобактерін. Такими добривами обробляють мільйони гектарів посівів. В промисловому масштабі освоюються процеси результатів досягнень молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії. Так, за допомогою іммобілізованих ферментів здійснюється одержання 6-амінопеніцилінової кислоти – основи для одержання напівсинтетичних пеніцилінів. На промислову основу поставлено мікроклональне розмноження рослин, наприклад в квітникарстві вирощування гвоздик, орхідей, вирощування безвірусної картоплі, водорості спіруліни та інш. Перші роботи з рекомбінантними молекулами ДНК розпочаті в 1974 р. на чолі з акад.. Басвим в Інституті молекулярної біології АН СРСР. В даний час роботи по генетичній інженерії в ряді НДІ АН України та УААН.

Слід зазначити, що з розвитком і застосуванням досліджень по генетичній інженерії існує пересторога ризику, тобто непередбаченості впливу генетичних маніпуляцій на навколишнє середовище та здоров'я людини. Згідно Європейської конвенції виділено три групи ризику:

- 1) детальне генетичне вивчення клітин людини;
- 2) генетична інженерія соматичних клітин, особливо заміщення аномальних генів;
- 3) експерименти, пов'язані із впливом на статеві клітини для одержання постійних спадкових змін.

Досягненням англійських вчених стало клонування дорослого організму тваринного класу ссавців. Роботи були розпочаті в 60-х роках 20 ст. Для того, щоб появилася копія овечки Доллі було злито 277 донорських геномів дорослої вівці з материнською яйцеклітиною. Вдалося одержати та імплантувати 29 ембріонів, але завагітніти вдалося лише 13 овечкам. І лише єдина родила здорове потомство. Одним із наукових секретів успіху стало голодування на протязі тижня донорських клітин перед внесенням їх геному в материнську яйцеклітину. Чикагський фізик Річард Сід об'явив про створення клініки по клонуванню дітей для безплідних батьків. Не дивлячись на те, що ідею не сприйняло як уряд США, так і 90% американців, скоріше всього це буде зроблено.

Швидкий розвиток біотехнології визначив деяку вільність термінології. Нижче приводиться перелік основних термінів, які часто використовуються при культивуванні клітин рослин та тварин, а також при маніпулюванні з ними.

In vitro – вирощування живого матеріалу „в склі”, на штучних поживних середовищах, в асептичних умовах.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих клітин, які не діляться, до проліферації.

Диференціація – комплекс процесів, які призводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими та дочірніми клітинами.

Диференціювання – стан спеціалізації клітин, який відрізняє їх від других.

Ізольований протопласт – рослинна клітина, позбавлена клітинної стінки з допомогою ферментативного руйнування або механічним способом.

Інокулюм (трансплант) – частина суспензійної (калусної) культури, яка використовується для пересаджування на свіже поживне середовище.

Калус – тканина, яка виникає шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин.

Клітинна селекція – метод виділення мутантних клітин та соматоклональних варіантів з допомогою селективних умов.

Клон – культура, яка виникає із однієї клітини.

Культура калусних тканин – вирощування в тривалій перевивній культурі тканин, які виникли шляхом проліферації клітин ізольованих фрагментів різних органів або самих органів (пиляки, насінневі зачатки і т. д.) рослин.

Культитивування ізольованих протопластів – вирощування клітин, позбавлених стінок, в рідкому або агаризованому середовищі, яке містить як додатковий компонент, осмотично активну речовину (стабілізатор) в оптимальній для даного виду концентрації. При регенерації стінок у ізольованих протопластів культура перетворюється в культуру клітин.

Культура клітин (суспензійна культура) – вирощування окремих клітин або їх невеликих груп у зваженому стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію та перемішування.

Культура пухлинних тканин – вирощування в довготривалій культурі фрагментів, ізольованих із рослинних пухлин різного походження та звільнених від патогенів, які індукували розвиток пухлин.

Культура окремих клітин – вирощування одиночних клітин при низькій густині висіву: 1) на збагачених поживних середовищах; 2) з допомогою культури „няньки” або 3) живильного прошарку.

Культура експлантів – інкубація в стерильних умовах на поживних середовищах, які викликають або не викликають проліферацію сегментів, які ізольовані із різних органів рослин.

Лінія – культура, яка виникла із штаму шляхом селекції або клонування і має маркерні ознаки.

Популяція клітин– сукупність клітин, які культивуються.

Редиференціація – перехід спеціалізованих клітин із одного стану диференціювання в інший з попереднім поділом або безпосередньо.

Ростовий цикл – ріст популяції клітин в циклі періодичного вирощування, яке характеризується S – образною кривою. Фази ростового циклу: латентна, експоненціальна, сповільнення росту, стаціонарна, деградації.

Злиття ізольованих протопластів – формування однієї клітини із двох і більше шляхом об’єднання їх поверхневих мембран.

Сомаклональні варіації та варіанти – фенотипове проявлення мінливості ядерного та органельного геномів рослинних клітин. Від справжніх генетичних мутацій відрізняється великою частотою виникнення та комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

Соматична (парасексуальна) гібридизація – система, яка спонукає до генетичної рекомбінації хромосоми та гени ядра і органел поза сексуальним циклом, наприклад, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводить до появи соматичних гібридів –рослин та гібридних клітинних ліній.

Субкультивування – перенесення клітин в інший культуральний посуд на свіже поживне середовище.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин повністю реалізувати свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму.

Цикл вирощування – період від поміщення інокулюма або трансплантату в свіже середовище до наступного субкультивування.

Штам – культура, яка виникла після першого субкультивування. Складається із багатьох клітинних ліній, які виникли із клітин, які присутні в первинній культурі.

Експлант – фрагмент тканини або органу, який інкубується самотійно або використовується для отримання первинного калусу.

Лекція 2

РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН

ПЛАН ЛЕКЦІЇ

1. Фітогормони та регулятори росту.
2. Ауксини.
2. Цитокініни.
3. Гібереліни.
4. Абсцизини.
5. Етилен.
6. Брасиностероїди

Регулятори росту і розвитку рослин - природні або синтетичні органічні сполуки, які активно регулюють фізіологічні та морфогенетичні програми росту і розвитку рослинного організму. Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називають **фітогормонами**.

За типом дії регулятори росту поділяють на стимулятори та інгібітори. Проте такий поділ умовний, оскільки більшість із них в низьких концентраціях стимулює, а високих пригнічує ті інші процеси.

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

У рослини розрізняють такі основні типи фітогормонів: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен, брасиностероїди. Спеціалісти ведуть активний пошук нових ендогенних фізіологічних активних речовин, які з часом можуть набути статус фітогормонів. Тільки за останні роки до фітогормонів були віднесені жасминова кислота, олігосахариди, фузікокцин.

Кожна хімічна категорія фітогормонів характерно впливає на ріст і спеціалізацію клітин рослин, що використовуються *in vitro*. Проте необхідно пам'ятати, що генотип рослини не змінюється під дією будь-якого регулятору росту. Вони лише допомагають рослинам розкрити і реалізувати їх генетичний потенціал без появи нових спадкових властивостей, крім того регулятори росту не замінюють елементів живлення.

У практиці рослинництва широко використовують синтетичні регулятори росту такі як емістим, метиур, дипромол, фарбізол, івін. В основному їх використовують для підвищення енергії проростання і польової схожості насіння, запобігання вилягання хлібів, регуляції плодоношення, підвищення врожайності, приживання саджанців.

Вчені розробляють нетоксичні синтетичні аналоги гормонів шкідників (ОК-37, 84, 85), які одночасно є ефективними засобами захисту рослин.

Розрізняють наступні регулятори росту:

1. Ауксини.
2. Цитокиніни.
3. Гібереліни.
4. Абсцизини.
5. Етилен.
6. Брасиностероїди.

Ауксини. Були відкриті в результаті вивчення явища фототропізму, яке було почате ще в досліджах Чарльза Дарвіна і його сина Френсіса. Взявши колеоптилі вівса вони показали, що ріст проростків в бік світла обумовлений тим, що від верхівки стебла передається якийсь вплив на розміщену нижче зону росту. В 1934 році дану речовину було названо ауксином та ідентифіковано як індолілоцтова кислота.

Ауксини - група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягнення клітин, сприяють формуванню коренів, провідних пучків. Ауксини синтезуються у верхівках рослин і пересуваються вниз по рослині. Основним ауксином є індолілоцтова кислота, але не єдиним. Відомо багато речовин індольної природи з ауксиною дією, які синтезовані лабораторним шляхом: індолілмасляна, нафтилоцтова кислоти. Існують ауксини неіндольної природи: 2,4Д; 2,4,5-трихлорфеноксіоцтова кислота; 2,3,6 - трихлорбензойна кислота. Вони у високих концентраціях використовуються як гербіциди.

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

Класична дія ауксинів - посилення росту за рахунок стимуляції, розтягнення клітин, знижує рН позаклітинного середовища і тим самим посилює пластичність

клітинних стінок. ІОК зумовлює явище апікального домінування, коли апікальна меристема гальмує ріст бокових меристем.

Природу апікального домінування пояснюють декілька гіпотез:

1) Верхівкова меристема найбільш насичена ауксином і є атрагуючим центром притягнення води і розчинених в ній мінеральних, поживних речовин, яких не вистачає для бокових бруньок;

2) Під дією ауксину синтезується інгібітор росту, який проникає у бокові меристеми і гальмує їх розвиток. Синтетичні ауксини широко використовуються для укорінення черенків.

Цитокініни. Вперше були виявлені в 1955р. Скугом в молоці кокосового горіха інгредієнт, який викликав ділення зрілих серцевин клітин тютюну в культурі. Було встановлено, що активний компонент по хімічній будові схожий з аденіном - однією із основ, яка входить до складу ДНК. Цей компонент назвали кінетином. Пізніше був прийнятий термін цитокінін. Перший природний цитокінін, був виділений із молодих зерен кукурудзи (*Zea mays*) в 1963 р. і отримав назву зеатин. Найбільш розповсюдженими цитокінінами є кінетик, зеатин, 6-бензиламінопурин.

Цитокініни поліфункціональні в своїй дії на різних етапах росту і розвитку рослин. Вони стимулюють процеси клітинного ділення і диференціації та затримують процеси старіння відокремлених органів. Цитокініни стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. Цитокініни утворюються у коренях, переміщуються в листки і підтримують структурно-функціональну життєдіяльність листків. Вони продовжують тривалість життя зелених овочів, зрізаної зелені, квітів, що використовується на практиці.

Гібереліни. Найбільш типовим представником є гіберелова кислота. В 20-х роках група японських вчених, яка працювала в Токійському університеті, досліджувала широко розповсюджене в світі захворювання проростків рису, яке викликав гриб *Giberella* (під *Fusarium*). Заражені сіянці витягувались в довжину, обезбарвлювались, гинули або давали поганий врожай. В 1935 було отримано в кристалічному вигляді першу активну речовину. В 1954 році англійські вчені виділили одну із активних речовин, яку назвали гібереловою кислотою. У вищих рослин багатими на гібереліни швидкоростучі органи - молоді апікальні листки, бруньки, незріле насіння, плоди. Рухаються вони по флоємі, ксилемі вверх-вниз, не виявляючи полярності транспорту. Велике значення для утворення гіберелінів у рослини має світло (воно сприяє їх біосинтезу в хлоропластах листків).

Гібереліни - компоненти систем, які регулюють ріст і розвиток рослин. Найбільш виражена дія гіберелінів - це здатність стимулювати ріст, видовження стебла за рахунок розтягнення клітин, а не їх поділу. За допомогою гіберелінів відновлюють нормальний ріст карликових сортів гороху, кукурудзи. Другий

класичний ефект дії гіберелінів пов'язаний з виходом насіння злакових із стану спокою. Насіння поміщають в воду і після того, як воно її поглине, зародок починає синтезувати гібереліни, які стимулюють утворення гідролітичних ферментів. Ферменти розщеплюють запасний крохмаль ендосперму до простих цукрів, які використовуються для росту зародка. Важливе значення гіберелінів у процесі яровизації та цвітіння. У ході яровизації підвищується рівень гіберелінів, що дозволяє холодову обробку замінити обробкою неяркованих рослин гіберелінами. Екзогенно введений гіберелін у багатьох дворічних рослин виключає потребу в яровизації і викликає їх цвітіння. Гібереліни викликають партенокарпію - процес при якому плоди розвиваються без запліднення. Для цього квітки рослин обробляють розчином гібереліну, що практично використовується у виноградарстві (отримують без насіннєві ягоди великого розміру). Для оптимальної регуляції росту необхідні не тільки стимулятори, але і інгібітори росту.

Абсцизини. Вперше були виділені в 1964 році із листків платана. Початкова назва активної речовини була дормін. Дорін викликав опадання коробочок (назва яких на латині *abscisio*) і тому був названий абсцизином. В 1967 році було вирішено назвати абсцизовою кислотою (АБК). З хімічної точки зору АБК відноситься до терпеноїдів. Більшість органів вищих рослин здатні синтезувати АБК, транспорт речовини відбувається по провідній системі (флоемі і ксилемі). Вміст АБК визначають за допомогою біотестів та фізичними методами. Дія АБК пов'язана із спокоєм бруньок і насіння, опаданням квіток, плодів, старінням і дозріванням. Додавання до поживного середовища 7,6 мкМ АБК впливало на ріст і формування ембріогенних клітинних агрегатів у суспензійних культур клітин ярої пшениці. АБК бере участь у зміні балансу фітогормонів і сприяє «дозріванню» соматичних ембріоїдів, попереджує утворення корневих структур.

Етилен - це газ, який добре розчиняється у воді, має характерний запах. В 30-х роках стало відомо, що газ етилен прискорює дозрівання плодів цитрусових і впливає на ріст рослин. В 1934 р. виявилось, що жовтіючі яблука виділяють етилен, а пізніше було доведено, що цей газ виділяють різні достиглі плоди та інші органи рослин, особливо пошкоджені. У найбільших кількостях він утворюється у дозріваючих, старіючих тканинах, або у відповідь на поранення та інші стресові фактори. Добра розчинність етилену у воді дозволяє йому транспортуватись у водному розчині по рослині. Етилен, як газ відрізняється від інших фітогормонів своєю летючістю. З цієї причини етилен однієї рослини може впливати на перебіг процесів в іншій рослині, яка знаходиться поряд. Класичний ефект дії етилену спостерігається у плодоовочевих сховищах, або при тривалих морських транспортуваннях - перезрілі плоди посилюють дозрівання сусідніх менш стиглих плодів.

Важливим ефектом фізіологічної дії етилену вважається також стимуляція опадання листків - він впливає на розростання прошарку відокремлення, який знаходиться біля основи черешка листка.

Брасиностероїди. Мають високу фізіологічну активність. Якщо класичні фітогормони діють у концентраціях 10^{-8} - 10^{-6} моля, то брасиностероїди в дозах 10^{-8} - 10^{-11} моля. Вперше були знайдені і виділені у чистому вигляді з пилку ріпака. Після обробки брасиностероїдами виявлена сильнодіюча стимуляція росту зернобобових, овочевих, плодових культур. Перспективні для використання у сільському господарстві, завдяки тому, що у них невелика токсичність та дуже низькі норми витрат.

Взаємозв'язок дії фітогормонів.

Узагалення сучасних уявлень про фізіологічну дію фітогормонів дозволяє говорити, що цитокініни найбільше пов'язані з діленням клітин; ауксини, гібереліни, брасиностероїди - із збільшенням розмірів клітин і їх диференціюванням; АБК - станом спокою; етилен - дозріванням і старінням. Враховуючи те, що процес росту складається з трьох етапів - ділення клітин, їх розтягнення та диференціювання - необхідно обов'язково підкреслити, що фітогормони викликають той чи інший фізіологічний ефект тільки при спільній взаємодії.

Якщо один або декілька фітогормонів посилюють, доповнюють дію один одного і сумарний ефект дії набагато перевищує результат їх індивідуальних ефектів, то говорять про **синергізм** дії фітогормонів. Відповідно, результатом **антагонізму** взаємодії фітогормонів є гальмування процесів.

Для гіберелінів на розтягування клітин та видовження органів рослин залежить від присутності ендогенних та екзогенних ауксинів. При дії на рослину різних стресових факторів, при підвищенні концентрації ІОК та кінетину проходить посилене виділення етилену. Цитокініни сприяють поділу клітин тільки в присутності ауксинів. У деяких випадках відмічається участь гіберелінів у цих процесах. Реалізація тотипотентності клітин залежить від балансу регуляторів росту у поживному середовищі.

Калусна тканина тютюну на MS середовищі

Наявність фітогормонів у середовищі	Ефект дії
1.Відсутні всі фітогормони	слабкий ріст калусу
2.Ауксини тільки	розтягнення клітин, але відсутнє їх ділення і диференціація
3.Цитокініни тільки	Ріст калусу без диференціації клітин
4. Високе значення співвідношення ауксин\цитокінін	Ріст і диференціація з утворенням коренів
5.Високе значення співвідношення цитокінін\ ауксин	Ріст і диференціація пагонів
6. Низьке співвідношення цитокінін\гіберелін	Тонкі етильовані рослини з вузькими листками
7. Високе співвідношення цитокінін\гіберелін	Короткі зелені рослини з округлими листками

Регуляторна функція фітогормонів розглядається як результат їх складного координованого впливу на хід ростових, генеративних процесів і залежить від балансу концентрації стимуляторів та інгібіторів на різних фазах розвитку рослин.

Лекція 3

Метод культури ізолюваних клітин та тканин

План лекції

1. Рослинна клітина, як об'єкт для вивчення різних процесів
2. Історія розвитку методу ізолюваних клітин та тканин.
3. Принципи і теоретичні основи створення поживних середовищ
4. Фізичні фактори, що впливають на ріст і розвиток ізолюваних тканин.
5. Культура ізолюваних тканин

Метод культури клітин, тканин і органів використовується в даний час в усьому світі при вирішуванні багатьох проблем сучасної біології. В основу методу культури тканин покладено пізнання живої клітини і законів, які управляють процесами життєдіяльності. Цінність методу культури тканин полягає в тому, що клітина – це природна модель – одиниця біологічної активності, що наближає умови експерименту до нативних. З другого боку, ізолювана одиниця біологічної активності, будь-то клітина або орган, звільняється із-під впливу кореляційних зв'язків і залежностей материнського організму з певним ступенем автономності. При цьому створюються умови *in vitro*, які можна регулювати і якими можна управляти, що дозволяє кількісно виразити результати експерименту і встановити деякі загальні, фундаментальні біологічні закономірності.

Рослинна клітина відрізняється рядом унікальних особливостей – це проявом здатності гаплоїдних клітин до відновлення цілого організму, переходом до органогенезу та морфогенезу, що дає можливість вирішувати багато проблем загально біологічного значення.

Рослинна клітина – це об'єкт для вивчення первинних процесів росту, диференціації, взаємодії між ядром і цитоплазмою, стану генетичної інформації, її змінення і тимчасової реалізації.

Функціональна гетерогенність клітин характерна для клітинних популяцій в живому рослинному організмі (*in vivo*) як то статеві, соматичні клітини, значно підсилюється в умовах ізолюваних культур. Клітина в умовах культури *in vitro* проявляє цитогенетичну нестійкість, в результаті чого виникають популяції клітин з генетичною гетерогенністю. Появляються мутанти із зміненним морфогенезом, які можуть бути вихідним матеріалом для селекційно-генетичних досліджень. Цитогенетична нестійкість, виникнення генетичної гетерогенності клітинної популяції *in vitro*, здатність до морфологічних змін – залежать від типу тканини, її кількості, маси, ступеню диференціації, густини суспензійної культури, систематичного положення рослин та умов вирощування. При цьому хімічні компоненти поживного середовища і фізичні умови виступають як індуктори різних біосинтетичних процесів, або як мутагенні, екстремальні

фактори, що призводять до змін в нуклеїновому і білковому обміні, цитогенетичній гетерогенності клітинної популяції, а також до зміни структури, форми і функції клітини.

Метод культури тканин полягає у вирощуванні *in vitro* ізольованої клітини, її окремих структур, різних тканин, частин і органів рослин в стерильних умовах на твердому або рідкому поживному середовищі.

Одним із основних принципів розробки культури тканин є ступінь відтворення in vitro умов близьких або ідентичних тим, в яких клітини перебувають на материнській рослині. Чим більш повною мірою в культурі in vitro відтворюються природні умови для того чи іншого типу клітин, тим більшого успіху досягають при їх вирощуванні. Друга і найважливіша умова успішного вирощування рослинних клітин і тканин in vitro – це ступінь можливості репресії і дерепресії генетичної інформації та здатність її модифікаційних і мутаційних змін в нових фізико-хімічних умовах культури.

Розробка основ методу культури тканин на рослинних організмах має порівняно коротку історію розвитку - біля 110 років. Перші спроби відносяться до кінця XIX – початку XX століть і пов'язані з іменами трьох видатних німецьких вчених: Фехтинга, Рехінгера, Габерландта (1878-1902рр.). Причому, саме Габерландт в 1902 році вперше чітко висловив ідею про можливість культивувати *in vitro* ізольовані клітини рослин, однак ці спроби культивувати на штучному середовищі групи клітин палісадної паренхіми листка та епідермісу, не увінчалися успіхами.

Доволі тривалий період, який наступив за роботами цих перших дослідників характеризується багаточисленними науковими пошуками підбору відповідного поживного середовища і створення сприятливих умов для вирощування ізольованих від цілої рослини органів, тканин і клітин.

Історія розвитку методу культури ізольованих тканин рослин була започаткована роботами двох відомих вчених, які присвятили даній проблемі всі сили, талант і довгі роки напруженої праці – Філіпа Уайта в США і Роже Готре у Франції (1932-1959рр.), які по праву вважаються основоположниками методу культури ізольованих рослинних тканин.

Багато тканин, які були вперше введені в культуру *in vitro* Готре, існують в пасованій культурі і до теперішнього часу, як певні фізіологічно і біохімічно вирівняні клони, з якими працюють вчені в різних лабораторіях світу. Зусиллями Уайта і Готре та їх багаточисельними учнями і послідовниками були детально розроблені методика культивування рослинних тканин і склад поживних середовищ та підібрані фізичні фактори вирощування культур. Каталог рослин, тканини, яких вирощувались в культурі *in vitro* був виданий Готре в 1959р. і включав 142 рослини, із класу дводольних, трав'янистих і дерев'янистих форм, а також однодольних, голонасінних і спорових рослин. В даний час він може бути доповнений іще більшим числом рослин, тканини яких введені в культуру *in vitro*.

В нашій країні систематичні роботи з питань культури тканин рослин були започатковані в 1944р. в Інституті фізіології рослин АН СРСР під керівництвом акад. Н.А. Максимова. Дослідження проводились в області культури ізолюваних зародків і культури ізолюваних коренів. Метод ізолюваних зародків був використаний при створенні гібридних форм рослин пшениці і при виведенні нових сортів персика та черешні в Нікітському ботанічному саду. На Україні дослідження по культурі ізолюваних зародків проводились Ф.Л.Калініним і його школою в напрямку впливу на ранні стадії ембріогенезу рослин для надання їм нових якостей (1951-59 рр.).

Подальші дослідження розвитку методу культури ізолюваних клітин і тканин пов'язані з іменами:

Р.Г.Бутенко, М.Х.Чайлахяна – культура ізолюваних верхівкових бруньок;

А.М.Смірнова, Б.П.Строгонова – культура ізолюваних коренів;

Р.Г.Бутенко, А.А.Ничипорович – пасована культура тканин різних рослин і вирощування клітинних суспензій.

В даний час на Україні центром розвитку всіх напрямків культури ізолюваних клітин, тканин і органів рослин є Інститут клітинної біології і генетичної інженерії, де наукові пошуки проводяться під керівництвом акад. Ю.Ю. Глеби. Значні обсяги робіт проводяться в інших науково-дослідних установах Національної та Аграрної академій наук.

Принципи і теоретичні основи створення поживних середовищ.

Поживні середовища, компоненти, які входять до їх складу, їх фізичні і хімічні властивості є однією із важливих умов успішного вирощування ізолюваних клітин, тканин та органів рослин. Основою для підбору поживних середовищ слугували поживні розчини, які використовувались для вирощування цілих рослин. Основоположники методу *in vitro* Уайт і Готре користувались спочатку, перший – фізіологічною сумішшю для вирощування рослин Кноппа, а другий – розчином Успенських, розведеними в два рази. В середовищах, розроблених для культур тканин і органів рослин Уайтом (1946р.) і Хеллером (1953р.) вміст елементів мінерального живлення був значно вищим, але як було встановлено пізніше, явно недостатнім для підтримання максимального росту калусних і суспензійних культур. Середовища, які були розроблені протягом 70-80 років нашого століття, містять в 10 разів більше калію, натрію і фосфору. Загальна концентрація всіх мінеральних елементів найбільш висока в середовищах Мурасіге і Скуга (1962р.), Ніча (1969р.), Гамборга (1968р.), Шенка (1972р.).

На сучасному етапі для культивування клітин, тканин і органів використовують різноманітні модифікації цих середовищ стосовно до окремих випадків культивування тканин і органів різних видів рослин.

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

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

Середовище Уайта – 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.

Будь-яке поживне середовище для вирощування культури ізольованих рослинних тканин включає до свого складу наступні компоненти:

- макроелементи
- мікроелементи
- вуглеводи
- амінокислоти
- вітаміни
- стимулятори росту синтетичного і природного походження
- агар (у випадку вирощування тканин на твердому поживному середовищі)
- воду.

Розглянемо кожний компонент поживного середовища окремо.

1. Макроелементи, які входять до складу більшості середовищ, представлені наступними елементами: азот, фосфор, калій, кальцій, магній, натрій, залізо, сірка, хлор.

Азот. Рослинні тканини, що ростуть в ізольованій культурі, автотрофні у відношенні азотного живлення. Використовуючи неорганічні джерела азоту, рослинні тканини на їх основі синтезують всі необхідні для життєдіяльності органічні азотні сполуки. Найкращою формою азотного живлення тканин є нітрати, у вигляді яких азот входить до складу більшості поживних середовищ і тільки в деякі середовища, крім нітратів, добавляються солі амонію.

За даними Хаймера і Філера асиміляція нітратів в культивованих клітинах рослин відбувається за наступною схемою:

Середовище (NO_3^-) // Нітратредуктаза // Нітритредуктаза - NH_4^+ - перетворення аміаку в органічний азот: амінокислоти, білки, нуклеїнові кислоти.

Фосфор для росту рослинних тканин використовується в основному вигляді ортофосфату (PO_4^{3-}). Джерелом фосфорного живлення можуть бути також фосфати цукрів.

Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} потрібні для культивування тканин в невеликих кількостях і привносяться до складу середовища з елементами мінерального живлення і при регулюванні рН середовища.

Сірку вводять у вигляді сульфатів, сульфідів або амінокислот цистеїну, глутатіону, метіоніну.

Залізо використовують у вигляді неорганічних солей і солей органічних кислот. При цьому одночасно з солями залізо в поживне середовище вводять етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА). Наявність цієї сполуки як хелатуючого агента, покращує доступність заліза в широких межах рН, оскільки на його засвоюваність впливають метаболіти, що виділяються культурами тканин.

2. Мікроелементи. Внесення Mn, Co, Cu, Zn, Mo в поживне середовище особливо важливе при культивуванні тканин в рідкому середовищі. Відсутність їх зменшує інтенсивність росту на 40% в першому пасажі і призводить до загибелі культури на протязі двох наступних пасажів. При вирощуванні ізолюваних тканин на твердому агаризованому середовищі, вони не так гостро реагують на відсутність мікроелементів, оскільки агар містить в своєму складі макро- і мікроелементи.

3. Вуглеводи. Ці сполуки необхідні для нормального розвитку хлорофілоносних тканин. Хоча в останні роки і одержані клони культур тканин, які характеризуються значною інтенсивністю фотосинтезу і розроблені умови їх культивування, одержання автотрофних культур тканин – завдання майбутнього. В більшості поживних середовищ, які використовуються для ізолюваних культур рослинних тканин, джерелом вуглецю і енергії є гексози: сахароза і глюкоза в концентрації 20-40 г/л. Дослідження класу вуглеводів, які найбільш придатні для росту окремих видів тканин, були проведені Готре. На середовищах з пентозами, за виключенням ксилоли, культури на ростуть. Для деяких тканин оптимальними джерелами вуглеводного живлення є фруктоза, манноза або галактоза. Тканини, для яких характерна наявність активних гідролітичних ферментів, які вони виділяють в поживне середовище, можуть рости на середовищах з полісахаридами: розчинним крохмалом (пухлинні тканини, тканини деревних рослин), рафінозою і целобіозою.

4. Амінокислоти. Окремі амінокислоти, внесені в поживне середовище як доповнення до нітратів можуть проявляти стимулюючу, пригнічуючу або нормативну дію, а суміш амінокислот, як правило, стимулює ріст тканин. Амінокислоти використовують в двох випадках:

- як єдине джерело азотного живлення;
- на фоні основного азотного живлення для активації метаболізму і росту тканин.

Дуже часто суміш амінокислот замінюють гідролізатом казеїну, який синергічно діє з цитокинінами та ауксинами. В деяких випадках внесення до середовища гідролізату казеїну може бути замінено дією однієї або декількох амінокислот.

5. Вітаміни. Більшість тканин, що культивуються *in vitro*, здатні до синтезу всіх необхідних для їх життєдіяльності вітамінів. Переважна кількість вітамінів, як відомо входять до складу ферментів-біокаталізаторів різноманітних важливих реакцій обміну в тканинах. Ряд рослинних тканин синтезують вітаміни в субоптимальній кількості і при їх внесенні до поживного середовища ріст тканин значно покращується. Крім того, внесення вітамінів в поживне середовище може викликати нормативний ефект. Вітаміни подовжують термін життя експланту і нормалізують деякі ростові процеси, що протікають при регенерації рослин. Найбільш важливу роль в рості культури тканин відіграють вітаміни групи В. Використовують жиророзчинні вітаміни: А, Д, Е, К та водорозчинні вітаміни: групи В ($B_0 - B_{12}$), нікотинову кислоту, пантотенат кальцію, мезо-інозит, параамінбензойну кислоту, фолієву кислоту, аскорбінову кислоту, біотин, рибофлавін.

6. Стимулятори росту – синтетичні і природного походження.

Для росту ізолюваних тканин більшості рослин при культивуванні їх на штучних поживних середовищах необхідна наявність в поживному середовищі різних стимуляторів росту. Без додавання в середовище стимулюючих речовин в культурі здатні рости тільки пухлинні тканини (галлові пухлини, пухлини вірусного походження, звиклі тканини) і камбіальні тканини обмеженого числа видів рослин.

а) Стимулятори росту синтетичного походження підрозділяють на наступні групи:

- **ауксини** вводять для індукції клітинного ділення і диференціації. Вони активують утворення корневих зачатків у основи пагонів, цибулинок в культурі тканин, регулюють соматичний ембріогенез, регенерацію пагонів із калусів експлантів. Найчастіше використовують індолілоцтову кислоту (1-30 мг/л), нафтилоцтову кислоту (0,1- 2 мг/л) 2,4 дихлорфеноксіоцтову кислоту (1 мг/л);

- **цитокініни** приймають участь майже у всіх морфогенетичних реакціях. Вони активують і прискорюють процес де диференціації, клітинного ділення, утворення калусу, індукують розвиток пазушних бруньок, регулюють ріст соматичних зародків, активують диференціацію стеблових бруньок в калусній тканині. В поживних середовищах кінетин використовують в

концентрації 0,001-10 мг/л, 6-бензиламінопурин - 0,0001-10 мг/л, зеатин - 0,01-10 мг/л.

• **гібереліни** активують ріст і витягування стебла: прискорюють ріст сформованих в культурі бруньок, сприяє отриманню рослин (посадкового матеріалу) з міцною, добре розвиненою надземною частиною.

б). **Стимулятори росту рослинного походження – рослинні екстракти.** Додавання їх в середовище завжди викликає ефективну дію, але при цьому експерименти важко відтворюються, оскільки діючий компонент, як правило, точно не відомий. Для внесення в поживні середовища використовують кокосове молоко, ендосперми кінського каштану, грецького горіху, кукурудзи та інших злаків, екстракти із органів вегетуючих рослин, солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, весняну пасоку деяких дерев, томатний сік, березовий сік.

7. Агар. Додають для приготування твердого поживного середовища. Агар – це полісахарид, який добувають із морських водоростей у берегів Далекого сходу, Китаю та Японії. Звичайний агар має вигляд пластинок, зерен, або порошку. Агар утворює з водою гель, який плавиться при температурі 100°C і твердне при +45° С. Слід зазначити, що агар втрачає здатність утворювати гель в кислому середовищі. Агар додають до поживного середовища в концентрації 0,8-1,5%. Останнім часом використовують гелеутворюючі речовини – біогелі, силікагелі, поліакріламідні гелі. Желатинові поживні середовища непридатні для культури *in vitro*, в зв'язку з тим, що желатин токсичним для рослинних тканин.

8. Вода. Використовують дистильовану або бідистильовану воду. Воду або переганяють двічі або отримують при допомозі іонообмінників (в де іонізаторах).

При створенні поживних середовищ і культивуванні на них тих чи інших експлантів слід враховувати вплив деяких фізичних факторів, необхідних для успішного культивування клітин тканин і органів рослин. До них відносять:

Умови аерації – особливо важливі при культивуванні тканин коренів і клітинної суспензії. Аерація середовища в певній мірі обумовлює аеробне чи анаеробне протікання біохімічних процесів і є одним із факторів, які спричиняють клітинну диференціацію.

Температурний фактор – безпосередньо впливає на ряд процесів і особливо на активність ферментів, необхідних для метаболізації джерел живлення та інших біохімічних процесів. Для більшості культивованих тканин температурний фактор становить +25-26° С.

Осмотичний тиск поживного середовища є однією із умов направлення швидкості транспорту речовин через цитоплазматичну мембрану клітин. Регуляція величини осмотичного тиску здійснюється в основному варіаціями компонентів поживного середовища. В ряді випадків для підтримання відповідного осмотичного тиску в поживне середовище вводять компоненти, які не є джерелом живлення і не мають токсичних властивостей.

Освітлення є необхідним фактором для утворення хлорофілу та морфогенезу, обумовлює реалізацію генетичної інформації, впливає на мітотичну активність і ріст клітин. Як джерело світла використовують люмінесцентні лампи з інтенсивністю освітлення 1000-5000 лк. Оптимум освітлення для більшості рослин лежить в області 1000 лк при 14-ти годинному світловому дні. Збільшення або зменшення інтенсивності світла пригнічують ріст і розвиток тканин.

рН поживного середовища. Концентрація іонів водню в поживному середовищі при автоклавуванні впливає на стійкість індолілоцтової кислоти, на осідання фосфатів і солей важких металів, на желетинизацію агару, на стійкість вітаміну В₁, пантотенової кислоти, цистину, триптофану, гіберелової кислоти. Оптимальне значення рН для більшості рослинних тканин лежить в межах 5,0-5,5.

Слід відмітити, що і на сучасному етапі при розробці поживних середовищ та вдосконаленню їх складу приділяється багато уваги. Імовірно, що ніколи не буде створене універсальне середовище, оскільки клітини і тканини різних рослин ростуть і функціонують в різноманітних метаболічних умовах.

Об'єктами культури *in vitro* можуть бути різноманітні тканини, які беруть із різних частин рослини, так звані *експланти*. Експланти відбирають із здорових, сильних і не пошкоджених рослин. Найчастіше вирощують в ізолюваній культурі прокамбіальні тканини стебла, тканини, що містять первинний і вторинний камбій, судинну паренхіму коренеплодів і бульб, тканини зав'язі. *In vitro* культивують також тканини пелюсток квітів, пиляків, нуцелуса, пилкових трубок, відрізки кінчиків коренів, проростків, адвентивні корені, зародки непророслого насіння.

В культурі тканин рослин вирішальне значення має використання онтогенетично молодих експлантів. Недозрілі тканини і органи більш пластичні з точки зору здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж зрілі тканини і органи. Особливо зручні, як експланти - меристеми, верхівки пагонів, пазушні бруньки. Тканини рослин, які культивуються *in vitro* характеризуються високим ступенем функціональної і структурної гетерогенності, навіть в тих випадках, коли вони отримані від одних і тих же донорних генотипів і в однакових умовах культивування. В основі диференціації клітин лежать процеси репрограмування, репресії і дерепресії генетичної інформації, що призводить до утворення спеціалізованих клітин (явище тотипотентності), які стають компетентними і здатними до взаємодії, асоціації, органогенезу і морфогенезу. В окремих клітинах відбуваються не диференціація, а лише процеси їх поділу.

Культура ізолюваних тканин:

- **культура протокормів.** Протокорми – це особливі ембріональні структури, які здатні до вегетативного розмноження. Морфогенетичні потенції протокормів реалізуються шляхом індукції адвентивних бруньок і пагонів. Кожна з цих структур є вихідним матеріалом для клонування, що створює необмежені

можливості для розмноження і одержання необхідної кількості рослин. Використовується тільки при розмноженні орхідних;

- **культура бульбоплодів і коренеплодів.** Для отримання експлантів відбирають здорові бульбо – і коренеплоди, які зберігаються при температурі +4°C. При культивуванні експлантів моркви та пастернаку необхідно дотримуватись умов полярності. Для інших експлантів явище полярності не властиве. Використовується для отримання калусу і подальшого органогенезу;

- **культура паренхіми серцевини стебел.** Використовують для вивчення метаболізму клітини при проходженні нею циклу від спеціалізованої тканини стебла до тканини стебла рослини-регенеранту та як об'єкт досліджень індукції елементів провідної системи - трахеїд. Завдяки даній культурі можна індукувати утворення апексу і одержувати рослини-регенеранти;

- **культура пагонів деревних рослин.** Основні дослідження направлені на використання пагонів, як вихідного матеріалу для вивчення впливу різних факторів поживного середовища на калусоутворення і індукцію морфогенезу в отриманих калусах. Метод застосовують для розмноження листяних і хвойних порід, а також деревних рослин, що важко укорінюються чи прививаються звичайним способом;

- **культура коренів.** В ізольованій культурі вирощують апекси коренів, адвентивні корені, ділянки кореневих систем рослин. Даний метод використовується для виявлення впливу зовнішніх факторів, компонентів поживного середовища і токсичних елементів на їх ріст та для промислового синтезу цінних природних сполук.

- **культура квіток.** Частини квітки культивують з метою вивчення закономірностей їх розвитку, а також впливу факторів поживного середовища і інших умов на індукцію морфогенезу. В ролі первинних експлантів використовують цілі суцвіття, квіткові бруньки і окремі органи квітки – квітконіжки, пелюстки, квітколоже.

- **культура зав'язей та плодів.** Перспективна для поглибленого вивчення процесів опилення, впливу різних тканин квітів на розвиток зав'язі в плід.

Теоретичні питання, які вирішуються за допомогою культури ізольованих тканин.

Метод культури клітин, тканин та органів дозволяє вирішувати ряд проблем біології на основі більш високої оснащеності експерименту, відтворюваності результатів, одержання більшого об'єму інформації.

В **генетиці і селекції** він застосовується для здійснення парасексуальної гібридизації і одержання міжвидових, міжродових гібридів, гомозиготного вихідного матеріалу, який не розщеплюється в потомстві, збереження цінних генотипів з допомогою клонального розмноження, включення в клітину чужорідної генетичної інформації і подальшої її реалізації, оздоровлення цінних сортів рослин, які розмножуються вегетативно. При цьому розмноження рослин прискорюється в десятки, сотні і більше разів на цілком іншій основі і має новий

якісний зміст. Крім того, розмноження рослин за допомогою культури меристем дозволяє одержувати здоровий, безвірусний посадковий матеріал.

Метод культури тканин дозволяє вирішувати таке складне питання як **перенесення і зміна генетичної інформації** на основі об'єднання ДНК двох протопластів, що дало можливість здійснити соматичну гібридизацію як диплоїдних, так і гаплоїдних протопластів. Експериментальні методи ізольованих клітин та протопластів, які стоять на стику фізіології і генетики рослин, дають можливість вченим вирішувати конкретні проблеми, переходити з організменного рівня на клітинний і працювати з мільйонами і більше клітин в пробірці, замість мільйонів рослин, що займають значні площі і вимагають великих матеріальних затрат.

Значним кроком в розвитку області застосування методу культури тканин для вирішення теоретичних і прикладних завдань біології є розроблення техніки вирощування із окремої соматичної клітини цілої рослини. **Соматичний ембріогенез** використовується для розмноження рослин. Однак на даний період, число видів рослин, які *in vitro* здатні до утворення бруньок та соматичних ембріодів, досить обмежене. Це пояснюється генетичною гетерогенністю рослин, тобто рослини одержані таким шляхом не завжди генетично ідентичні, що обумовлюється цитогенетичною нестійкістю і гетерогенністю клітинної популяції *in vitro*.

Метод культури тканин застосовується при **вивченні механізмів утворення рослинних пухлин**. За його допомогою вирішується ряд надзвичайно складних питань **регулювання органогенезу і морфогенезу рослин**.

Крім того даний метод використовується при вивченні **дії на рослини екстремальних факторів**, а саме: низьких температур (холодо- та морозостійкість), радіоактивних іонізуючих випромінювань та ступеня їх стійкості. Все ширше метод застосовують в дослідженнях фітопатогенних вірусів, мікоплазм, грибів, нематод.

На основі культури *in vitro* розробляються методи і технології для одержання цінних речовин вторинного обміну рослин – алкалоїдів, глікозидів, танінів, катехінів та інших сполук. Методом культури тканин можна також вирішувати ряд інших питань: біосинтезу білків – ферментів, кріобіологію рослинної клітини, причини і умови її старіння та інші важливі питання .

Лекція 4

Культура калусної тканини та клітинних суспензій

ПЛАН ЛЕКЦІЇ

- 1.Культура калусної тканини.
- 2.Рослинні суспензійні культури.

Культура калусної тканини.

Калусною тканиною вищої рослини називають тканину, яка виникла шляхом неорганізованої проліферації із експлантів органів рослин після першого субкультивування. Крім того, калус утворюється в місцях пошкодження рослин. Відомий вчений – ботанік Н.Кренке 50 років тому частину своїх робіт присвятив вивченню ролі калусної тканини в цілій рослині. Він пов'язав її з фазами, які проходить калусна тканина:

- перша фаза – швидкий ріст калусних клітин, які захищають місце пошкодження;
- друга фаза – запасання поживних речовин в клітинах калусів;
- третя фаза – регенерація із калусної тканини втрачених органів.

Культура калусів може бути отримана із різних експлантів: будь-яких органів рослин (наприклад коренів, пагонів, листя) або із клітин певного типу (ендосперм, пиліок). При виборі експланту необхідно враховувати вік рослини. У молодих, ювенільних рослин здатність до ініціації калусу в умовах *in vitro* значно вища ніж у зрілих. При використанні спеціалізованих тканин, наприклад ендосперму, утворення і ріст калусу залежать від часу його отримання. Як правило, калус важко утворюється на експлантах старше 8-11 діб після запилення. Шматочки стебла деревних рослин можна використати як експлант попередньо проробивши наступні маніпуляції: зрізати бокову гілку, дати можливість утворитися раневому калусу безпосередньо на рослині, потім новоутворений калус ізолюють, стерилізують і поміщають на стерильне поживне середовище.

Калусні тканини можна також отримати із ізольованих клітин та їх агрегатів із суспензійної культури. Якщо, наприклад, клітинна культура звикла до росту в умовах суспензії, то при висаджуванні на агар, ріст її значно покращується.

Насіння є чудовим вихідним матеріалом в наступних випадках:

- для отримання калусу шляхом посадки цілих насінин на агаризоване середовище, яке містить регулятори росту;
- для отримання із проростаючого насіння, яке помістили на агаризоване середовище без регуляторів росту, стерильних пагонів, коренів і листя, які потім використовують, як експланти.

- для ізолювання тканин зародкового корінця і зародкової бруньки із насіння і подальшого їх використання як експлантів.

Загальними факторами, які визначають ефективність дедиференціації тканини експланту і розвитку первинного калусу є:

1. Генотип вихідної рослини. При цьому сорти, лінії в межах виду можуть суттєво відрізнятися;

2. Епігенетична характеристика експланту, в тому числі однорідність і неоднорідність тканини за рахунок груп різних клітин.

3. Зовнішні умови, із яких найбільш важливі екзогенні регулятори росту(переважно фітогормони), а також речовини, що діють як засоби проти виділення експлантом блокуючих калусогенез речовин (активоване вугілля, антиоксиданти).

Розмір і форма вихідного експланту не впливає на проліферацію калусу. Однак існує мінімальний критичний розмір, зменшивши який, неможливо визвати ріст експлантів – це 4 мг.

Для отримання калусу найчастіше використовують середовище Уайта, Мурасіге-Скуга, Гамборга, які доповнені 2% сахарозою чи глюкозою, сумішшю вітамінів та регуляторами росту. Для одержання первинного калусу, експланти тканин рекомендують культивувати одночасно на декількох середовищах з різним співвідношенням регуляторів росту. Успіх отримання калусу залежить від підбору регуляторів росту, які індують клітинне ділення. Як ауксини використовують 2.4Д та індолілоцтову кислоту. Індолілоцтова кислота має меншу активність завдяки тому, що вона руйнується ІОК-оксидазою первинного експланту. Для індукції утворення калусу речовини ауксинової природи використовують в 10 разів вищій, ніж та, яка використовується для підтримки його росту. Іноді необхідно вносити більш складні компоненти, такі як кокосове молоко (5-20%), гідролізат казеїну (200-800 мг/л), дріжджовий екстракт (50-100 мг/л).

Культивують калусні тканини без доступу світла при температурі +26-27°C та вологості повітря 70%. Для вирощування калусних тканин використовують термостати, кондиціоновані кімнати, які обладнані стелажми, шафи або кліматичні камери.

Деякі тканини мають фізіологічну полярність. Очевидно в зв'язку з цим калус утворюється більш інтенсивно на стороні експланту, яка на материнській рослині повернена до кореня, тому при отриманні калусу на фрагментах стебла, шматочках коренеплоду моркви, пастернаку, петрушки, експланти поміщають на агар апікальною стороною. У випадку ізоляції експлантів із бульбоплодів (топінамбур, картопля) полярність значення не має. Для повного виключення впливу полярності експланти топінамбуру необхідно поміщати на середовище тангентально.

Інтенсивність росту окремих калусів одного і того ж варіанту може значно варіювати. Тому окремі варіанти дослідів з калусними тканинами повинні мати не менше шести повторностей.

Облік росту калусних тканин проводять за наступними параметрами:

1. Сира вага, яка визначається або в кінці дослідів, або на протязі періоду росту калусних тканин для визначення його динаміки. Підраховують по формулі:

$$\frac{W_t - W_o}{W_o}$$

W_o

W_t – вага в кінці дослідів, г

W_o – вага на початку дослідів, г.

Завдяки показнику сирої ваги можна визначити величину приросту ваги по формулі:

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

W_o

2. Суха вага, яка визначається в кінці дослідів проводять її загальноприйнятим методом із середньої проби..

3. Визначення числа клітин на одиницю ваги тканини або на калус проводять в основному за методом Брауна. Даний метод дає можливість визначити за рахунок яких процесів проходить збільшення маси тканин – чи за рахунок ділення клітин чи за рахунок розтягнення клітин, а також розрахувати середню вагу клітини. Періодичне визначення числа клітин на протязі експериментів дає можливість побудувати криву росту.

Враховуючи, що традиційне вимірювання динаміки росту тканини потребує великої кількості рослинної тканини, середовищ, посуду і є громіздким був створений фотометричний прилад для визначення динаміки росту тканин.

Калусна тканина, яка вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, які не мають строго певної анатомічної структури. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним – пігментованим антоціанами повністю або зонально.

В залежності від умов вирощування та походження калусні тканини бувають:

- 1) рихлими, сильно обводненими, які легко розпадаються на окремі клітини;
- 2) середньої щільності з добре вираженими меристематичними осередками;

3) компактними, щільними з зонами редукованого камбію та судин (в основному трахеїдоподібних елементів).

Анатомічна структура рихлих калусів характеризується великою кількістю центрів меристематичної активності, розділених великими недиференційованими клітинами. Компактні калуси менш диференційовані і містять багато великих вакуолізованих клітин. Існує різниця між цими типами калусів в упакованні клітин:

компактні калуси складаються із щільно упакованих клітин. Також вони відрізняються по хімічному складу: у компактних калусів загальна кількість поліцукрів клітинної стінки вища, але низький % целюлози в порівнянні з пектиновими речовинами та геміцелюлозами. Калусні культури відрізняються по морфології та ступеню гетерогенності клітинних популяцій, по морфогенетичним і біосинтетичним потенціалам.

рихлий тип калусів в рідкому поживному середовищі дуже легко відділяє одиночні клітини і дає початок суспензійній культурі.

Як правило в довготривалій перевивній культурі, на середовищах, які містять ауксини, особливо синтетичний аналог ауксину 2,4Д, калусні тканини втрачають пігментацію і стають більш рихлими.

В циклі вирощування калусні клітини після ряду поділів проходять звичайний для клітини рослин онтогенез, вони приступають до росту розтягненням, потім диференціюються як зрілі калусні клітини і на кінець деградують.

Калусні клітини в перевивній культурі можуть спонтанно набути гормонезалежності. Природа такої гормонезалежності до одного або двох гормонів (ауксину та цитокініну), які використовуються при вирощуванні клітинних культур рослин, може бути генетичною (результат мутації) або епігенетичною (результат експресії генів, які визначають гормонезалежність клітини). При генетичній гормонезалежності калусні тканини ведуть себе так як пухлинні, при епігенетичній – вони втрачають ознаку гормонезалежності в ряді перетворень клітина-рослина-клітина, що і є доказом негенетичної природи такої набутої гормонезалежності.

Техніка культивування тканин рослин дозволяє отримати довготривалу, перевивну калусну культуру із будь-яких живих тканин клітин інтактної рослини. Різні диференційовані клітини (в тому числі і меристематичні) переходять *in vitro* до складного процесу диференціації, втрачають присутню їм структурну організацію і специфічні функції та індукуються до ділення, утворюючи первинний калус.

В процесі субкультивування формується штам, який характеризується індивідуальними генетичними та фізіологічними особливостями.

Рослинні суспензійні культури.

Суспензійні культури - це гомогенна популяція клітин та клітинних агрегатів в керованому рідкому середовищі певного складу.

Основним способом отримання суспензійних культур є занурення шматочка недиференційованого калусу в рідке поживне середовище, яке перемішується. В більш рідких випадках використовують експлантати тканин, стерильні проростки, які в рідкому поживному середовищі дедиференціюються і утворюють калус, який розпадається на окремі клітини. Іноді суспензійну культуру можна ініціювати певною кількістю гомогенату тканин, яка містить живі і зруйновані клітини. Для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої маси калусної тканини на 60-100 мл рідкого поживного середовища. Первинну суспензію отримують на качалці шейкерного типу зі швидкістю перемішування 100-120 об/хв.

Фактори , які впливають на дисоціацію калусу:

- 1) тип вихідної калусної тканини (оптимальною є калусна тканина рихлого типу, яка легко піддається фрагментації. Рихлість калусної тканини досягається виключенням цитокінінів із середовища на якому культивується калус;
- 2) умови росту калусної або суспензійної культури, які зменшують механічну стабілізацію сусідніх клітинних стінок, також сприяють їх рихлості;
- 3) видалення пектинату кальцію – основного матеріалу, який пов'язує рослинні клітини. Видалення пектинату кальцію може бути здійснено шляхом вилучення кальцію із середовища ферментативно або зв'язуванням його хелатами. При цьому як хелатуючий агент використовують оксалат амонію.

Популяція вільноживучих клітин є зручною моделлю для вивчення фізіологічних закономірностей росту, диференціації, регуляції певних сторін клітинного метаболізму соматичних клітин. Вирощування клітинних суспензій в рідкому поживному середовищі має ряд переваг перед вирощуванням калусних тканин поверхневим способом:

- в умовах рідкого середовища можна ціленаправлено впливати на метаболізм та ріст клітинних популяцій екзогенними факторами;
- вони зручніші для біохімічних та молекулярно - біологічних експериментів, перш за все для вивчення індукції ферментів та взаємозв'язок їх з клітинним циклом, експресії та репресії певних генів, ізолювання і характеристики мутантів.

Характерною особливістю суспензійних культур клітин рослин є морфологічна та біохімічна гетерогенність. Клітинна популяція містить клітини, які відрізняються по формі та розміру. Значне покращення диспергованості клітинної суспензії може бути досягнене при внесенні в поживне середовище низьких концентрацій пекто-целюлозних ферментів (пектинази, целюлази) в невеликих концентраціях (0,02%). Рівень клітинної агрегації змінюється на

протязі ростового циклу культури. Клітинні агрегати утворюються, в основному, в експоненціальній фазі в результаті мінімального розділення проліферуючих клітин. Для вирощування клітинних суспензій використовують ті ж середовища, що і для калусних культур.

Однією із цікавих особливостей, встановлених при вирощуванні суспензійних культур, є залежність їх розмноження від одночасної або попередньої присутності в середовищі клітин, які активно діляться. Було встановлено, що клітини, які активно діляться не тільки адсорбують поживні речовини середовища, але і якимось чином змінюють, „кондиціонують” її, виділяючи продукти власної біосинтетичної діяльності, сприяючи росту одиночних клітин.

Способи культивування клітинних суспензій

1. Вирощування калусу на містках-підтримках. Вперше використання обеззолених фільтрувальних підтримок було запропоновано в 1949 році вченими Готре та Еллером для культивування ізольованих тканин в вертикальних пробірках в рідкому поживному середовищі. На сучасному етапі метод використовується в основному для культивування зав'язей, зародків, проростків.

2. Накопичувальне культивування. Являє собою культуру клітин занурених в рідке поживне середовище, яка культивується на качалках ротаційного та шейкерного типу. Накопичувальна культура є закритою системою, в якій розмноження популяції клітин забезпечується в постійному об'ємі поживного середовища. При вирощуванні клітин та тканин рослин в рідкому середовищі важливою проблемою є створення достатньої аерації, яка є умовою їх розмноження та активної діяльності. Забезпечення аерації проходить за рахунок обертання флаконів навкруги горизонтальної осі (при використанні роллера), за допомогою системи „шейкер” і за рахунок обертання магнітної мішалки всередині колби (при використанні спіллера), а також продуванням середовища стерильним повітрям. Найчастіше використовують установки шейкерного типу.

3. Безперервне культивування, яке являє собою вирощування клітин в рідкому поживному середовищі в культиваторах та ферментерах шляхом барботажу або барботажу в поєднанні з механічним перемішуванням. Безперервні культури є системами відкритого типу завдяки тому, що з однієї сторони проходить приплив поживного середовища, з іншої – відтік біомаси, яка виросла. Основною робочою одиницею проточних систем є ферментери – це великі культуральні сосуди, об'ємом більше 1 л, які використовуються для виробництва великих клітинних біомас.

Безперервні культуральні системи підрозділяють на:

- **напівпроточні системи**, режим вирощування яких оснований на принципі відбору певної частини клітинної суспензії через певний проміжок часу та розведення частини культури, що залишилась свіжим поживним середовищем.

Дана система використовується в основному для отримання великої маси суспензії з метою її подальшого біохімічного дослідження.

- **закриті проточні системи**, при яких суспензійна культура постачається безперервним притоком свіжого середовища, який збалансований видаленням рівної кількості використаного середовища. Клітини при такому типі культивування залишаються в системі. Використовуються дані системи для оптимізації утворення метаболітів, які виділяються клітинними суспензіями в середовище, а також при вивченні цитодиференціації, коли клітини підтримуються довгий період часу в стані не ділення.

- **відкриті проточні системи**, які функціонують на принципі балансу між притоком свіжого поживного середовища та видаленням рівного об'єму клітинної суспензії, на відміну від накопичувального культивування, при якому в результаті змін оточуючих умов не досягається збалансований стан між ростом та біосинтезом важливих метаболітів і склад клітин безперервно змінюється. При такому принципі культивування швидкість видалення частини клітин із системи повинна відповідати швидкості утворення нових клітин, що створює стан рівноваги між ростом клітин та біосинтезом. Дані проточні системи використовують для встановлення певного стану росту і метаболізму, дослідження змін при переході від одного стану до іншого, ідентифікації контролюючих факторів, порівняння біосинтетичного потенціалу клітин різних клонів в умовах, які сприяють однаковій швидкості продукції біомаси та вибору оптимального режиму для отримання максимальної кількості продукції метаболітів.

По принципу відношення до факторів поживного середовища, які покладені в основу безперервного культивування, відкриті проточні системи підрозділяють на:

хемотати –це система з суспензією, що перемішується в яку по раніше розробленій програмі з постійною швидкістю безперервно подається свіже середовище і з такою ж швидкістю відбирається частина культури. Загальний об'єм культури при цьому залишається постійним.

турбідостати –це системи культивування в яких проходить при надлишку субстрату, без зовнішнього лімітування фактору живлення. Інтенсивність росту в даному випадку визначається тільки властивостями хімічних і фізичних факторів навколишнього середовища (температури, освітлення, газообмін, кислотність) і швидкістю протікання метаболічних процесів в клітині. Цей вид культивування більш досконалий, так як дозволяє в значній мірі автоматизувати роботу ферментера і підтримувати ріст клітинної популяції на протязі декількох років.

Основні параметри росту культури клітинних суспензій.

1. *Щільність клітинної популяції* – концентрація клітин в 1мл суспензії. По величині щільності клітинної популяції можна визначити питому швидкість росту і час генерації клітин.
2. *Питома швидкість росту* – швидкість збільшення одиниці біомаси популяції за певний проміжок часу, визначається по формулі:
3. *Максимальна питома швидкість росту*, відноситься до характеристики росту клітинних популяцій в турбідостатній культурі, де поживні елементи середовища містяться в нелімітованій кількості.
4. *Мінімальний час подвоєння клітинної популяції* – час, необхідний для того, щоб концентрація біомаси популяції подвоїлась. Ріст рослинних суспензійних культур вимірюється визначенням сухої і сирої речовини клітин, кількості клітин, об'єму біомаси клітин, розміру клітин, середнього об'єму клітин, вмісту білку.
5. *Вага сирої речовини* визначається після розміщення клітин на попередньо зважений фільтр із нейлонової тканини після промивання водою від залишків поживного середовища.
6. *Вага сухої речовини* встановлюється після висушування певної наважки сирої біомаси клітин на попередньо зваженому паперовому фільтрі при 60-70°C на протязі доби.
7. *Кількість клітин* визначаємо в 1 мл дисоційованої суспензії по методу Брауна.
8. *Об'єм біомаси клітин* виражають в мл клітинного осаду на 1 мл культури.. Визначають центрифугуванням суспензії і подальшого її відстоювання.
9. *Середній об'єм* клітини визначають відношенням величини об'єму біомаси клітин до кількості клітин.
10. *Розмір клітин* визначають вимірюванням їх довжини і ширини під мікроскопом з допомогою шкали окуляр-мікрометра та об'єкт мікрометра.
11. *Вміст білку* визначають відношенням кількості білку в суспензійній культурі до кількості клітин.
12. *Життєздатність культури* визначаємо відношенням кількості життєздатних клітин до загальної кількості клітин в 1 мл культури. Для цього зафарбовують препарати 0,01% флуоресцеїноцетатом або 0,5% розчином синього Еванса. Живі клітини характеризуються наявністю ядер,

Клітини вищих рослин, що довготривало культивуються, утворюють специфічну популяцію. Клітини калусів, що вирощуються поверхнево та клітини суспензій, які культивують глибинно є самостійними одиницями і розмножуються клонально. Популяції соматичних клітин фізіологічно асинхронні і генетично гетерогенні. Найбільш важливою характеристикою популяції є її ріст. Як правило,

ріст популяції клітин *in vitro* оцінюють по числу клітин та загальній біомасі. не дивлячись на асинхронність популяції і відносну самостійність клонів з яких вона складається, клітини *in vitro* в цілому проходять фази ростового циклу, характерні для клітин вищих рослин *in vivo*.

Ріст клітинної популяції в циклі вирощування виражається S-образною кривою. В процесі субкультивування клітини послідовно проходять такі фази:

1 Латентну або лаг-фазу – це початковий період, в якому клітини не розмножуються і не збільшуються в розмірах. Але на протязі даного періоду в стаціонарних клітинах проходять зміни направлені на підготовку і вступ їх у фазу активного ділення.

2. Експоненціальна (логарифмічна) фаза–проходить збільшення кількості клітин та сухої речовини. Спостерігається збільшення цитоплазми, кількості рибосом і мітохондрій на клітину. Проходить активація клітинного метаболізму, збільшується вміст білку, РНК, ДНК, інтенсивність поглинання кисню.

3. Лінійна фаза характеризується зниженням швидкості росту, сповільненим клітинним діленням, збільшенням середнього розміру клітин і клітинної дисоціації. Збільшення біомаси проходить за рахунок розтягнення клітин.

4. Рання стаціонарна фаза. Збільшується середній розмір клітин і вміст сухої речовини в перерахунку на одну клітину, але кількість клітин не змінюється. Клітинна дисоціація досягає максимуму. Початок синтезу «білків старіння». Початок цієї фази обумовлений виснаженням поживного середовища, в основному джерел азотного, фосфорного, вуглеводневого живлення.

5. Стаціонарна фаза. Клітини піддаються певним фізіологічним змінам таким, як різке зменшення об'єму цитоплазми, вакуоля досягає максимальної величини, проходить руйнування органел, різко падає активність дихання, що призводить до старіння та загибелі культури.

Проблема довголіття, старіння і смерті клітин в популяції має велике теоретичне і практичне значення. Загибель клітин може проходити по різним причинам.

1. Випадкова загибель (фітовіруси, бактерії).
2. Із-за передчасного зношування клітин в результаті неоптимальних умов існування.
3. Смерть клітин внаслідок нормальних процесів розвитку і старіння («генетичний лічильник», відсутність теломери).

Не менш важливою властивістю соматичної популяції клітин є її асинхронність. Асинхронність популяції характеризується тим, що одночасно під час ростового циклу одні клітини діляться, другі ростуть, треті знаходяться в стадії фізіологічної зрілості, четверті старіють. Проте загальний фізіологічний

стан асинхронної популяції оцінюють по стану переважаючого числа клітин. Причини асинхронності популяції клітин *in vitro* різноманітні.

- особливості виду, сорту, генотипу індивідуальної рослини і експланту, вибраних для отримання первинного калусу.
- стреси при культивуванні, безпосередньо неоптимальне поживне середовище для даного типу клітин.
- зміна балансу ендогенних гормонів протягом циклу вирощування та концентрація екзогенних гормонів в середовищі.
- фізичні фактори культивування такі, як температура, освітлення, аерація.
- генетична гетерогенність клітин і клонів.
- особливості і аномалії мітотичного циклу клітин *in vitro*.

На сучасному етапі розроблені різноманітні методи синхронізації клітин. Як правило для синхронізації використовують прийоми, які призупиняють клітинний цикл на межах його фаз.

Перший варіант – двократне виключення із поживного середовища фосфору (на початку експерименту і після певного інтервалу часу).

Другий варіант – введення в поживне середовище 5-аміноурацилу, який затримує клітини на межі G_1/S циклу.

Третій варіант - використання 5-метилсечовини, який є найбільш вдалий. Він дозволяє зібрати більше 80% клітин в одній фазі циклу.

Однією із важливих особливостей популяції соматичних клітин *in vitro* є нестабільність геному клітин та їх генетична гетерогенність. Необхідно відмітити, що генетична гетерогенність клітинних популяцій *in vitro* міцно пов'язана з фізіологією індивідуальних клітин і клонів, які з яких складається клітинна популяція. Зруйнувати зв'язок між генетикою і фізіологією в популяції неможливо.

Можна назвати декілька причин нестабільності геному клітин *in vitro*. Із відомих причин можна виділити наступні:

- генетична гетерогенність певного виду, сорту, органу, тканини, які використовуються як експланти для отримання первинного калусу.
- Як правило клітини експланту виходять із мітотичного циклу в G_1 - фазі. Таким чином, поділ клітин експланту по в'язаний із синтезом ДНК в незвичайних для клітин експланту умовах, що може призвести до аномалій мітозу.
- Умови *in vitro*, в яких культивуються експланти виникає первинний калус при перепрограмуванні клітин і перших поділах калусу, можуть бути аномальними.
- Мутагенна дія екзогенних гормонів і стимуляторів.
- Довготривале субкультивування калусних культур, яке призводить до накопичення в популяції генетично змінених клітин і клонів. цитоплазматичних тяжей, рухом цитоплазми.

Культури клітин рослин *in vitro* продукують вторинні метаболіти в досить високих концентраціях, хоча іноді в рослинах клітин вони присутні в дуже малих кількостях. Для одержання вторинних метаболітів рослин використовують три основні типи культур *in vitro* культура органів, калусна культура і суспензійна культура.

Зміни вторинного метаболізму, які відбуваються в культурах клітин при вирощуванні *in vitro* в інших фізико-хімічних умовах, обумовлені наступними факторами:

- 1) відсутністю диференціації в деяких калусних і суспензійних культурах;
- 2) біохімічною тотипотентністю клітин рослин – це явище при якому весь генетичний і фізіологічний матеріал, необхідний для утворення вторинних метаболітів, знаходиться в кожній окремій клітині і культивовані клітини незалежно від походження експланту, здатні в стабільних умовах культивування до синтезу аналогічних вторинних метаболітів;
- 3) механізмом дерепресії-репресії генетичної інформації, яка контролює біосинтез вторинних метаболітів та структурною перебудовою геномів (хромосомного апарату) культивованих клітин.

Для одержання великої кількості економічно важливих продуктів вторинного метаболізму необхідні двохступінчаті етапи культивування клітин, при яких на першому етапі будуть створюватись умови, які сприяють оптимальному накопиченню клітинної біомаси, і на другому – культивування в певному стійкому стані хеостатного або турбідостатного режимів.

Лекція 5

Клітинні технології для отримання економічно важливих речовин вторинного походження.

План лекції

1. Клітинні технології для отримання економічно важливих речовин.
2. Фактори, які впливають на накопичення вторинних метаболітів в культурі клітин рослин.
3. Системи культивування клітин.
4. Етапи робіт по створенню клітинних технологій для отримання вторинних речовин.

Рослини використовують не тільки як джерело живлення, але і як постачальники широкого набору хімічних сполук таких як лікарські препарати, фарбники, харчові добавки, інсектициди. В основному це стосується речовин вторинного походження. В рослині вуглеводи і білки є первинним матеріалом, що утворюється безпосередньо в процесі фотосинтезу. Всі інші органічні сполуки, які утворюються в живій клітині шляхом різних хімічних перетворень первинного матеріалу – є речовинами вторинного походження. Першими серед вторинних речовин в культурі тканин привернули увагу вчених алкалоїди. Аналіз калусних культур барвінку рожевого, раувольфії зміїної, блекоти чорної, дурману та інш. показав, що вони містять алкалоїди. Завдяки зусиллям багатьох вчених накопичено немало цінної інформації про здатність калусних тканин синтезувати і інші біологічно активні речовини. Клітини рослин, що культивуються зберігають присутню вихідному виду рослин здатність синтезувати широкий спектр речовин вторинного метаболізму: алкалоїди, терпеноїди, глікозиди, поліфеноли, поліцукри, ефірні олії, незвичні пептиди та спеціалізовані білки, натуральні барвники, стероїди, прянощі, інсектициди, воски, вітаміни.

Промислове вирощування клітин та тканин – продуцентів економічно важливих речовин – нове направлення біотехнології. Якщо традиційні біотехнології для отримання цінних біологічно активних речовин використовували цілі організми: мікроорганізми, рослини, тварини, то сучасна біотехнологія націлена на клітинні технології, які ґрунтуються на культивуванні вільних та іммобілізованих клітин. Доведена можливість культури клітин здійснювати біотрансформацію, тобто синтезувати деякі біологічно активні речовини із дешевих та доступних їх попередників. Ці „напівпродукти” вторинних речовин не можуть бути перетворені хімічним або мікробіологічним шляхом, і тільки завдяки ферментам клітин в культурі проходить їх хімічне перетворення в цінний кінцевий продукт.

Зміна складу поживного середовища та інших параметрів культивування призводить до зміни не тільки кількісного, але і якісного складу продуктів біосинтезу, в результаті чого можуть бути отримані абсолютно нові сполуки з іншим типом дії. Японські вчені досягли успіхів в отриманні *in vitro* таких нових

біологічно активних речовин, як незвичні пептиди, антиканцерогенні сполуки, убіхінон-10 та інш. Наступним кроком в клітинній біотехнології стало використання іммобілізованих рослинних клітин.

Культура клітин, для того щоб стати об'єктом промислового вирощування, повинна витримати конкуренцію з дикоростучими та культурними лікарськими, технічними рослинами, а також з мікробіологічним виробництвом та хімічним синтезом. В порівнянні з традиційною рослинною сировиною клітинні культури мають ряд переваг:

- 1) Незалежність від впливу різних факторів навколишнього середовища (клімат, пора року, погода, ґрунтові умови, шкідники);
- 2) Більш високий вихід і якість продукції завдяки оптимізації та стандартизації умов вирощування;
- 3) Економія посівних площ.

Враховуючи, що тільки рослини є джерелом багатьох економічно важливих речовин, а запаси рослинної сировини виснажуються, неважко уявити місце клітинних технологій в майбутньому. Обмеження в створенні високорентабельних технологій виникає завдяки недостатності фундаментальних знань про генетичну, біохімічну, фізіологічну регуляцію вторинного метаболізму в рослинній клітині. Можливі функції вторинних речовин в інтактній рослині до кінця не вивчені, але для більшості з них основною функцією є захист рослин від різних стресових факторів, тобто вони відіграють регуляторну роль, забезпечуючи життєдіяльність організму. Клітини *in vitro* – нова експериментально створена біологічна система, особливості якої в тому числі і функції вторинних сполук, ще мало вивчені. Показано, що іноді у клітин, які культивуються в спеціалізованому об'ємі проявляються особливості, характерні для філогенетично ранніх груп рослин або ювенільної стадії розвитку рослини. Нестача фундаментальних знань дуже гальмує розвиток технології клітин, що культивуються.

Популяція клітин *in vitro* проходить певний онтогенез: розмноження (ділення) – розтягнення – диференціювання – старіння – смерть клітин. Співвідношення клітин, які знаходяться на різних стадіях розвитку, змінюється в залежності від того, який процес переважає. При зміні умов культивування рівновага зміщується в ту чи іншу сторону. Диференціація калусної клітини, яка вийшла із циклу ділення, заключається в її спеціалізації на синтезі видоспецифічних вторинних сполук. Відомості про контроль біосинтезу вторинних метаболітів клітинною диференціацією неоднозначні. В ряді випадків синтез вторинних речовин починається з появою в культурі морфогенних структур, в інших дослідах високий вихід речовин спостерігався в недиференційованій калусній тканині. Також суперечливі відомості про зв'язок синтезу вторинних сполук з ростом клітин. У багатьох культур при періодичному режимі вирощування вторинні метаболіти накопичуються в значних кількостях

лише при сповільненні або зупинці росту, проте в окремих випадках синтез продукту сприяє росту клітин. Можливо, механізми та умови, які блокують ділення клітин і активний ріст, є одночасно механізмами активації, які забезпечують синтез ферментів вторинного метаболізму. В будь-якому випадку перш за все стараються створити оптимальні умови для росту, тобто накопичення біомаси, а потім досліджують вплив цих умов на біосинтез вторинних метаболітів. У випадках коли утворення біомаси не пов'язане з синтезом вторинних речовин, стараються встановити баланс між біомасою та виходом речовини.

Фактори, які впливають на накопичення вторинних метаболітів в культурі клітин рослин.

Генотип донорської рослини. Генотип батьківської рослини, тобто донора експланту для введення в культуру, суттєво впливає на біосинтетичний потенціал клітин, що культивуються. М.Ценк із співробітниками для отримання культури барвінку рожевого (*Catharantus roseus*) зібрав 184 зразки насіння із різних місць походження. Із проростків цього насіння були відібрані декілька найбільш багатих гіпотензивними індолними алкалоїдами серпентином та аймалицином (більше 0,7% на суху масу), із яких були одержані калусні культури, і вміст алкалоїдів у них був у 4-5 раз більший, ніж у калусів, отриманих із низькопродуктивних рослин. Проте У.Реллер не знайшов подібної залежності в утворенні серпентину калусними культурами, одержаними із різних рослин барвінку рожевого. Японські вчені також не спостерігали кореляції між вмістом алкалоїду берберину в інтактних рослинах та калусних культурах василистнику (*Thalictrum minus*). Можливо ці суперечливі результати пояснюються тим, що оцінка вихідного генотипу визначалась тільки по фенотипу. З.Б.Шаміна із співробітниками використовували для одержання клітинних культур ізогенну лінію маку снодійного (*Papaver somniferum*). Апікальні меристеми, ізольовані одночасно із різних, але одновікових рослин, які культивувались на однакових середовищах. Отримані калуси суттєво відрізнялись як за ростовими характеристиками, так і за синтезом алкалоїдів.

А Кінеслі та Д.Дугелл досліджували синтез нікотину в калусних культурах, одержаних від двох різних пар тютюну (*Nicotiana tabacum*), які відрізнялись по вмісту нікотину і були ізогенні по всім локусам. Високий вихід нікотину дали культури, які були ініційовані із високопродуктивних рослин. Хоч наведені дані і суперечливі, проте більшість вчених традиційно враховують генетичну характеристику тканини. Проте це зовсім не значить, що як експлант використовують тільки тканину, яка багата на пошукану речовину, поскільки висока концентрація речовини може відображувати накопичення її в тканинах шляхом направленого транспорту, а не як продукт синтезу по місцю локалізації. Тобто вибір органу рослини для введення його в культуру має велике значення. Так, наприклад, вміст стероїду діосгеніну в культурі клітин діоскореї (*Dioscorea floribunda*), одержаної із клубнів, був вищий ніж в культурі клітин із пагонів. Але необхідно враховувати, що клітини *in vitro* тотипотентні у відношенні синтезу

вторинних сполук, тобто будь-яка клітина при створенні відповідних умов культивування може продукувати речовини, які характерні для вихідної рослини. Необхідно підкреслити, що гени, які відповідають за регуляцію біосинтезу вторинних метаболітів, присутні і в інших клітинах, які зазвичай їх не продукують. В деяких випадках біосинтетичні здібності культури клітин відновлювались при регенерації рослин. Наприклад, культура клітин наперстянки при довготривалому культивуванні втрачала здатність до синтезу глікозидів, а рослини, які були регенеровані із цієї культури, відновлювали їх біосинтез. Таким чином, генетична інформація в клітинах зберігається, але для її реалізації необхідні специфічні умови. Клітини, що культивуються і були ізольовані із високопродуктивних рослин та тканин, містять необхідну генетичну інформацію для біосинтезу цих метаболітів.

Гетерогенність клітин, що культивуються.

У культивованих клітинах можуть проходити значні зміни вторинного метаболізму в порівнянні з інтактними рослинами. Неорганізовано проліферуючі калусні клітини в основному характеризуються низьким вмістом пошуканої речовини. В той час у деяких рослин клітини *in vitro* продукують підвищену кількість алкалоїдів, наприклад у аммі зубної (*Ammi visnaga*) і деяких видів дурману. Не поступається цілій рослині по вмісту активних речовин і культура клітин женьшеню (*Panax diseng*). У окремих рослин в культурі клітин синтезуються речовини, не знайдені *in vivo*, наприклад, едулінін та рутакультин у рути духм'яної (*Ruta graveolens*) та арморин у Стефанії (*Stephania cepharantha*). У живокоста аяксового (*Delphinium ajacis*) в складі стеринів у культивованих клітин було знайдено більше компонентів, чим у рослини донора. У *Andrographis paniculata* культивовані клітини містили інші сесквітерпени, в порівнянні з інтактною рослиною. Спектр стероїдних сапонінів та стеринів в клітинній культурі, одержаній із кореневищ діоскореї дельтоїдної (*Dioscorea deltoidea*), значно відрізнявся від складу стеринів вихідної тканини. Ці факти свідчать, що вторинний метаболізм в клітинах рослин знаходиться в тісній залежності від процесів розвитку (цитодиференціювання). Зміни вторинного метаболізму в калусних культурах викликані, очевидно, відсутністю диференціації тканини. Дуже часто диференційовані культури тканин синтезують більші кількості вторинних речовин в порівнянні з недиференційованими. Проте це не є абсолютним правилом. З'являється все більше даних, що органогенез в культурі не є необхідною умовою для біосинтезу вторинних метаболітів *in vitro*. Наприклад, іноді органогенез супроводжується пожежням вмісту вторинних речовин. Порушення автотрофності живлення при переході до гетеротрофного типу обміну також може призводити до неповної реалізації генетичних можливостей клітини. У цілого ряду рослин (*Panax diseng*, *Dioscorea deltoidea*, *Ruta graveolens*, *Catharantus roseus*, *Rauwolfia serpentina*, *Solanum laciniatum*), калусні тканини протягом багатьох років зберігають здатність до видоспецифічних біосинтезів.

Клітини рослин *in vitro* характеризуються генетичною гетерогенністю, що також може бути причиною зміни вторинного метаболізму. Разом з тим

гетерогенність клітинної популяції може грати позитивну роль, даючи можливість відбирати лінії клітин із сильно зміненими властивостями, безпосередньо з підвищеним синтезом пошуканої речовини або синтезуючі абсолютно нові речовини. Зміни геному культивованих клітин можуть бути викликані шляхом індукованого мутагенезу. Біохімічні мутанти можуть бути отримані при обробці культури мутагенами або антиметаболітами. Так, в результаті хімічного індукованого мутагенезу та селекції на клітинному рівні в Інституті фізіології рослин АН СРСР були відібрані мутантні клітинні лінії раувольфії зміїної, яка містить в 10 раз більше анти аритмічного алкалоїду аймалину, і діоскореї дельтовидної, яка продукує діосгенін – цінну сполуку для фармацевтичної промисловості в тих же кількостях, що і кореневище інтактної рослини. В подальшому, завдяки використанню метода експериментального мутагенезу та клонування, штам діоскореї дельтовидної дав ще більш продуктивні клітинні лінії. При обробці культури антиметаболітами, наприклад, аналогами ароматичних амінокислот, більшість клітин гине. Одиначні мутантні клітини, які виживають в цих умовах, здатні синтезувати надлишкову кількість метаболіту. Так, були одержані клони клітин моркви та картоплі, які синтезували велику кількість триптофану, клони клітин клену білого, що продукували багато фенілаланіну та тирозину.

Хімічні та фізичні фактори культивування

Вирішальними факторами поживного середовища, які ефективно регулюють первинний і вторинний обмін клітин, є фітогормони. В роботах присвячених вивченню дії фітогормонів, показано, що вона залежить від виду рослини, від природи вторинного з'єднання, від клітинного штаму і т.д. Тому результати досліджень по впливу фітогормонів на синтез вторинних метаболітів край протилежні. М.Ценк із співробітниками вивчили вплив 146 сполук з фуксиною дією на ріст і утворення антрахінонів у культури клітин моринди лимонно-листяної (*Morinda citrifolia*) із родини маренових. Вони встановили, що багато із них підтримували хороший ріст клітин, але тільки два: альфа-нафтилоцтова кислота та 2,3,6- трихлорбензойна кислота підтримували ріст культури та стимулювали утворення атрахінонів. Дуже широко використовується 2,4Д, який здатний стимулювати як ділення, так і розтягнення клітин. Проте він може викликати різке пригнічення синтезу продуктів вторинного метаболізму. Варіюючи концентрації та типи ауксинів і цитокінів, можна значно вплинути на процеси синтезу кожною конкретною культурою пошуканої речовини.

Важливим фактором середовища, який впливає на накопичення біомаси, є вуглеводи. Враховуючи, що клітини *in vitro* в основному гетеротрофні, то зазвичай як джерело вуглеводів використовують сахарозу. Конкурувати з сахарозою може і глюкоза, проте за рідким виключенням, ріст і високий рівень біосинтезу в культурі забезпечує саме сахароза. Підвищення концентрації сахарози призводить в основному до збільшення виходу вторинних метаболітів. Проте високі концентрації сахарози підвищують осмотичний потенціал

середовища, вплив якого на метаболізм клітин, що культивуються не вивчено. Актуальним залишається пошук дешевих вуглеводневих добавок.

Великий вплив на синтез вторинних сполук має мінеральний склад середовища. При цьому найбільш значимими є азот, фосфор, калій. Проте їх вплив дуже специфічний як в відношенні виду рослини, так і відношенні того чи іншого продукту, про що свідчать наступні приклади. Так, якщо у одних культур органічні форми азоту – пептон, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну – пригнічують накопичення вторинних сполук, то в інших – підвищують їх синтез. Співвідношення амонійного та нітратного азоту в поживному середовищі також має значення. В культурі клітин тютюну посилюється синтез нікотину із зменшенням в середовищі сахарози, нітратів і фосфору. Безфосфатне середовище сприяє утворенню алкалоїдів та інших вторинних метаболітів в калусній культурі гармали. Нестача фосфору стимулює синтез вторинних сполук у деяких інших культур, проте є протилежні дані. Безнітратне середовище сприяє синтезу капсаїцину калусною культурою перцю кущевидного. Серед трофічних факторів позитивне значення для біосинтезу вторинних речовин мають деякі попередники самих пошуканих сполук. Можна припустити, що при тривалому культивуванні тканин в обмеженому об'ємі середовища, коли знижується здатність клітин синтезувати органічні речовини, додавання в середовище вторинних сполук повинно відобразитись на їх біосинтезі клітинами. Як попередники виступають амінокислоти (глутамат, фенілаланін, лейцин, орнітин, та інш.). Проте не всі калусні тканини їх використовують. Можливо має значення час внесення попередника в середовище.

Відсутність бажаного ефекту від внесення в поживне середовище попередників можна пояснити наступними причинами: вони не поглинаються клітинами (можливо клітини синтезують їх самі); вони розкладаються в процесі приготування та стерилізації середовища; переходять в інші фізіологічно неактивні форми. Не виключено, що попередники можуть виступати, як інгібітори росту культури. Для виявлення ролі попередників необхідні більш ретельні дослідження з використанням радіоактивної мітки. Основною перешкодою в цих роботах є недостатнє знання шляхів біосинтезу багатьох продуктів вторинного метаболізму. Органічні добавки невизначеного складу такі, як гідролізат казеїну та кокосове молоко можуть проявити буферну дію. Буферна ємність середовищ дуже низька, тому величина вихідного рН (5-6) при культивуванні швидко змінюється на декілька одиниць, а це в свою чергу, відображується на біосинтетичних властивостях та здатності до накопичення продукту клітин, що культивуються.

Таким чином, оптимізація поживного середовища є ключовим моментом підвищення виходу продукту. Результатом подібних досліджень є продукційні середовища, на яких культивовані клітини при незначній або повній відсутності поділу клітин синтезують значні кількості вторинних метаболітів.

Фізичними факторами, які впливають на накопичення вторинних метаболітів клітинами є: освітлення, температура, аерація і режим перемішування у випадку суспензії, газовий склад в колбах. Стимулюючу дію світла на утворення вторинних сполук в культурі клітин показано на прикладі каротиноїдів, ефірних масел, коричних масел, флавоноїдів, пластохінонів, антоціанів, катехінів, алкалоїдів, вітамінів. Світло активувало ферменти фенольного метаболізму, не впливаючи при цьому на ферменти вуглеводневого та ліпідного обміну.

Велике значення має якість світла. Так, наприклад, дуже ефективним для накопичення вторинних речовин культурою клітин петрушки було постійне їх освітлення люмінесцентним світлом типу „холодне світло”. Синтез флавонових глікозидів клітинами петрушки був особливо чутливим до ультрафіолетового світла з довжиною хвиль нижче 320 нм і наступному опроміненню світлом в області „червоний – довгохвильовий червоний”. Синє світло збільшувало утворення антоціанів в культурі клітин гаплопаппуса. В деяких випадках світло мало інгібуючу дію, подавляючи синтез алкалоїдів у дурману та скополії, знижувало вміст нікотину у калусах тютюну, алкалоїдів – в культурах клітин хінного дерева. Є відомості про вплив освітлення на співвідношення різних класів вторинних сполук, а також дані про відсутність світлової та темної дії на накопичення вторинних метаболітів.

Даних про вплив температури на ріст і біосинтези клітинних культур дуже мало. Однак той факт, що температура впливає на вторинний метаболізм інтактних рослин, говорить про необхідність досліджень в цьому напрямку. Тим паче, що температурні оптимуми для росту культури клітин та біосинтезів не завжди співпадають. Так, наприклад, найкращий ріст калусів гармали спостерігався при 30⁰С, а максимум утворення алкалоїдів досягав при 25⁰С.

Накопичення клітинами вторинних продуктів метаболізму є результатом динамічної рівноваги між біосинтетичними, біотрансформаційними та біодеградаційними процесами. Вплив зовнішніх та внутрішніх факторів на кожний із цих процесів дуже складний і із-за відсутності фундаментальних знань не піддається контролю. Тому необхідно визнати оправданим той емпіричний підхід при вивченні впливу факторів культивування на накопичення вторинних речовин, який розповсюджений на даний час.

4. Системи культивування клітин.

Суспензійна культура клітин.

Велике значення для росту і біосинтезу клітин *in vitro* мають технічні характеристики систем культивування. Біотехнологічне виробництво вторинних метаболітів рослин ґрунтується переважно на суспензійній культурі. В лабораторіях при дослідженні вторинного метаболізму *in vitro* суспензія зазвичай культивується в колбах в невеликих об'ємах (40-200 мл) і перемішується на кругових качалках. Швидкість обертання посудів (90-120 об/хв..) може значно впливати на ріст і накопичення метаболітів. Так, у клітин красавки і клену

субоптимальні швидкості покачування понижали ріст, а високі швидкості збільшували вихід нікотину. При масштабному вирощуванні у багато літрових ферментерах змінюються параметри культивування, перш за все аерація і швидкість перемішування. Для культивування суспензій в виробничих масштабах використовується апаратура, розроблена для мікробіологічної промисловості, проте дослідження останніх років показали, що рослинні клітини в силу своїх специфічних особливостей вимагають особливих судів для культивування. Клітини рослин в десятки, сотні раз більші ніж великі клітини бактерій та грибів, крім того, їх розміри міняються в процесі онтогенезу. Якщо на початку експоненціальної фази росту вони мілкі і щільні, то в стаціонарній фазі росту вони дуже збільшуються в розмірах і вакуолізуються. Чим більшою стає клітина, тим більша вірогідність її механічного пошкодження в процесі перемішування. В той же час клітини рослин, великі і важкі, вимагають ефективного перемішування. Осідання їх призводить до появи „мертвих” зон в сосудах, в яких проходить швидке накопичення та старіння клітин. Стійкість штаму до механічного стресу є важливою вимогою до культури і важкою задачею для дослідників. М'яке перемішування та аерацію забезпечує пневматичний спосіб перемішування потоком стисненого стерильного повітря, яке подається в ферментер з висхідним потоком повітря. На жаль і цей метод має свої недоліки тому, що в культуральному середовищі виникає надлишок повітря, який призводить до кисневого голодування. Від концентрації кисню в середовищі залежать ріст та вторинний метаболізм клітин.

В мікробіологічних системах вивчений взаємозв'язок росту біомаси, виходу пошуканої речовини та постачання кисню. Для рослин таких даних немає. На ріст клітин, крім кисню, можуть впливати і інші гази. Наприклад, вуглекислий газ може суттєво впливати на тривалість лаг фази. Висока ступінь аерації може суттєво впливати на ріст і синтез продуктів вторинного метаболізму за рахунок того, що видаляється вуглекислий газ та леткі сполуки. Клітини рослин *in vitro* в порівнянні з мікроорганізмами мають низьку інтенсивність дихання, що повинно враховуватись при конструюванні сосуна для культивування.

Порівнювали ріст і утворення метаболітів клітинами в ферментерах різних типів. Клітини моринди лимонно-листякової, яка культивувалась в ферментерах з продуванням повітрям, містили атрахінону на 30% більше ніж ті, перемішувались в колбах і в два рази більше, ніж в ферментерах других систем. Вихід біомаси клітин не змінювався в залежності від типу біореактора. Клітини барвінку рожевого також синтезували більше індольних алкалоїдів при культивуванні в ферментері з продуванням повітрям, чим в біореакторах з механічним перемішуванням. Особливістю суспензійних культур клітин рослин є їх висока густина, необхідна для росту. Тому складністю при культивуванні клітин рослин є збільшення в'язкості, яка супроводжує ріст біомаси. Це призводить до адгезії. Адгезія (прилипання) клітин одна до одної, на поверхні культурального сосуда и занурених в нього мішалок і датчиків викликає затруднення. В верхній частині сосуна поступово може утворюватись піна, яка складається із виділяємих клітинами білків та полісахаридів. В процесі

культивування клітини злипаються і частина з них скопи чується в цій піні, утворюючи „корку” або „безе”. Із збільшенням біомаси клітин збільшується і „корка”, знижуючи інтенсивність перемішування, що може призвести культуру до загибелі.

Клітини рослин мають меншу фізіологічну і метаболічну активність в порівнянні з мікроорганізмами. Час генерації (інтервал часу між двома наступними клітинними поділами) рослинної клітини в 60-100 раз перевищує час мікробної клітини. Пул проліферуючих клітин не перевищує 50-60%, багато клітин швидко припиняє поділ і переходить в фазу спокою. Всі ці обставини визначають тривалий ріст популяції клітин при накопичувальному або періодичному вирощуванні. Підтримання стерильності протягом довгого часу також є однією із технічних проблем, особливо при безперервному культивуванні. Періодичне або накопичувальне культивування – це самий простий спосіб вирощування клітин, який є традиційним. Всі викладені специфічні особливості рослинних клітин затруднюють можливості великомасштабного культивування в безперервному режимі, проте в перспективі, можливо, перехід до нього відбудеться. Особливо для тих культур, у яких синтез чітко корелює з ростом: на першій стадії культивування проходить накопичення біомаси, на другій – синтез продукту, заради якого проводиться культивування.

Імобілізовані клітини

Калусні культури при поверхневому культивуванні накопичують вторинних метаболітів більше, чим клітини, які ростуть в рідкому середовищі. Показано, що у багатьох видів рослин компактні калусні тканини, які повільно ростуть на агаризованому середовищі накопичують алкалоїдів більше ніж рихлі і швидко ростучі культури так, як для нормального метаболізму необхідна просторова організація клітин. Положення клітини в організмі є одним із факторів, який визначає ступінь і тип її диференціації. Клітини, які ростуть ізольовано одна від одної мають зовсім різні умови оточення і, як наслідок цього, різні шляхи метаболізму. Можна передположити, що чим ближче клітина або група клітин по рівню організації до цілої рослини, тим більша вірогідність, що в них будуть реалізовуватись метаболічні шляхи, характерні для цілого організму. Літературні дані про позитивну кореляцію між накопиченням вторинних метаболітів і ступінню диференціювання в культурах клітин підтверджують це. В зв'язку з цим останнім часом підвищилась цікавість до іммобілізованих клітин.

Імобілізація (створення нерухомості) клітин забезпечує умови, які призводять до диференціації і сприяють збільшенню виходу вторинних речовин. Метод іммобілізації дозволяє клітинам рости в тісному фізичному контакті одна з одною. Коли клітини контактують між собою, в їх масі, як і в інтактному організмі, встановлюються певні хімічні та фізичні градієнти, які регулюють метаболізм та процеси диференціації. Це градієнти регуляторів росту, поживних речовин, кисню, вуглекислого газу.

Клітини можуть бути іммобілізовані 4 способами:

- 1). Іммобілізація в інертному субстраті, тобто занурення клітин в одне із цементуючих середовищ (альгінат, агар, поліакриламід, колаген або комбінація гелів;
- 2). Адсорбція клітин на інертний субстрат;
- 3). Адсорбція клітин на інертний субстрат з допомогою біологічних макромолекул (лектини);
- 4). Ковалентне зв'язування клітин з будь-яким інертним субстратом типу карбоксилметилцелюлози.

Найчастіше використовують перші два способи. Клітини, які прикріплені до біологічного інертного субстрату, зберігають життєздатність. Навколо фізично нерухомих іммобілізованих клітин можуть циркулювати великі об'єми поживного середовища, регулюючи склад якого уповільнюють ріст клітин і тим самим підвищують вихід вторинних продуктів.

Іммобілізовані клітини необхідно постачати у великій кількості попередниками, але в низьких концентраціях. Дані попередники повинні бути як можна ближче до пошуканої речовини в ланцюгу біосинтезів. Враховуючи, що клітини в іммобілізованому вигляді культивуються довгий час, то для цього використовують клітини, які самі природнім шляхом, секретують необхідні метаболіти в поживне середовище або можуть бути індуковані до такої секреції завдяки впливу низьких температур та розчинників. Клітини, які накопичують пошуканий продукт в середині, наприклад в вакуолях або пластидах, непридатні для іммобілізації. Добування продуктів метаболізму із розчину, який омиває клітини також нелегка проблема з точки зору економічності виробництва.

У випадку коли іммобілізовані клітини призначені для промислового використання, важливу роль грає вибір біореактору, в якому вони будуть культивуватись. Мабуть, більш зручною буде колон очна культура, оскільки при цьому економиться простір і полегшується контроль за потоком поживних речовин через клітину, у випадку необхідності покращується освітленість культури. Клітини деяких видів рослин, як було відзначено вище, для забезпечення рівня метаболізму, який близький до інтактного, потребує освітлення.

Іммобілізовані клітини можуть бути використані не тільки для синтезу, але і для біотрансформації різних сполук. Їх перевага в тому, що завдяки збільшенню строку функціонування клітин в іммобілізованому стані дешевшає процес біокаталізу. А.Альферман із співробітниками провели наступний дослід. Вони культивували клітини наперстянки шерстистої (*Digitalis lanata*), занурених в альгінатний гель (50 шариків діаметром 4-5 мм), в 100 мл колбах Ерленмейєра в 25 мл середовища. Середовище з субстратом міняли кожні три дні. Як субстрат додавали бета-метилдегитоксин, який трансформувався клітинами в бета-

метилдигоксин. В таких умовах культивування клітини здійснювали біотрансформацію субстрату в продукт з постійною швидкістю протягом 170 діб. Серцевий глікозид дигоксин має великий терапевтичний ефект в порівнянні з дигитоксином, якого в рослинах міститься значно більше. Дигоксин відрізняється від дигитоксину тільки по додатковій гідроксильній групі на дванадцятому атомі вуглецю. Недиференційовані культури клітин наперстянки шерстистої не утворюють серцевих глікозидів, але можуть здійснювати певні реакції біотрансформації субстратів, доданих в поживне середовище. Необхідно підкреслити *переваги, які мають іммобілізовані клітини в порівнянні з суспензійними культурами:*

- 1) багаторазове використання біомаси шляхом збереження клітин в біореакторі та виділення продуктів із середовища;
- 2) фізичне відділення клітин від середовища;
- 3) культивування великої кількості біомаси в сосудах невеликого об'єму;
- 4) довготривалість культивування;
- 5) можливість ефективної біотрансформації речовин.

Етапи робіт по створенню клітинних технологій

1. Економічно обумовлений вибір об'єкту. Рослини, вибрані для введення в культуру, повинні мати значну кількість цінних, економічно важливих вторинних сполук. Особливо це відноситься до рідкісних та зникаючих видів рослин.

2. Первинне введення тканин в культуру *in vitro*. З даною метою відбирають окремі рослини, які мають найбільший вміст пошуканої речовини. Зазвичай спочатку отримують калуси на твердому середовищі.

3. Хімічне вивчення біомаси по кількісному і якісному складу вторинних метаболітів. Проліферуючі калусні клітини рослин за рідкісним виключенням містять вторинних сполук менше, ніж органи цілої рослини. Це свідчить про те, що в інтактній рослині синтез вторинних речовин знаходиться під контролем цитодиференціювання. Пригнічення диференціації клітин в культурі призводить до зниження їх біосинтетичного потенціалу у відношенні вторинних сполук. Неповна реалізація генетичних можливостей клітини може бути пов'язана з іншими причинами, наприклад з порушенням автотрофності живлення при переході до гетеротрофного живлення. Крім того, під впливом різних факторів може змінюватись якісний склад продуктів. У деяких рослин перехід до біосинтезу речовин вторинного метаболізму настає при сповільненні росту, для них використовують двохступінчаті режими культивування: спочатку створюють умови для інтенсивного росту клітинної маси, а потім для біосинтезу речовин. Необхідно підкреслити, що визначити дуже низькі концентрації метаболітів в клітинах, які повільно ростуть дуже складно. Тому як експрес метод оцінки калусних культур останнім часом використовують радіоімунохімічний та

імуноферментний методи. Останній має переваги завдяки більш високій швидкості проведення аналізів і можливості їх автоматизації.

4. Оптимізація середовищ і параметрів вирощування. Для реалізації генетичної інформації, яка відноситься до вторинного обміну, необхідні специфічні умови. Враховуючи, що нема твердої впевненості в тому, що середовища, які використовуються повністю відповідають потребам клітин, в кожному конкретному випадку необхідно підбирати середовище і інші фактори використовуючи досвід інших дослідників. Ця робота ще більше ускладнюється при переведенні культури в рідке середовище, так як при цьому необхідно враховувати вплив факторів аерації перемішування.

5. Створення продуктивних штамів клітин. Отримання гомогенної популяції клітин з високим вмістом тих чи інших вторинних речовин – складна задача, так як для популяції довготривало культивованих клітин навіть одержані клонуванням однієї високопродуктивної клітини, вони можуть втрачати здатність до синтезу цінних сполук. Для підтримання на високому рівні здатності клітин до видоспецифічних біосинтезів, крім оптимізації умов вирощування, необхідні значні зусилля включаючи генетичні маніпуляції з ними і клітинну селекцію. Для організації рентабельного великомасштабного виробництва на основі клітинної технології потрібні мутанти, прототрофні по гормонам, невимогливі до поживних середовищ, а також стійкі до осмотичного та механічного стресу. Отримання мутантів і варіантів в культурі клітин набуває все більшого поширення. Так обробка казусних клітин рауфольфії зміїної етилен аміном дала можливість одержати клітинну лінію, яка відрізнялась високим вмістом анти аритмічного алкалоїду аймалину. Подальша оптимізація умов вирощування цієї лінії призвела до збільшення продуктивності культури аймалину в 10 раз в порівнянні з цілою рослиною. Більш ефективним прийомом створення продуктивних штамів є штучне конструювання клітин методами клітинної та генетичної інженерії, яким належить майбутнє.

6. Первинне використання кращих штамів. Первинний калус, отриманий на твердому середовищі, переводять в рідке середовище. Зміна режиму культивування не повинна призводити до втрат штамом своїх позитивних якостей, тобто штам повинен бути стійким до стресових умов культивування. Особливо це стосується моменту перенесення клітин із умов лабораторного експерименту в невеликих колбах в ферментери великих розмірів. На сучасному етапі в біотехнологічних виробництвах центральна роль належить ферментерам з автоматичною регуляцією різних факторів (температури, газового складу, освітлення кислотності, вмісту фізіологічно активних речовин) на будь-якому етапі розвитку культури.

7. Вирощування продуктивного і стійкого штаму в умовах наближених до виробничих, в ферментерах з послідовним збільшенням їх об'єму. Якщо в таких напівпромислових умовах культивовані клітини зберігають високу швидкість росту і біосинтезу пошуканої речовини, накопичують її без деградації і в значних

кількостях виділяють в середовище, то такий штам придатний для організації великомасштабного виробництва. Крім того, важливою якістю штаму є його генетична стабільність.

8. Складання технічного регламенту на виробництво біомаси та її оцінка.

Виробнича технологія вимагає відповідної апаратури, яка є безпосередньо в Японії. Так, в 20000-літровому ферментері в безперервній культурі протягом трьох місяців вирощували клітини тютюну, які продукували убіхінон з продуктивністю по біомасі 5,582 г/л в день. Там же налагоджено великомасштабне виробництво і інших вторинних метаболітів.

На сучасному етапі в різних країнах близько ста видів рослин використовуються в біосинтетичній промисловості для отримання економічно важливих речовин, серед них жень-шень, рауфольфія зміїна, наперстянка шерстиста та пурпурова, діоскорея дельтовидна, воробійник, беладонна, пасльон дольчатий, дурман звичайний, конвалія, кліщовина, агава, аммі зубна, мак снотворний та інш.

Лекція 6

Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин

План лекції

1. Ріст і обмін речовин у ізолюваних тканин.
2. Прямий та непрямий морфогенез.
3. Органогенез
4. Соматичний ембріогенез.
5. Різогенез.
6. Регенерація рослин.

Розвиток багатоклітинних організмів – одна із важливих проблем біології. У вищих рослин молекулярні клітинні функції пов'язані з контролем організму і нормами реакцій на зовнішні умови.

При вивченні онтогенезу рослин можна вибрати різні підходи.

1. Вивчення розвитку рослини, вважаючи рослину єдиною складною системою, що здатна до саморегуляції.
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 ізолювані протопласти *in vitro*.

Перевагою останнього підходу є можливість для науковця самому вибрати і контролювати умови культивування об'єктів *in vitro*, при цьому не вивчаючи процеси у відповідності з послідовно здійснюючою «життєвою програмою» рослини. Найбільш важливою при цьому є можливість використання тотипотентності рослинних клітин, яка дає можливість вивчити як клітина пере програмується і перетворюється в рослину.

Тотипотентність – це здатність рослинної клітини відтворювати при певних умовах цілий організм. Тотипотентність рослинної клітини визначається відсутністю незворотної ядерної диференціації при спеціалізації клітини і однаковою для клітин даного організму спадковою основою, яка в конкретних умовах взаємодії її з другими клітинами в системі тканини, органу і організму призводить до певного типу обміну речовин і появи певної форми.

Тотипотентність рослинної клітини особливо яскраво проявляється в культурі ізолюваних рослинних тканин і клітин. Практично всі тканини при ізолюванні їх із рослин і розміщенні в умовах хорошої аерації на штучне поживне

середовище здатні диференціювати і рости по типу калусної тканини, яка потім в культурі може вторинно диференціювати різними шляхами в залежності від умов живлення і вирощування.

Вирішальне значення в зміні функцій і форми має специфіка білкових синтезів, які створюють спектр клітини. В механізмі здійснення синтезу специфічних білків велика роль відводиться інформаційній РНК, а також регуляторному механізму, який здійснює зворотній зв'язок між конкретними умовами в клітині, зокрема між наявністю і відсутністю в ній специфічних метаболітів і синтезом білків-ферментів. Можливість такого зворотного зв'язку складає основу тотипотентності клітини.

Ріст і обмін речовин ізолюваних тканин на штучному поживному середовищі французький вчений Ліоре поділив на чотири етапи:

1) „шоку” – продовжується 24 години і характеризується різким підйомом дихання, відсутністю синтетичних процесів, поглинанням тканиною із поживного середовища води, цукрів і мінеральних солей.

2) „юності” – триває з 2 по 8 день і характеризується збільшенням темпу росту тканини, активним синтезом білку, збільшенням інтенсивності дихання більша частина енергії, якого використовується на синтетичні ростові процеси.

3) „зрілості” – триває з 9 по 20 день, характеризується сповільненням темпу росту тканини. Стабілізуються процеси синтезу білку і дихання. Підсилюється синтез речовин клітинних оболонок і ріст клітини розтягненням. Частка енергії дихання, що використовується не на синтетичні процеси і ріст, а на підтримку життєдіяльності колонії зростає.

4) „старості” – триває з 21 по 35 (40) день. Синтез білку та інтенсивність дихання знижується. Швидкість росту невелика. Енергія дихання, в основному, використовується для підтримки життєдіяльності культури. Синтез речовин клітинних оболонок проходить активно.

Тотипотентність рослинної клітини визначає перехід її із спеціалізованого стану до стану активного росту, який в відповідних умовах культури *in vitro* може підтримуватися довго. Але зміна умов викликає вторинну диференціацію клітин в культурі, яка проявляються не тільки в гістологічних змінах на тканинному рівні, а і в виникненні меристеми органів. Регенерації рослин із культури тканин можна досягти, використовуючи один із трьох методів: культуру зародків, соматичний ембріогенез та органогенез. Для проведення успішних досліджень по розмноженню рослин необхідно враховувати наступні фактори: лабораторне оснащення, склад середовища, умови культивування, технічну кваліфікацію та відбір експланту.

Диференціація клітин рослин *in vitro* може проходити різними шляхами і в різній степені – від диференціації окремої клітини до розвитку цілої рослини.

Можливі два шляхи інтерпретації процесу диференціації, які протікають в клітині на основі однієї і тієї спадкової інформації.

1. Синтез специфічних структур на всіх етапах онтогенезу клітини проходить монотонно. Різниця в диференціації виникає завдяки вторинним процесам взаємодії різних структур і різних метаболітів в клітині.

2. Між метаболізмом клітини і спадковою основою, яка визначає синтез специфічних структур, є зворотній зв'язок. Зміни в клітині викликають закономірні зміни в синтезу специфічних компонентів.

Другий підхід до диференціації клітини припускає не тільки програмування синтезу специфічних білків, але і існування зворотного зв'язку, тобто саморегулювання системи в цілому. Розрізняють наступні типи диференціювання:

- Найбільш простий вид диференціювання – поява в калусній тканині диференційованих клітин, які мають специфічні морфологічну будову і несуть певні особливі функції. Досить часто спостерігається виникнення епібластів – клітин, які депонують запасні речовини, а також вторинні метаболіти.

- Гістологічна диференціація калусних тканин (гістогенез) – це утворення в калусі різноманітних тканин. В калусній тканині може проходити утворення волокон, трихом; сюди ж можна віднести утворення елементів судинної системи – трахеї і трахеїди ксилеми, ситовидні трубки і клітини - супутники флоєми.

- Органогенез (монополярні структури) – це диференціація калусних тканин в цілі органи б перетворення їх в апекси стебел або коренів, флор альні елементи.

- Соматичний ембріогенез (біполярні структури) – це утворення в калусній або суспензійній культурі ембріодів, тобто зачатків інтактною рослини, яка здатна розвинути у дорослу рослину.

Диференціація тотипотентних клітин популяції *in vitro* залежить від наступних факторів:

1. Від виду рослини і генотипу рослини-донора.
2. від органу рослини і характеристик клітин експланту даного органу.
3. Від умов культивування: різноманітних поживних середовищ, екзогенних гормональних факторів, стимуляторів.
4. Від фізичних факторів культивування: фотоперіоду, якості і інтенсивності освітлення, температурного режиму, рН, аерації.

Одним із найменш вивчених аспектів диференціювання є **морфогенез**. Складність досліджень фізіологічних, біохімічних та молекулярних процесів, які лежать в основі морфогенезу, заключаються в тому, диференціація клітин в органи проходить асинхронно, клітини, що диференціюються та осередки диференціації розрізнені в просторі. В процесі диференціювання у культивованих неорганізованих калусних тканинах формуються морфологічні структури, які призводять до утворення в них бруньок, коріння, стебел, квітів, цілих рослин.

Розрізняють два типи морфогенезу:

1) **прямий**, при якому утворення морфологічних частин проходить безпосередньо на експланті;

2) **непрямий** – на експланті спочатку утворюється калусна тканина, а потім на ній проходить утворення морфологічних частин із, яких в подальшому утворюється рослина-регенерант. Утворення морфологічних частин на експланті та калусі обумовлене певним співвідношенням ауксинів та цитокінінів.

В культурі калусних тканин розрізняють два типи морфогенезу: соматичний ембріогенез та органогенез, який підрозділяється на стебловий, кореневий, флоральний (квітковий) або листовий.

При індукуванні органогенезу в культурах тканин розрізняють дві фази цього процесу:

Перша фаза – дедиференціації, під час якої проходить перетворення спеціалізованої клітини в калусну. Необхідною умовою для дедиференціації є поміщення ізолюваної тканини рослини на агаризоване або рідке середовище, яке містить елементи живлення та гормональні фактори. Успіх в одержанні калусної тканини, в основному, залежить від підбору концентрацій та співвідношень гормональних індукторів росту та іноді деяких складних сполук.

Друга фаза – диференціації, при якій в тканинах проходить формування зачатків органів. Як моделі для досліджень фізіологічних, біохімічних та цитологічних аспектів морфогенезу найчастіше використовують дводольні рослини. Дослідження по індукції органогенезу однодольних викликано перш за все за просами генетиків, зацікавлених в використанні методів культури тканин і генетичної інженерії для отримання нових форм найбільш важливих для сільського господарства культур. Здатність до органогенезу зменшується у тканин, ізолюваних по напрямленню від верхівки до основи стебла. Тенденція до органогенезу знижується також при багаторазових пересадках калусних тканин, причому здатність до коренеутворення зберігається більш довгий час. Рослини-регенеранти, одержані із багаторазово пересаджуваних тканин зазвичай слабкі. Причиною втрати здатності до морфогенезу можуть бути фізіологічні або генетичні зміни в клітинах. При довготривалому культивуванні змінюється число хромосом, що призводить до еуплоїдії та анеуплоїдії, виникають різні хромосомні порушення. Зміни фізіології клітини, які призводять до втрати її морфогенетичного потенціалу, можуть складати і в тому, що під час багаторазових пересадок втрачаються деякі ендогенні фактори.

Соматичний або нестатевий ембріогенез.

Соматичний ембріогенез з точки зору біотехнології має багато переваг перед органогенезом. Регенерант на основі соматичного зародку повністю сформований, тоді як пагони, отримані в результаті органогенезу, необхідно укорінювати, а лишні затрати праці не економічні для біотехнології. Незамінним соматичний ембріогенез є і для фундаментальних досліджень. Фундаментальні

проблеми, пов'язані з морфогенезом, краще вивчати в суспензіях, з якими найчастіше пов'язане культивування соматичних ембріодів.

При ембріогенезі соматичні клітини вищих рослин повинні пройти перепрограмування і перетворитись в клітини, детерміновані до утворення біполярних органів. *Перепрограмування* – це процес при якому під впливом ряду сигналів детерміновані клітини перетворюються в здатні до розвитку ембріональні структури. Всі ці структури виникають *de novo* із окремої або декількох клітин, а не із існуючих *in situ* ініціалей.

Соматичний або нестатевий ембріогенез являє собою процес формування зародкових структур із соматичних клітин. **Соматичний зародок** – це незалежна двохполюсна структура, яка фізично не прикріплена до тканини із якої походить. Такі зародки в подальшому можуть розвиватися і проростати в регенеранти через стадії, які відповідні тим, що зустрічаються при розвитку зиготи.

Утворення соматичних зародків із культури клітин, тканин і органів може проходити прямим або непрямим шляхом. **Прямий** соматичний ембріогенез заключається у формуванні вегетативного зародку із однієї або декількох клітин тканини експланту без стадії утворення проміжного калуса. Таке явище спостерігається у цитрусових, де тканини нуцелуса дають початок нуцелярним зародкам (як *in vivo*, так і *in vitro*), а також в інших випадках, коли культивовані незрілі зародки починають відпочковуватися. **Непрямий** ембріогенез складається із декількох етапів: поміщення експланту в культуру, послідовна стимуляція калуса і формування передзародків (зазвичай на середовищі, яке містить високі концентрації ауксинів) і перенесення калусу на поживне середовище без факторів росту, для того щоб індукувати формування біполярних зародків із передзародків. При певних умовах ці зародки проростають і утворюють рослини-регенеранти. Зазвичай в утворенні калуса приймає участь лише невелике число клітин експланту. Ці клітини знаходяться, як правило, в поверхневих шарах калуса або знаходяться в фізичному контакті з поживним середовищем. У випадку коли калус переносять на середовище з низьким вмістом ауксину, проходить процес подальшого ембріогенезу, при якому утворюється велике число перед зародків,

Органогенез.

Формування придаткових пагонів *in vitro* проходить частіше і краще піддається контролю чим розвиток соматичних зародків із експлантів, що культивуються. Одержання рослин через органогенез можна здійснити трьома шляхами:

- 1) шляхом формування придаткових органів на калусі, одержаному із експланту;
- 2) шляхом формування придаткових органів безпосередньо із експланту без проміжної фази калусоутворення;

3) шляхом формування рослин-регенерантів із пагонів, які утворились із пазушних пагонів.

Розглянемо кожний шлях органогенезу окремо.

Утворення пагонів калусами.

Для утворення калусу, який може диференціюватись з утворенням пагонів і потім регенерантів, використовують різні експланти. У трав'янистих рослин експланти можна отримати із стебел, листків, черешків листків та пелюстків квітів. Для отримання морфогенного калусу із багаторічних рослин часто необхідно брати органи в яких клітини мітотично активні, наприклад верхівки пагонів або виділені із них ділянки меристемної тканини. Як і в ембріогенному калусі, в даному випадку лише невеликий процент експлантів в результаті клітинного ділення утворює органогенний калус. Високі концентрації ауксинів і низькі – цитокінінів викликають калусоутворення. Формування калусу на агаризованому середовищі можна також індукувати, додаючи тільки ауксини, наприклад 2,4 Д. Для органогенного калусу достатньо характерна поява меристематичних активних клітин або груп клітин. Ці клітини являють собою попередників коренів та пагонів. Плоїдність клітин може значно варіювати. Після утворення калусу, що зазвичай потребує від 4 до 16 тижнів, його можна розділити і розмножити на тому ж середовищі. Органогенез стимулюється зміною співвідношення концентрацій цитокінінів і ауксинів, необхідних для формування калусу. Зміна концентрацій регуляторів росту в середовищі супроводжується появою і ростом пагонів.

Регенерація рослин безпосередньо із культивуємих експлантів.

Даний метод регенерації рослин особливо придатний для трав'янистих рослин при використанні листків, цибулин, клубнів, кореневищ, стебел, бульбодів. Експлант поміщають на поживне середовище, яке містить невелику кількість ауксинів та цитокінінів (щоб уникнути формуванню калусу), після чого із нього утворюються пагони. Розмноження здійснюється шляхом розщеплення пучка пагонів і висадження окремих пагонів в посудину. Цей метод неможна використовувати для клонування неоднорідних (хімерних) рослин, оскільки рослини-нащадки, які утворюються, будуть або повністю змінені або повністю втратять неоднорідність.

Посилення утворення пазушних пагонів in vitro.

Всі рослини ростуть завдяки активності їх верхівкових меристем. Апікальна меристема тканини являє собою клітини, які активно діляться, утворюючи тканину куполу, який розміщений на самій верхівці пагону і має зазвичай діаметр 0,1 мм та приблизно 0,25-0,3 мм в довжину. Тотипотентність, яка властива верхівковій меристемі тканини та ділянкам тканини пагону, що знаходяться поруч є основою для промислового клонального розмноження багатьох видів рослин. Меристемні тканини, що культивуються можуть регенерувати рослини через

розвиток пагонів із пазушних бруньок. Рослини, одержані таким чином, часто зберігають генотип материнської рослини. Пазушні бруньки можуть також розвиватись із культивуємих верхівок та сегментів вузла. Експлант поміщають на середовище, яке містить ауксини та цитокініни в низьких концентраціях, для стимулювання росту і утворення пагонів із пазушних бруньок та запобіганню формування калусу. Як правило, цитокініни додаються до поживного середовища, щоб подолати апікальне домінування при формуванні пагонів полегшити розгалуження із бокових бруньок, розмішених в пазухах листків. Додатково пагони відсаджують на теж саме поживне середовище для подальшого утворення пагонів із пазушних бруньок. Даний процес можна продовжувати і отримувати з його допомогою велику кількість рослин-регенерантів.

Розмір експланту визначає ступінь виживання; більш великий експлант верхівки пагону завжди виживає краще ніж меристемні тканини в культурі *in vitro*. Бруньки і вузли стебла, відібрані із активно ростучих ділянок, зазвичай в культурі ростуть краще, чим експланти, виділені із основи стебла. Пора року при відборі експланту також часто має вирішальне значення, особливо для багаторічних рослин. Розмноження пазушними пагонами являє собою самий повільний метод розмноження рослин.

Різогенез це –це утворення кореневої системи у рослин-регенерантів, який можна стимулювати декількома шляхами:

- 1). культивуючи пагони або рослини-регенеранти на середовищі з невеликою кількістю ауксинів (ІМК, ІОК в концентрації 0,3-1 мг/л);
- 2). розводячи мінеральний склад солей поживного середовища в 2 рази і видаляючи регулятори росту;
- 3).Обертаючи нижню частину пробірки фольгою або додаючи в поживне середовище активоване вугілля, враховуючи те, що утворення коренів подавляється високою інтенсивністю світла;
- 4). Поміщаючи проростки в нестерильний ґрунт і умови високої вологості.
- 5). Обробляючи пагони синтетичним ауксином.

Регенерація рослин – це відновлення втрачених або пошкоджених органів і тканин, цілого організму, з його частини. Різні форми регенерації використовуються рослинами як спосіб вегетативного розмноження. Розрізняють наступні типи регенерації:

- фізіологічну, яка передбачає відновлення органів після їх природного зношування.
- травматичну, яка здійснюється внаслідок де диференціювання тканин поверхні ран.
- меристемну, що пов'язана з апікальними та інтеркалярними меристемами.

Формотворення рослин складається з процесів закладання і розвитку клітин, тканин, органів. Ці процеси генетично обумовлені і характеризуються причинно-наслідковими зв'язками.

ЛЕКЦІЯ 7.

Ембріокультура та технологія гаплоїдів

План лекції:

1. Ембріокультура: постгамна та прогамна несумісність.
2. Одержання гаплоїдів : андрогенез, гіногенез, партеногенез.
3. Використання ембріокультури та гаплоїдії в сучасній селекції.

Ембріокультура (культура зародків). Це вирощування зародків на штучному поживному середовищі. **Всі дослідження по культурі зародків *in vitro* необхідно розділити на дві групи: 1** – вирощування зрілих, в основному, сформованих зародків, що легко здійснюється при збереженні стерильності на поживному середовищі порівняно простого складу;

2 – вирощування зародків на ранніх етапах їх ембріонального розвитку, який є одним із підходів, що дають можливість експериментально вивчати тимчасову, послідовну реалізацію генетичної інформації, дію генів в ранній період індивідуального розвитку організму.

Успішне культивування незрілих ізольованих зародків залежить від наступних факторів:

- стадії розвитку зародку;
- ступеню диференціації зародків в момент ізоляції.

Використання ембріокультури є майже незамінним методом подолання постгамної та прогамної несумісності.

Фізіологічна несумісність партнерів при віддаленому схрещуванні, яка проявляється на етапі до запліднення (прогамна несумісність), може залежати від багатьох причин:

- генетично детермінованої невідповідності або відсутності секрету рильця пестика, материнської рослини і пилку батьківської, що призводить до сповільнення росту пилкових трубок ще рильці пестика;
- відмінності партнерів по довжині стовпчика пестика і пилкової трубки;
- блокування росту трубки на різних етапах її шляху від рильця пестика до мікропилесім'япочки внаслідок тканинної несумісності партнерів (гаметофітний шлях несумісності).

Способом подолання прогамної несумісності партнерів є запліднення *in vitro*, або плацентарне запліднення.

Подолання прогамної несумісності проводиться в тому випадку, коли неможливо здійснити запліднення між вибраними парами в природних умовах. Це викликано декількома причинами:

- 1) фізіологічними (невідповідність в часі дозрівання пилку);

2) морфологічні (коротка пилкова трубка або блокування її росту на різних етапах розвитку).

Запліднення in vitro можна здійснити двома шляхами:

1) культивування на поживному середовищі зав'язі з нанесеним на неї готовим пилом ;

2) зав'язь відкривають і на поживне середовище переносять шматочки плаценти із незаплідненими насіннєвими зачатками, поблизу яких культивується готовий пилок.

Такий тип запилення добре розроблений для рослин родини пасльонових, макових, гвоздичних.

Несумісність таксономічно віддалених партнерів проявляється і на інших етапах отримання гібридів, вона може бути фізіологічною або генетичною по природі. Невідповідність партнерів в даному випадку спостерігається уже після запліднення, тому таку несумісність називають постгамною.

Подолання постгамної несумісності. Виникає вона при віддаленій гібридизації після запліднення. Часто при цьому утворюється насіння яке не має схожості. Причиною може бути не співпадання по часу розвитку зародка та ендосперма. Зиготичні зародки ізолюють із насіння або насіннєвого зачатку і поміщають в стерильні умови, що замінюють ендосперм (тобто поживне середовище). Послідуючий розвиток і проростання зародку проходить так само, як це було б в насінні. Період ембріонального розвитку організму відрізняється високою активністю процесів клітинного ділення і диференціації. На самих ранніх етапах ембріогенезу проходить активне ділення зиготи без диференціації. На послідуючих етапах подальшого ділення заплідненої яйцеклітини починається диференціація. Клітини набувають здатності виконувати відповідну функцію. В результаті подальшої диференціації виникає багато різних по структурі і функції клітин, формується складний організм. Це супроводжується виникненням складної системи регуляторних механізмів клітини, виникненням корелятивних зв'язків між ними. Виходячи із тотожності генетичної інформації, яка представлена в різних типах клітин одного і того ж організму, можна стверджувати, що в основі складного процесу клітинної диференціації, формоутворення, морфогенезу, виникненні корелятивних зв'язків лежить зміна і регуляція активності генів, репресія і дерепресія різних ділянок, послідовностей ДНК. Використовується для отримання віддалених гібридів зернових, злакових культур та овочевих.

Технологія гаплоїдії.

Цікавість до отримання гаплоїдів визначається великими можливостями, які вони відкривають для технологій на основі клітин рослин, особливо орієнтованих на селекційний процес. Гаплоїдні рослини і клітини дозволяють легко знайти рецесивні мутації, редкие рекомбінації, експресію введеного зовні генетичного матеріалу. Гаплоїди можуть виникати спонтанно як результат апоміксису або партеногенезу. Обробка рослин іонізуючим опроміненням, хімічними

речовинами, використання температурних шоків, запилення опроміненим пилком, відділена гібридизація примінілись для того, щоб посилити процес, але не дивлячись на це вихід спонтанних гаплоїдів залишався низьким.

Гаплоїдні рослини стерильні, проте можливо штучним шляхом подвоїти набір їх хромосом з допомогою колхіцину і отримати диплоїдні гомозиготні рослини. Гаплоїди можуть виникати спонтанно, але частота їх виникнення дуже мала. Штучним шляхом з використанням методів *in vitro* вдається одержати велику кількість гаплоїдних рослин. Існує три способи одержання гаплоїдів з використанням методу культури ізолюваних тканин:

-андрогагенез – одержання гаплоїдних рослин на штучному поживному середовищі із ізолюваних пиляків ті мікроспор;

- **гіногагенез** – одержання гаплоїдних рослин на штучному поживному середовищі із ізолюваних насіннєвих зачатків, незапліднених зав'язей, зародкових мішків;

- **партеногагенез** – одержання гаплоїдів із гібридного зародку, у якого із-за несумісності хромосом батьки втратили батьківські хромосоми.

Метод андрогагенезу.

Створення гаплоїдів методом андрогагенезу значно прискорює (в 2-3-рази) одержання гаплоїдів в порівнянні з методом інбридингу. На процес андрогагенезу впливає багато факторів – це умови вирощування, вік рослини-донора, місцезнаходження квіткобруньки на рослині, час, який пройшов з моменту зацвітання, склад поживного середовища, наявність стимуляторів росту.. Андрогагенез може бути прямим та непрямим. **Прямий андрогагенез** – це процес утворення гаплоїдних рослин-регенерантів завдяки пилковому ембріогенезу; тобто із ембріоїдів, які формуються шляхом поділу мікроспор.

Непрямий андрогагенез проходить в два етапи:

- 1) проходить дедиференціація мікроспор в результаті якої утворюється калусна тканина;
- 2) регенерація рослин із калусних тканин. Проте необхідно пам'ятати, що не всі рослини, які регенерували із калусів є гаплоїдними, тому для масового отримання гаплоїдів необхідно індукувати пилковий ембріогенез.

В клітинах пиляків можуть проходити наступні процеси:

- 1) ембріогенез;
- 2) дедиференціація і калусогенез;
- 3) Виникають структури кулевидної форми із яких в подальшому рослини-регенеранти не регенерують;
- 4) продовження мікро спорогенезу та та гаметогенезу;
- 5) деградація мікроспор.

Андрогенез в умовах *in vitro* проходить 4 шляхами:

1). Мікроспора ділиться на дві ідентичні дочірні клітини, які здатні до спорофітного розвитку. В даному випадку не проходить формування вегетативних та генеративних клітин.

2). Мікроспора в результаті нерівномірного поділу утворює вегетативну і генеративну клітини. Спорофіти виникають в результаті подальшого розвитку вегетативної клітини, а генеративна клітина деградує.

3). Ембріоїди формуються тільки із генеративної клітини. В таких випадках вегетативна клітина або зовсім не ділиться або ділиться до певного рівня.

4). В результаті поділу одноядерної мікроспори утворюються вегетативна і генеративна клітини, які в подальшому діляться і приймають участь в розвитку спорофіту. Потім можливе безпосереднє формування ембріоїдів або утворення спорофітів шляхом регенерації із калусу.

Широкому використанню техніки отримання гаплоїдів в культурі пиляків заважає низька ефективність, яку можна розрахувати як:

1) процент ізольованих пиляків, що утворили в культурі ембріоїди або калус із мікроспор;

2) процент гаплоїдних рослин-регенерантів в розрахунку на ізольованих пиляк.

Методом культури пиляків в різних країнах створені високоврожайні і стійкі сорти рису та пшениці.

Отримання рослин гіногенетичного походження може бути корисним для селекціонерів. Ці рослини вільні від деяких вірусів, альбінізму, і небажаних генів, які передаються по чоловічій лінії. Останнім часом велика увага приділяється **гіногенезу**, при якому як експлант використовують насіннєві зачатки, незапліднених зав'язей, зародкові мішки.

Гіногенез має ряд переваг перед андрогенезом:

1) отримання гаплоїдів у чоловічостерильних рослин;

2) жіночий гамет офіт є джерелом гаплоїдів у тих рослин, у яких андрогенний калус має низький морфогенетичний потенціал;

3) зародковий мішок на відміну від мікроспор здатний до індукції спорофіту на всіх стадіях розвитку.

В певних умовах в клітинах зародкового мішка може бути порушений генетично запрограмований цикл розвитку. В даному випадку початок новому організму, крім яйцеклітини, можуть дати і другі елементи зародкового мішка (синергіди та антиподи). При цьому утворюються апоміктичні зародки, які успадковують ознаки тільки материнського організму. Культура незапліднених зав'язей та насіннєвих зачатків дає можливість отримувати гіногенетичні гаплоїди (дигаплоїди).

Партеногенез. Ембріоїди, які утворюються в результаті елімінації хромосом батьківського генотипу культивують на поживних середовищах і одержують гаплоїдні рослини. Сорту ячменю Істок та Одеський 15 були одержані комбінацією партеногенетичного методу з культурою ізольованих зародків за 4 роки замість звичайних 10-12 років.

Оскільки гаплоїди стерильні, для отримання фертильних рослин гаплоїди необхідно перевести на диплоїдний рівень. Дигаплоїд, отриманий із гаплоїдного організму являється абсолютно гомозиготним. Гаплоїди дуже цінні для мутаційної селекції тому, що на гаплоїдному рівні полегшуються ідентифікація генетичних змін.

Продовжується розробка технології одержання гаплоїдів шляхом культури пиляків пшениці, ячменю, кукурудзи, озимого жита, картоплі.

Гаплоїди, одержані в культурі *in vitro*, можуть бути використані не тільки в практичній селекції, але і в роботах по генетичній інженерії, а також клітинній селекції.

Лекція 8.

Клітинна селекція рослин.

План.

1. Об'єкти для клітинної селекції.
2. Методи відбору в клітинній селекції.
3. Соматональна мінливість та причини її виникнення.
4. Одержання рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів.
5. Використання клітинної селекції в селекційному процесі.

Одним із важливих напрямків в біотехнології рослин є клітинна селекція при якій добір клітинних ліній і рослин з новими спадковими ознаками відбувається на рівні культивованих *in vitro* клітин. Основним завданням досліджень по клітинній селекції є одержання за допомогою сучасних методів молекулярної і клітинної біології широкого спектру мутацій у рослин, відбір із них найбільш цінних і після фізіолого-генетичного вивчення, використання їх в селекційній роботі по створенню нових сортів. Одержання рослин із відібраних в селективних умовах мутантних клітин можливе завдяки унікальній властивості рослинної клітини - тотипотентності.

Перші мутанти були отримані в середині 70-х років при використанні простих прийомів селекції на рівні калусних тканин.

Більшість робіт в даній області досліджень проведено в 80-ті роки. Перелік мутантів з важливими сільськогосподарськими ознаками досить великий. До них відносяться мутанти стійкості до стресових факторів, гербіцидів, різних захворювань, зверх продуцентів незамінних амінокислот. Потужним джерелом генетичної різноманітності рослин є соматональна мінливість, що виникає при проходженні рослинами стадії неорганізованого росту, яка дозволяє проводити ненаправлену селекцію *in vitro*.

Не дивлячись на великі перспективи цілеспрямованого покращення ряду ознак рослин *in vitro*, технологія клітинної селекції все ж залишається хоч і важливим, але лише доповненням до традиційних методів селекції.

Клітинна селекція вивчає теоретичні та практичні аспекти виникнення генотипової і фенотипової мінливості клітин та методи відбору клітин з новими цінними властивостями. При модифікуванні складу поживних середовищ можна цілеспрямовано впливати на репродукцію клітин із заданим числом хромосом в ядрі.

Теоретичною базою клітинної селекції є положення про тотипотентність культивованої рослинної клітини. Рослинна клітина переведена в умови культури зберігає всю основну генетичну інформацію про цілий організм і при наявності відповідних умов може її реалізувати. Генетичні зміни, в першу чергу мутації, які

при цьому виникають, після регенерації можуть проявитись у вигляді нових ознак у створених рослин, що дає можливість методом культури клітин одержувати нові селекційно перспективні форми с.г. культур.

Дослідження мутагенного ефекту іонізуючого опромінення з селекційною метою, які були розпочаті Делоне (1928-1930pp), а також хімічних мутагенів (Рапопорт 1943-56pp) сприяли становленню цілого напрямку в області експериментального мутагенезу – мутаційної селекції рослин. Успіхи, досягнуті в культивуванні *in vitro* рослинних клітин дали можливість використовувати їх в селекції нових форм рослин.

При розробці ефективних клітинних технологій гостро стоять наступні питання:

1. Одержання великої кількості клітинних штамів рослин для селекційної роботи;
2. Розробка технологій направленого впливу на генетичну мінливість клітин, що формують ці штами;
3. Розробка технологій по регенерації із них великої кількості життєздатних фертильних рослин.

Основними перевагами використання клітинних культур є:

- можливість маніпуляції з мільйонами клітин, як мутабельними одиницями;
- проведення направленої селекції в чашці Петрі та регенерація рослин із мутантних клітин.

Як об'єкт для мутагенезу можуть бути використані:

- калусні тканини;
- суспензійні культури;
- ізольовані протопласти;
- іноді пилок та насіння.

Вибір об'єкту залежить від наявності розроблених технологій стосовно до різних видів рослин, а також від кінцевої мети досліджень.

Калусна тканина є легко доступним матеріалом, який часто використовується для селекції мутантів стійкості. Застосовують свіжовиділену або пересаджену калусну тканину, яка не втратила здатності до регенерації. Однак при роботі з калусними культурами відмічаються деякі **недоліки**:

- повільний ріст калусних тканин;
- нерівноцінний для всіх клітин ефект мутагенів, а також токсичних речовин, що використовуються як селективні агенти;

- одночасно із стійкими, можливе виживання чутливих клітин, які знаходяться в безпосередньому контакті з мутантними. В зв'язку з цим не виключено виділення химерних клітинних ліній.

Суспензійна культура. Отримують її із калусної тканини, ресуспендуючи калуси протягом декількох пасажів в рідкому середовищі. Використовують для одержання клітинних ліній стійких до антибіотиків, амінокислот та їх аналогів, солей важких металів.

Ізольовані протопласти. Відкривають широкі можливості для клітинної селекції спонтанних та індукованих мутантів. Виділення великих однорідних популяцій, гаплоїдних і диплоїдних мезофільних протопластів, які активно діляться дозволило провести кількісні дослідження мутагенезу соматичних клітин, а також проаналізувати експресію індукованих фенотипових змін на клітинному та організмічному рівні та їх трансмісію в потомстві.

При вивченні мутагенезу на культивованих рослинних клітинах, як фенотипів маркер використовують стійкість до токсичних концентрацій амінокислот та їх аналогів, антибіотиків, основ нуклеїнових кислот. Процедура виділення мутантів через культуру клітин характеризується селекцією певних фенотипових варіантів на клітинному рівні, регенерацією з них рослин та експресією змін в потомстві.

Для відбору різних мутантів використовують наступні прийоми:

1). Пряма (позитивна) селекція, при якій виживає лише певний пошуковий мутантний тип клітин;

2). Непряма (негативна) селекція, яка оснований на вибірковій загибелі клітин, що діляться нестійко, але потребує додаткової ідентифікації у них мутаційних змін;

3). Тотальна селекція, при якій індивідуально тестуються всі клітинні клони, що утворилися;

4). Візуальна селекція та неселективний відбір, коли варіантна лінія може бути ідентифікована серед всієї популяції клітин візуально або при використанні біохімічних методів (тонкошарова або рідинна хроматографія, радіо імуний аналіз, мікроспектрофотометрія).

Пряма селекція найбільш поширений метод і використовується в основному для виділення мутантів стійкості до гербіцидів, антибіотиків, токсинів.

Схема прямої селекції

- обробка клітин мутагеном;
- культивування клітин в неселективних умовах (3-5-клітинних поділів);
- культивування клітин на селективних середовищах (відбір клітинних варіантів);

- культивування колоній на регенераційних середовищах (можлива повторна перевірка варіантних клонів на стійкість);
- регенерація рослин і їх розмноження (проведення тестів на стійкість, біохімічні дослідження);
- висадка рослин в ґрунт (тестування на стійкість насіння, вивчення генетичної природи стійкості).

Метод непрямой селекції ефективний при відборі умовно летальних мутантів (ауксотрофних та температурочутливих);

Тотальна селекція використовується для виділення мутантів, дефектних за потребою живлення;

Візуальна селекція застосовується для відбору хлорофілдефектних мутантів, стійких до стрептоміцину та деяких гербіцидів. Для селекції цих мутантів використовують такі концентрації цих речовин, які на середовищах, індукуючи позеленіння, не пригнічували ріст тканин, а призводили до їх знебарвлення. Мутанти стійкості мають зелене забарвлення.

При неселективному відборі нових варіантів можуть бути використані біохімічні підходи (тонкошарова і рідинна хроматографія, радіоімунний аналіз, мікроспектрофотометрія).

Завдяки тотипотентності рослинної клітини можна прослідкувати експресію індукованих *in vitro* фенотипових змін у рослин-регенерантів, довести генетичну природу мінливості та детально вивчити її шляхом гібридизаційного аналізу. Мутаційна природа фенотипових змін підтверджується при статевому схрещуванні регенерантів з вихідними рослинами і може бути пов'язана з ядерними або цитоплазматичними детермінантами.

Процес культивування клітин і тканин на штучних поживних середовищах супроводжується різними аномаліями мітозу, що призводить до виникнення значної генетичної різноманітності в популяціях клітин калусних тканин. **Різні типи морфогенезу** – соматичний ембріогенез та органогенез – також можуть по-різному впливають на генетичні зміни і відповідно на фенотип рослин. Фенотипові і генетичні зміни виявляються також, серед рослин, отриманих із ізолюваних протопластів. Варіабельність хромосомних чисел рослин, які пройшли стадію неорганізованого росту, в тій чи іншій мірі відображають таку в культивованих *in vitro* клітинах. Подальші дослідження підтвердили, що проходження клітинами стадії неорганізованого росту *in vitro* сприяє виникненню нових форм рослин – **сомаклональних варіантів**, які відрізняються від вихідних рослин за фенотиповими та генотиповими ознаками.

Основними причинами виникнення соматиклональних варіантів є:

- генетична гетерогенність соматичних клітин вихідного експланту;
- генетична та епігенетична мінливість, яка індукується умовами культивування *in vitro*.

При цьому частота утворення соматоклональних варіантів характеризується залежністю від генотипу і вихідного експланту.

Багато чисельні цитологічні дослідження свідчать, що варіабельність, яка індукується умовами культивування *in vitro*, пов'язана з генетичними змінами.

Регенеранти рослин, одержані із соматичних клітин і які мають певні відміни від вихідних форм називають соматклони.

Природа і механізми виникнення соматоклональної мінливості:

- 1) природна генетична різноманітність клітин рослин;
- 2) мінливість геному в процесі культивування *in vitro*, яку П.Ларкін та В.Скофкрофт підрозділяють на такі категорії:
 - грубі каріологічні зміни;
 - кріптичні невидимі при цитологічному аналізі, хромосомні перебудови;
 - пересування мобільних генетичних елементів;
 - ампліфікація та редукція генів;
 - соматичний кросинговер та обмін сестринськими хроматидами;
 - кріптична елімінація вірусів.
- 3) мінливість цитоплазми (перебудова мітохондріону).

Крім соматоклональної варіабельності, пов'язаної із спадковою перебудовою геному, відмічені нововиявлені фенотипові зміни, що позначаються, як епігенетичні і які можуть стабільно передаватись дочірнім клітинам, але не проявляться в регенерованих рослинах або в їх статевому потомстві.

Здатність до калусоутворення, регенерації рослин, а також безпосередньо ступінь різноманітності серед сома клонів можуть в значній мірі залежати від:

- 1) генотипу рослини та вихідного експланту (його природи і стадії розвитку);
- 2) умов культивування і регенерації рослин (довготривалість культивування, співвідношення регуляторів росту, які регулюють клітинний та тканинний гомеостаз).

Перспективними є дослідження соматоклональної мінливості за наступними напрямками:

1). Направлена селекція соматоклонів (в залежності від потреб селекційної роботи дає можливість проводити направлений відбір варіантів, проте необхідне подальше вивчення кореляції між стійкістю на клітинному рівні та експресією цих ознак на рівні рослин;

2).Індукований мутагенез *in vitro* (може значно розширити спектр соматоклональної мінливості і відповідно інтенсифікувати дослідження направленої селекції *in vitro*;

3). Трансформація та перенесення окремих генів (генетична інженерія рослин шляхом перенесення окремих клонованих генів – найбільш ефективний шлях направленої зміни генотипу рослин).

Завдяки клітинній селекції були отримані рослини стійкі до лікарських препаратів, амінокислот та їх аналогів, гербіцидів, стресових факторів (засолення, важкі метали, посуха, екстремальні температури, радіаційний стрес), хвороб.

Одержання рослин-регенерантів, стійких до біотичних та абіотичних факторів:

- посуха (поліетиленгліколь, 99-880мМ маннітол);
- засолення (хлоридне та сульфатне);
- важкі метали (цинк, кадмій, мідь, ртуть, алюміній, кадмій);
- екстремальні температури;
- хвороби (патотоксини, культуральні фільтрати, патогени);
- іонізуюче опромінення.

Стійкість до лікарських препаратів. В основі лежить специфічна дія антибіотика на рослинну клітину, яка фенотипові виражається в знебарвленні фото синтезуючих (зелених) тканин або в пригніченні росту тканин, які культивуються *in vitro*. Стійкі лінії відбирають на відповідних середовищах по їх здатності синтезувати або рости в умовах селективного тиску антибіотиків. Отримані канаміцин -, стрептоміцин-, спектиноміцинстійкі лінії.

Антибіотикостійкі мутанти відіграли важливу роль в генетичних дослідженнях цитоплазматичних органел та їх генів. Вони широко використовуються як маркери в експериментах по переносу пластид і отриманню, а також вивченню цитоплазматичних гібридів, в дослідях по одержанню соматичних гібридів та цибридів.

Стійкість до амінокислот та їх аналогів. Культивування клітин проводять на середовищах, які містять амінокислоти та їх аналоги. **Механізми**, які обумовлюють стійкість до амінокислот та їх аналогів:

- послаблення зворотнього контролю біосинтезу амінокислот, яке відповідно призводить до їх надсинтезу. Надсинтез природніх амінокислот знешкоджує токсичний ефект антиметаболіту;

- зменшення проникності аналогу в клітини;
- розпад аналогу в процесі метаболізму в нетоксичні з'єднання;
- порушення можливості включення аналогу в білки.

Отримані мутанти стійкі до лізину, треоніну, валіну, триптофану, метіоніну та їх аналогів. Такі біохімічні мутанти застосовують для вирішення ряду фундаментальних питань біології рослин. Селекція на стійкість до амінокислот

може бути використана для безпосереднього відбору форм рослин стійких до певних захворювань, стресових факторів. Наявність таких мутантів буде сприяти поглибленому вивченню механізмів стійкості рослин до несприятливих факторів зовнішнього середовища і виділенню більш досконалих сортів.

Стійкість до гербіцидів. Завдяки внесенню в поживні середовища гербіцидів були отримані мутанти стійкості до гербіцидів групи карбаматів, до гліфосату, піклораму, амітролу, тразину, сульфонілсечовини, раундапу, фосфінотрицину.

В природних умовах вищі рослини зазнають багато чисельних стресів. Стресовим може бути будь-який зовнішній фактор, який викликає у рослини хімічні та фізичні зміни, що впливають на нормальний ріст і розвиток, призводять до зниження якості і стійкості с.г. культур. Особливо актуальними є дослідження направлені на вивчення експресії генів при зовнішньому стресі, стрес-індукуючих білків та генів, які їх кодують, що дає можливість конструювати рослини стійкі до умов зовнішнього середовища. Для селекції *in vitro* **солестійких** рослин використовують пряму селекцію з застосуванням калусних або суспензійних культур. Таким же шляхом відібрані лінії стійкі до **важких металів**.

Стрес, викликаний посухою призводить до пошкодження рослин, що обумовлюється інактивацією ферментів, порушенням біохімічних шляхів, накопиченням токсичних речовин, дефіцитом живлення. Для робіт по клітинній селекції рослин на посухостійкість важливим моментом є наявність клітинних механізмів осморегуляції. З метою імітації *in vitro* стресового ефекту посухи, застосовують поживні середовища, які доповнені осмотичноактивними речовинами котрі знижують зовнішній водний потенціал. Такою речовиною є полі етиленгліколь.

Причиною стресового фактору у рослин можуть бути відносно високі та низькі температури. Холодовий стрес може бути викликаний температурами від 0° до +10°-15° С. Такого стресу найбільш зазнають рослини тропічних і субтропічних зон.

Досягнення і перспективи клітинної селекції у створенні нових сортів сільськогосподарських рослин.

При розробці ефективних клітинних технологій гостро стоїть питання:

- 1) одержання для селекційних цілей пшениці та інш. с-г. культур великого числа штамів клітин цих рослин;
- 2) розробка технологій направлено впливу на генетичну мінливість клітин, що формують ці штами;
- 3) технологій по надійній регенерації із них великої кількості життєздатних фертильних рослин;

4) розробка методів відбору із соматклонів рослин із цінними генетично закріпленими ознаками і передача їх для подальшої селекційної роботи.

Клітинні технології в селекції пшениці.

1) одержання калусної культури соматичних клітин і тканин при використанні твердих агаризованих середовищ.

Лекція 9.

Мікроклональне розмноження рослин

План лекції:

1. Теорія і принципи мікроклонального розмноження рослин.
2. Етапи мікроклонального розмноження рослин.
3. Фактори, які впливають на регенерацію рослин.
4. Умови культивування рослин-регенерантів.

Теоретична основа, загальні принципи мікроклонального розмноження рослин виходять із закономірностей їх онтогенезу, часової і просторової реалізації морфогенетичної програми, автономії рослинного організму на різних етапах його росту та розвитку, наявності в рослині систем само-авторегуляції, функціонуючих в певних умовах.

Мікроклональне розмноження рослин – це нестатеве вегетативне розмноження, при якому отримують генетично ідентичні форми, що сприяють збереженню генетично однорідного посадкового матеріалу. В основі мікроклонального розмноження лежить процес регенерації, відновлення цілої рослини із клітин, які знаходяться на різних етапах онтогенезу, життєвого циклу.

Для отримання цілої рослини може бути використано два типи клітин:

1) ізольована клітина в стані активного ділення із ембріональної, недиференційованої, неспеціалізованої меристемної тканини. Такими тканинами є верхівкові (апикальні) меристеми пазушних або сплячих бруньок стебла;

2) ізольовані спеціалізовані тканини, які пройшли процес диференціації. Такі клітини складають спеціалізовані тканини експланту (мезодерміс, епідерміс). В цьому випадку виникають *in vitro* ініціюючі меристемоїдні ембріональні клітини, проходить соматичний ембріогенез, утворюються бруньки або ембріоїди із яких формується рослина і здійснюється процес розмноження рослин.

Будь-якій клітині рослини властива тотипотентність, тобто здатність давати початок новій рослині. Але проявлення цієї властивості спостерігається в клітинах, які називають меристемоїди. Меристемоїди - це морфогенетично компетентні клітини, які відповідають на індуктори диференціювання і склад поживних середовищ утворенням пагонів, бруньок, коренів, зародків. Морфологічно їх виявляють в калусних тканинах в компактних осередках клітин, які діляться у вигляді мілких, ізодіаметричних, тонкостінних клітин з великим ядром, густою цитоплазмою і які майже без вакуолей. З таких клітин складаються апикальні меристеми та клітини зародків, тому в тканинах отриманих із цих органів найкраще всього індукувати органогенез. В зв'язку з цим регенерація із будь-яких клітин рослин можлива при вдалій трансформації цих клітин в меристемоїди, створюючи відповідні умови. проте навіть у рослин з високою

ступінню регенерації, наприклад у тютюну, клітин-меристемоїдів не дуже багато: в первинному калусі на 1000-10000 клітин може бути один меристемоїд. Розподіл меристемоїдів не рівномірний по органам рослин і різні види відрізняються по вмісту меристемоїдів в тканинах окремих органів. В зв'язку з цим головним завданням є вибір частини рослини, яка може послужити первинним експлантом. Найбільш високу ступінь регенерації мають зародки, сім'ядолі, гіпокотиль, корінь, стебло, листок, бульба, суцвіття, нуцелус, пиляки. Загальновідомо, що культури тканин, які отримані із молодих листків або стебел, більш здатні до регенерації рослин. Культури тканин, отримані із дорослих рослин, як правило не здатні до регенерації і тому первинні експланти деревних рослин необхідно відбирати на ювенільних фазах розвитку.

Вміст меристемоїдів можна збільшити завдяки відбору. Крім того, для подальшого розвитку меристемоїдів їх необхідно відділяти від немеристемоїдних клітин, так як останні подавляють ембріогенез компетентних клітин, виділяючи інгібітори. Необхідність відбору меристемоїдних клітин також обумовлюється тим, що при довготривалому культивуванні тканин знижується здатність до регенерації рослин. Процес відбору залежить від досвіду і здатності дослідника визначати морфо генетичні компетентні клітини. При цьому використовують «зелені осередки» калусу, як маркери клітин, які регенерують рослини. Інші пошукачі відбирають для регенерації гладенькі, білі структури, що не розпадаються. Відмічено, що у злакових, вони найбільш легко дають початок ембріогенним лініям.

Кількість меристемоїдних клітин, а також експресія або пригнічення тотипотентності залежить від умов, в які поміщають клітину в період індукції регенерації. Серед них найбільш важливими є освітлення, температура і вплив певних хімічних сполук.

Сезонні зміни поведінки ізольованих тканин зазвичай пов'язують зі зміною фотоперіоду і температури при яких вирощували донорні рослини. Відмічено, що вміст меристемоїдів і найбільш висока ступінь регенерації спостерігається у випадку вирощування рослин-донорів при оптимальних для даного виду фотоперіоді і температурі. Експланти, відібрані у рослин, які вирощувались при несприятливому фотоперіоді, утворюють мало або зовсім не дають регенерантів, навіть у випадку коли фотоперіод при культивуванні *in vitro* буде оптимальним.

Однією із умов є освітлення. В провідних лабораторіях стандартом є 16-ти годинне освітлення, оптимальна інтенсивність освітлення для органогенезу – 1000 лк. При цьому велике значення має спектральний склад світла, особливо освітлення ультрафіолетовими, голубими і червоними променями.

Для отримання більшої кількості меристемоїдних клітин і прискорення органогенезу, велике значення мають температурні оптимуми. Для індукції і прискорення органогенезу застосовують обробку тканин листків і пагонів субоптимальними температурами (+15-18⁰C), що покращує регенерацію коріння і стебел при подальшому культивуванні при t +21-25⁰C. Для деяких рослин більш

ефективною є короткочасна обробка більш низькою температурою (+4⁰C). Низькотемпературний стрес посилює андрогенез в культури пилку.

Вивчення процесу експериментального морфогенезу *in vitro* на всіх рівнях організації – від окремої клітини до верхівки пагона – призвело до створення технології клонального мікророзмноження рослин, яка в деяких країнах стала комерційною. Термін «клон» був запропонований Вебером для рослин, що розмножуються вегетативно.

Велику роль в розробці біотехнології мікроклонального розмноження рослин відіграли дослідження, які були проведені в різних країнах в кінці 50-х – на початку 60-х років, по вирощуванні верхівкових меристем різних рослин. В результаті цих досліджень було позитивно вирішено питання про можливість отримання цілої рослини при вирощуванні *in vitro* його апікальної меристеми.

Переваги клонального мікророзмноження рослин:

- значно вищий коефіцієнт розмноження. При мікроклональному розмноженні можна отримати до 100000-1000000 мериклонів в рік, тоді як при звичайному розмноженні - 5-100 рослин за той же термін;
- мініатюризація процесу, що призводить до економії площ, які зайняті маточними та розмножуваними рослинами;
- оздоровлення рослин від грибних і бактеріальних патогенів, вірусів, мікоплазменних, віроїдних і нематодних інфекцій;
- великою перевагою даної технології є те, що в умовах *in vitro* часто розмножуються і укорінюються ті рослини, які зовсім не розмножуються або погано розмножуються звичайним шляхом.

Сфера застосування мікроклонального розмноження різноманітна і має тенденцію до розширення. Клональне мікророзмноження можна проводити різними способами.

Основні типи мікророзмноження:

- 1) мікрочеренкування;
- 2) утворення мікробульб та мікроцибулин;
- 3) індукція адвентивних бруньок;
- 4) пригнічення апікального домінування і розвиток пазушних бруньок;
- 5) розмноження в біореакторах мікробульбами (картопля, лілії, гладіолус та інш.).

В відповідності з кількістю отриманої продукції, технології розмноження *in vitro* розподіляють на велико- і мало масштабні. Поділ такий умовний тому, що він пов'язаний з метою досліджень та сферою застосування.

Етапи мікроклонального розмноження:

1. Вибір рослини донора, ізолювання і стерилізація експланту, створення умов для його росту на поживному середовищі *in vitro*.

2. Власне розмноження шляхом:

- стимуляції розвитку всіх пазушних бруньок експланту в результаті пригнічення апікального домінування як первинного пагону так і тих, що виникли заново;

- мікрочеренкування пагону, який зберігає апікальне домінування;

- стимуляція утворення мікро бульб та мікро цибулин;

- індукція утворення адвентивних бруньок тканинами листка, стебла, чешуйками, кореневищами, зачатками суцвіть (без утворення калусних тканин);

3. Укорінення розмножених пагонів і адаптація пробірочних рослин до висадження в умови *in vivo*.

4. Вирощування рослин і перенесення їх в умовах теплиці в ґрунт або на штучний субстрат.

5. Підготовка до реалізації або висадження на поля.

Як було сказано вище, однією із головних переваг мікроклонального розмноження над традиційним є високий коефіцієнт розмноження (кількість мери клонів від одного експланту в рік). Коефіцієнт розмноження залежить від ряду факторів:

- генотип рослини-донора і її фізіологічний стан;
- склад поживного середовища та фізичні умови в культуральному посуді і за його межами (освітлення, вологість, газовий склад);
- рівень стабільності процесу розмноження при субкультивуванні мериклонів, що утворилися;
- дотримання асептичних умов вирощування та приділенні особливої уваги хронічним інфекціям, яку викликають повільно ростучі патогени (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*).

На сучасному етапі розроблено ряд різних способів біотехнології мікроклонального розмноження рослин. В основі їх лежать три принципові підходи:

1. Індукція до ділення клітин пазушних меристем.

2. Утворення із тканини експланту пагонів і ембріодів та їх поділ.

3. Диференціація в калусі бруньок і здійснення соматичного ембріогенезу.

Розглянемо кожний підхід до мікроклонального розмноження окремо.

Індукція до ділення клітин пазушних меристем.

В нативних природних умовах активація пазушних меристем регулюється ступінню апікального домінування, яке контролюється факторами фітогормонального і трофічного характеру. Загально прийнятим є те, що в даних процесах важливу роль виконують ауксини та цитокініни, а також інгібітор, біосинтез якого контролюється ауксинами. Стан меристеми пазушних бруньок змінюється в залежності від концентрації ауксинів, які утворюються в апікальній верхівковій меристемі, рухаються базіпетально, досягають меристем пазушних бруньок і накопичуючись в концентраціях вище оптимальної, починають подавляти ріст бокових пазушних бруньок. При видаленні верхівкової точки росту рослини знімається апікальне домінування і індукується клітинне ділення та ріст пазушних бруньок.

При вирощуванні меристем пазушних бруньок на поживному середовищі, яке містить цитокініни, розвиваються структури дуже схожі з протокормами, у яких ініціюється утворення первинних корінців і надземної частини. Збуджується утворення пазушних нових бокових пагонів, які розділяють і повторно культивують. Таким шляхом можна отримати протягом року тисячі екземплярів посадкового матеріалу.

Склад поживного середовища, особливо його фітогормонального комплексу має вирішальне значення. Особливу увагу необхідно приділити вмісту в середовищі цитокінінів. При його високій концентрації спостерігаються негативні явища:

- модифікований аномальний ріст пагонів;
- утворення бруньок, які втрачають здатність до клітинного ділення і диференціації пазушних меристем і утворенню первинних корінців;
- відмирання висаджених в ґрунт рослин;

Утворення із тканини експланту пагонів і ембріодів та їх поділ.

Лекція 10

ТРАНСГЕННІ РОСЛИНИ

ПЛАН лекції.

1. Вступ
2. Методи одержання трансгенних рослин:
3. Підбір промотору.
4. Комерційне використання трансгенних рослин.

5. Трансгенні рослини та екологія

Генетична інженерія – частина біотехнології, яка включає комплекс підходів та методів, які дають можливість вносити зміни в „конструкцію” спадкової речовини організмів (тварин, рослин, мікробів) та вірусів, вміня отримати рукотворні генетичні структури. Генетична інженерія та трансгенез вперше дозволили здійснити **панміксію**, тобто подолати бар’єри між всіма царствами живого. Культивуємі рослини завдяки використанню методів генетичної інженерії набули властивостей, як стійкість до гербіцидів, збудників хвороб, різним абіотичним стресам (посуха, заморозки, засолення та інш.), покращені біохімічний склад та смакові якості, швидке дозрівання.

Можливості біотехнології в рослинництві різко вирости після практичної реалізації досягнень генетичної інженерії – створення генетично модифікованих організмів (**ГМО**). Масове комерційне вирощування трансгенних рослин в ряді країн світу почалось з 1996 року, а в 1999р. Площі під ними досягли майже 40 млн.га. По прогнозам, в 2004 році під трансгенними культурами буде зайнято близько 60 млн.га. Вирощування трансгенних рослин забезпечить збільшення урожайності та скороплідності завдяки їх екологічній стійкості та пластичності, що дає високий економічний ефект. Вирощування трансгенних культур сприяє значному зниженню затрат на пестициди та мінеральні добрива, що характеризує їх агротехніку, як більш екологічну в порівнянні з традиційною.

Отримані з допомогою генетичної інженерії трансгенні організми (трансгеники) відрізняються від природних або створених шляхом селекції тим, що в їх спадкову речовину (геном) введені гени або ген, які містяться у далеко сімейних організмів або створені штучно. Завдяки генетичній модифікації рослини можуть виконувати не властиву їм роль. ГМР стають фабриками лікарських речовин та харчових домішок або інструментом для „м”якого” введення ліків, вакцин та необхідних харчових домішок. Наприклад, коренеплоди цукрових буряків накопичують замість сахарози низькомолекулярні фруктами, або банани, які використовують як їстівні вакцини. Завдяки введенню генів бактерій вищі рослини набувають здатності приймати участь в руйнуванні чужерідних органічних сполук (ксенобіотиків), які забруднюють навколишнє середовище.

Гарантією проти можливих небажаних наслідків генетичної модифікації рослин є законодавче регулювання розповсюдження ГМР та розробка пов’язаних з цим методів оцінки екологічного ризику.

В нашій країні існує законодавство. Яке регулює генно-інженерні роботи, польові дослідження трансгенних рослин та ввезення генетично модифікованого насіння, продуктів харчування та кормів (Закон про державне регулювання в області генно-інженерної діяльності від 05.07.1996р. та підзаконні акти).

В основу створення трансгенних рослин були покладені три видатні досягнення фізіології рослин, які створили основу для інтеграції технології рекомбінантних ДНК: - відкриття фітогормонів, які регулюють ріст і розвиток

рослин; - розробка методів культивування клітин та тканин рослин *in vitro* на середовищах, які містять макро- та мікроелементи, вітаміни, сахарозу та фітогормони (ці методи дають можливість отримувати клітини, тканини та цілі рослини в стерильних умовах та проводити їх селекцію на специфічних середовищах); - встановлення феномену тотипотентності соматичних рослинних клітин, який відкриває шлях до регенерації з них цілих рослин.

1. Методи одержання трансгенних рослин.

Історія отримання трансгенних рослин нараховує два десятиліття. Основним методом отримання трансгенних рослин 20-25 років тому була пряма обробка меристем, насіння, пилку чужорідною ДНК та послідовний скринінг потомства на наявність інтродукованих генів. Першою генно-інженерною рослиною була створена в Університеті штату Вісконсії химера, коли в клітині соняшнику був введений ген запасного білку бобів (ген фазеоліну) та показана його експресія. В СРСР перші досліді по генетичній трансформації рослин були проведені на ячменю з використанням мутації *wx*. На Україні були проведені експерименти по генетичній трансформації кукурудзи та гороху. Проводилась генетична трансформація рослин шляхом мікроін'єкцій ДНК та електропорації протопластів. Настоящою революцією в генетичній трансформації рослин явилось виявлення природного вектору - агробактерій для переносу генів та розробка методу мікробомбардування рослинних об'єктів мікрочастинками металів попередньо покритими ДНК.

Агробактеріальна трансформація (метод кокультивації з агробактерією).

Метод базується на трансформації рослинних експлантів агробактеріями, що несуть векторну конструкцію, яка містить чужерідний ген, вбудований в область Т-ДНК. Агробактерії є природними переносниками генів в клітини рослин. Використання цих векторів дозволяє переносити чужерідні гени в клітини рослин і потім регенерувати нормальні фертильні рослини, в більшості випадків через стадію калусоутворення або соматичних зародків при подальшій регенерації з них рослин. Ці стадії являються в значному ступені генотипово залежними. Популярність методу пов'язана з відносною простотою проведення трансформації та досить високим виходом одержаних трансгенних рослин (10-60%, в залежності від виду рослин).

Як вихідний матеріал необхідно мати штам агробактерії з векторною конструкцією. Вектор повинен мати послідовність гену, який необхідно ввести в геном рослини. При цьому походження гену (прокаріотичний чи еукаріотичний) не важливо для трансформації проте він повинен знаходитись під контролем промотору, здатного експресуватись в рослинну клітину. Крім функціонального гену вектор повинен мати селективний маркер трансформації Як маркер зазвичай використовують гени стійкості до канаміцину (ген *npt*), гігromіцину (ген *hpt*).

Як експлант для трансформації використовують стерильні листкові диски, іноді використовують молоді корінці (арабідопсис), гіпокотилі (томати), сім'ядолі (томати, баклажани), міжвузля (картопля). При використанні для агробактеріальної трансформації сформованих меристем є можливість отримувати трансгенні рослини незалежно від генотипу, так як регенерація рослин із меристем є найбільш простим прийомом в порівнянні з їх регенерацією із калусу або соматичних зародків. Використання для агробактеріальної трансформації меристеми пагонів комерційних сортів бавовни показало можливість генотипово незалежної трансформації. Укорінення трансформованих пагонів, яке важке для деяких сортів, можна подолати шляхом їх прививання на укорінені підвої.

Проводять інокуляцію експлантів в рідкому середовищі, яке містить агро бактерію з векторною конструкцією, час інокуляції підбирається для кожного виду рослини індивідуально. При цьому проходить зараження тільки пораненої поверхні експланту. Після 1-2 діб кокультивування експланти переносять на середовище з антибіотиком, що призводить до загибелі не трансформованих клітин. Через 2-5 тижнів на трансформованому експланті розвиваються пагони, які молекулярно тестують, а потім переносять на середовище для укорінення.

Важливою проблемою при трансформації рослин є отримання частини трансгенних рослин, які є химерами, тобто їх тканини містять як трансформовані так і не трансформовані клітини. В даному випадку використовують один штам, який несе певний ген, яким інокулюють різні типи експлантів. Протягом довгого періоду часу вважали, що агробактерії здатні трансформувати тільки клітини голонасінних та дводольних рослин. Однією із причин, що обмежують агробактеріальну трансформацію злаків є нездатність їх клітин до синтезу сполук, які індукують процесинг та перенесення Т-ДНК. Проте на сучасному етапі вже розроблена трансформація для пшениці, кукурудзи та рису.

Порівняна простота отримання трансгенних рослин при агробактеріальній трансформації, можливість використання уже сформованих меристем та приємливість даної методики для трансформації злаків дають прогнозувати зростання кількості трансгенних рослин для теоретичних досліджень та практичного використання даного методу трансформації.

Пряма трансформація з використанням ДНК.

Для прямого перенесення генів в рослинні клітини використовують трансформацію рослинних протопластів. Як маркерний ген використовують ген неоміцин фосфотрансферази, який визначає стійкість до канаміцину та деяким іншим аміно глікозидним антибіотикам. Перевагою даного гену є здатність тільки трансформованих клітин до росту та позеленінню на певних концентраціях антибіотиків.

Даний метод має ряд недоліків: 1) складність процедури отримання протопластів; 2) відсутність регенерації рослин із протопластів для багатьох видів

рослин; 3) можливість появи соматоклональних варіантів; 4) довготривалий термін від моменту ізолювання протопластів до отримання трансгенних рослин; 5) низька частота трансформації.

Переваги використання даного методу:

-для трансформації може бути використаний будь-який ДНК-вектор, що несе чужерідний ген;

-гібридний ген інтегрується в ядерну ДНК рослини і експресується, використовуючи механізм клітинної рекомбінації.

На сучасному етапі 140 видів рослин були протрансформовані шляхом прямого перенесення ДНК .

Метод мікроін'єкцій

Вперше розроблений в 1985 році одночасно в декількох лабораторіях світу, в тому числі і в Україні зокрема в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії. Порівняно з іншими методами трансформації метод мікроін'єкцій має ряд переваг:

- універсальність та стандартність операцій
- необхідне для трансформації широке коло об'єктів – реципієнтів (ізолювані протопласти, одиничні калусні клітини, клітини в складі цілої рослини, багатоклітинні структури);
- різний молекулярно-генетичний матеріал (молекули ДНК, ізолювані ядра, хлоропласти та мітохондрії), який використовується для ін'єкцій;
- високу ефективність трансформації;
- можливість використання як об'єкта ізолюваних мікроспор та клітин пилка.

Відносно низька продуктивність методу мікроін'єкцій (до 50 ін'єкцій за годину) компенсується високою ефективністю трансформації. До недоліків можна віднести наявність досить складного обладнання.

Етапи робіт на прикладі клітинної суспензії:

Мікроголки заповнюють трансформуючим фактором: 1) у випадку розчину ДНК – кінець голки вводять в краплю з розчином ДНК; 2)у випадку клітинних органел проводять фіксацію клітини донора з допомогою мікроприсоски , потім вводять в відповідний компартмент клітини кінець мікро голки і вводять відповідні органели в кінець мікро голки;

Фіксують об'єкт-реципієнт з допомогою мікроприсоски і вводять в нього відповідний компартмент, який міститься в мікро голці.

Після ін'єкції всіх клітин їх переносять в чашку Петрі в мікро краплю об'ємом 0,5 – 1 мкл під шар вазелінового масла.

Клітини, які піддали ін'єкції культивують в мікрокраплях, розводячи їх по мірі необхідності свіжим поживним середовищем. Отримані клітинні лінії та рослини тестують на наявність ознак, які кодуються трансформуючими факторами, а також проводять молекулярно-біологічні та біохімічні аналізи. В залежності від об'єкту з яким проводять маніпуляції та мети експерименту змінюють тільки параметри мікро інструментів (діаметр мікро присоски складає приблизно половину діаметру клітини-реципієнта, діаметр кінчика мікро голки в випадку введення днк сягає 0,5-1 мікромметр, а в випадку введення органел – 2-4 мкм, діаметр мікро піпетки для відбору, які піддали ін'єкції складає 1,5-2 діаметри об'єктів- реципієнтів).

Порівнюючи технологію генетичної трансформації вищих рослин з допомогою мікроін'єкцій з іншими методами трансформації, можна відмітити наступні моменти:

1. метод трансформації з допомогою мікроін'єкцій уступає в технологічності методам прямої трансформації з допомогою агро бактерій тільки в тих випадках, коли останні можна використати;
2. даний метод дає можливість вирішити ряд задач по трансформації рослин, які неможливо вирішити іншими методами, наприклад:
 - трансформація рослин, для яких не розроблені методи виділення, культивування протопластів та регенерації з них рослин і які несприйнятливі до інокуляції агробактеріями;
 - перенесення в клітини ізольованих клітинних органел;
 - використання для трансформації неселектуючих молекул ДНК;
 - використання як об'єкту-реципієнту гаплоїдних клітин – мікроспор, із яких в подальшому можлива регенерація гаплоїдних рослин.

Електропорація

Метод базується на тому, що імпульси високого тиску зворотно збільшують проникність біомембран. Для рослинних протопластів процедура електропорації виявилась дуже ефективною. Метод полягає в наступному: на рослинні протопласти, які знаходяться в розчині високої концентрації, що містить ДНК-вектори, діють високовольтним імпульсом (напруга 200-350 В, тривалість імпульсу 54 мс). В результаті молекули ДНК поглинаються клітинами через пори в клітинній мембрані. Після розведення розчину протопласти висівають на відповідне середовище для регенерації. Ефективність перенесення визначається через 24-48 год. після електрошоку.

Упаковка в ліпосоми

Це один із методів, що використовується для захисту екзогенного матеріалу, який вводиться в протопласти рослин, від дії нуклеаз, які руйнують нуклеїнові кислоти. Ліпосоми – це сферичні утворення, оболонки яких складаються із фосфоліпідів. Їх можна отримати в результаті різкого струсу або обробки ультразвуком водних емульсій фосфоліпідів. З допомогою ліпосом в протопласти рослин були введені РНК вірусу тютюнової мозаїки, ДНК Ті-плазмиди, а також

цілі метафазні хромосоми. До переваг системи переносу з допомогою ліпосом можна віднести їх низьку токсичність по відношенню до клітин і можливість використання для більшості рослин, клітини яких здатних піддати ліпосоми утилізації. На сучасному етапі даний метод використовується рідко із-за його технічної складності та низької трансформуючої активності (0,5%-1%).

Підбір промотору

Підбір промотору являє собою дуже важливу проблему, у випадку коли необхідна експресія інтродукованого гену в специфічних тканинах або окремих органах, на певних етапах онтогенезу, під впливом будь-яких сполук.

Було встановлено, що деякі промотори являють собою складні структури, які складаються із блоків (субдоменів), які контролюють експресію генів. Так для найбільш вивченого 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти делеційний аналіз показав, що при видаленні послідовностей промотору від -208 до-46 п.н. ефективність транскрипції різко знижувалась і складала тільки 1/12 вихідного рівня. У випадку вбудовування цієї послідовності незалежно від її орієнтації ефективність транскрипції відновлювалась.

Було встановлено, що експресія генів контролюється послідовностями ДНК, які називають *cis*-активними елементами, тобто вони можуть регулювати експресію генів, розміщених на тому ж ланцюгу ДНК і не діють на гени, які локалізовані в інших місцях. Експресуючі властивості промоторів вивчають, підставляючи їх під маркерні або репортерні гени, експресію яких можна порівняно легко визначити в трансгенних рослинах. З даною метою найчастіше використовують гени хлорамфеніколацетилтрансферази та неоміцинфосфотрансферази, які не синтезуються в рослині. При підставлянні даних генів під вивчаємі промотори трансформовані клітини набувають здатності до росту на середовищах з даним антибіотиком.

Можна спрогнозувати в перспективі створення химерних промоторів, які складаються із елементів, що забезпечують експресію генів, які стоять під ним, в необхідних органах та тканинах, під дією різних стресових впливів та нападу патогенів, які визначають потрібний рівень експресії, а також складаються із комплексу елементів, які забезпечують експресію необхідних генів в вимагаємих тканинах та органах і під тиском специфічних впливів.

Лекція 14. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ

Генетична інженерія (технологія рекомбінантних ДНК або молекулярне клонування) – це сукупність експериментальних прийомів, які дають можливість здійснювати перенесення генетичного матеріалу із одного організму в інший. Єдиного, універсального набору методик не існує, але найчастіше експерименти проводять по наступній схемі:

- Із організму – донору потрібних генів – екстрагують нативну ДНК (ДНК, що клонується; вбудована ДНК; ДНК-мішень; чужерідна ДНК), піддають її ферментативному гідролізу (розрізають) та з'єднують (лігують, зшивають) з іншою ДНК(вектором для клонування). В результаті утворюється нова рекомбінантна молекула.
- Дану конструкцію вводять в клітину-реципієнт, де вона реплікується і передається потомкам. Даний процес називають трансформацією.
- Ідентифікують і відбирають клітини, які несуть рекомбінантну ДНК (трансформовані клітини).
- Одержують специфічний білковий продукт, який синтезується клітинами-хазяїнами, що слугує підтвердженням клонування шуканого гену.

Технологія генетичної інженерії складається із наступних основних етапів:

1) Вибір гену і його клонування.

Вибір гену визначається необхідністю передачі рослині певної господарсько-цінної ознаки. На сучасному етапі для трансформації рослин використовують в основному гени, які визначають моно генні ознаки, такі як стійкість до гербіцидів та пестицидів, стійкість до деяких інших видів стресів. Більшість генів, які визначають дані ознаки, виділені із бактеріальних геномів. Останнім часом як донор генів, що визначають ознаку стійкості, вибирають геноми диких видів рослин.

2) Підбір генотипу – реципієнта. В ідеальному варіанті в якості реципієнта підбирають рослини такого сорту або лінії, які відповідали б вимогам виробництва по урожайності, якості плодів, стійкості до біотичних та абіотичних стресів, але мали лише одну негативну властивість. Тоді в геном рослини даного сорту вводиться новий ген, що призводить до значного покращення вибраного сорту. Також вибір генотипу рослини-реципієнта визначається здатністю його клітин до регенерації в цілу фертильну рослину, така як показано, що ця властивість значно залежить від генотипу.

3) Введення гену і його експресія в геномі рослини-хазяїна. Проблема перенесення чужерідних генів в геном рослин суттєво полегшується в зв'язку з використанням ґрунтових агробактерій, що дозволяє вводити чужеродні гени в геном дводольних та однодольних рослин. Важливо забезпечити експресію чужорідного гену в геномі рослини-реципієнту та стабільне успадкування ознаки в поколіннях. Експресія введеного гену залежить від ряду причин, в тому числі від місця інтеграції гену в геном рослини, послідуєчого метилювання промоторної області і введеного гену.

4) Регенерація трансформованих клітин і відбір трансгенних рослин. Регенерація рослин із трансформованих клітин залежить від тотипотентності клітин і не завжди можлива.

Конструювання рекомбінантних молекул здійснюється за допомогою цілого арсеналу ферментів. Це ферменти, які дозволяють проводити різні маніпуляції з молекулами ДНК.

Основні ферменти генетичної інженерії.

Рестриктази. Це особливий клас ендонуклеаз, які гідролізують ДНК по певним специфічним послідовностям, які називають сайтами рестрикції. Кожна із рестриктаз впізнає свій сайт і розрізає ДНК або в середині послідовності сайту рестрикції або в безпосередньо біля нього. Таким чином, при дії конкретної рестриктази одна і та ж послідовність ДНК буде утворювати однакові набір фрагментів. Позначення рестриктаз складається із початкових букв латинської назви виду бактерій, із яких був виділений фермент і додаткового позначення, так як із бактерій одного виду може бути виділено декілька різних рестриктаз:

Escherichia coli – EcoR I, EcoR V і т.д.

Рестриктази діляться на декілька типів по характеру розщеплення нуклеотидної послідовності:

- Рестриктази I типу впізнають сайт рестрикції, але розщепляють послідовність ДНК на вільній (произвольной) відстані від сайту впізнавання.
- Рестриктази II типу у яких сайти впізнавання і місця рестрикції співпадають.
- Рестриктази III типу схожі з рестриктазами I типу, вони гідролізують ДНК на відстані 20=35 н.п. від сайтів впізнавання.

При молекулярному клонуванні важливо, щоб розщеплення донорної та векторної ДНК проходило в строго певних ділянках(сайтах). Тому в подальших дослідженнях використовували рестриктази II, які розподіляються на декілька класів в залежності від розміру сайту рестрикції та довжини отриманих фрагментів ДНК:

- 1) мілкорозщепляючі – сайт рестрикції представлений чотирма нуклеотидними парами;
- 2) середньорозщепляючі - сайт рестрикції 6-8 н.п.
- 3) великорозщепляючі – сайт рестрикції – 10-14 н.п.

Рестриктази II можна розділити на дві групи по тому як вони розщепляють послідовність ДНК:

- перша група вносить розриви по осі симетрії впізнаної послідовності і таким чином утворюються «тупі» кінці;

- друга група вносить розриви із зрушенням в сторону, в результаті утворюються «липкі» кінці, фрагменти яких мають на своїх кінцях односторонні взаємно комплементарні ділянки.

Ферментативна активність рестриктаз вимірюється в одиницях активності. Це така кількість ферменту, яка необхідна для повного гідролізу за один час 1мкг ДНК фагу лямбда при оптимальних умовах.

ДНК-полімерази.

Найчастіше використовують ДНК-полімеразу I, яку виділяють із E.coli або фагу T4. Вона має здатність подовжувати ланцюг ДНК в напрямку 5-3 шляхом приєднання комплементарного нуклеотиду. Ця властивість ДНК-полімераз використовується в генетичній інженерії для побудови другого комплементарного ланцюг: при додаванні ферменту до одноланцюгової ДНК-матриці в присутності праймера пройде її подвоєння. Дана властивість використовується для створення кДНК – бібліотек, також для заповнення пустих місць в ланцюгу ДНК, наприклад, при забудові фрагментів з виступаючими 5-кінцями. Екзонуклеазна активність ДНК-полімераз використовується для введення радіоактивної мітки у фрагмент ДНК. Специфічні термолабільні ДНК-полімерази – Tth і Tag - ампліфікують будь-який фрагмент ДНК методом полімеразно-ланцюгової реакції.

РНК-залежна ДНК-полімераза, зворотня транскриптаза, ревертаза. Синтезує комплементарний ланцюг ДНК на РНК-матриці. З допомогою ревертаз можна одержувати кДНК-ДНК-копії мРНК. кДНК дають можливість вивчати будову генів та ідентифікувати повноцінні копії цих генів в геномі.

ДНК-лігаза. З'єднує фрагменти ДНК шляхом відновлення фосфодіестерних зв'язків між сусідніми нуклеотидами. Цей процес називається лігування. Найчастіше використовують ДНК-лігазу фагу T4.

Нуклеази. Велика група ферментів, які каналізують реакцію гідролізу молекул нуклеїнових кислот. В результаті дії нуклеаз молекула ДНК розпадається на фрагменти або окремі нуклеотиди. Вихідна функція нуклеаз в клітині – деградація непотрібних в даний момент життєдіяльності молекул та захист від чужорідних молекул нуклеїнових кислот. Нуклеази підрозділяють на два типи:

- екзонуклеази, які гідролізують молекули з 5 або 3 – вільних кінців;
- ендонуклеази, які розщепляють всередині послідовності фрагменту або кільцевої молекули ДНК.

По типу дії нуклеази підрозділяють на групи:

- 1) ДНКази – можуть впливати тільки на молекули ДНК;
- 2) РНКази – можуть впливати тільки на молекули РНК;
- 3) Нуклеаза золотистої квасолі, яка діє на ДНК та РНК.

Нуклеази можуть вибірково впливати на одноланцюгову (нуклеаза SI) або дволанцюгову (ендонуклеаза III) молекули ДНК чи на гібридну ДНК-РНК-молекулу (рибонуклеаза H).

Рестрикційне картування.

Рестрикційне картування проводять за допомогою ферментів рестриктаз, які розрізають дволанцюгову ДНК в специфічних ділянках, які називають сайт рестрикції. Зазвичай ця специфічна послідовність нуклеотидів має довжину від 4 до 6 пар основ. Фермент розрізає ДНК в кожній точці де зустрічається така послідовність. Якщо взяти певну молекулу ДНК і обробити її рестриктуючим ферментом, то в певних місцях відбудеться розщеплення, яке розділить ДНК на ряд окремих фрагментів. Ці фрагменти можна фракціонувати по розміру методом гель-електрофорезу. Для цього препарат оброблений ДНК наносять на агарозний гель. Під дією електричного струму фрагменти переміщуються вниз по гелю зі швидкістю, яка залежить від їх довжини. В результаті електрофорезу в гелі утворюється ряд полос. Полоси, які розміщені вверху гелю, відповідають більшим фрагментам, а ті, що внизу – меншим. Якщо гель прокалібрувати, то можна визначити довжину будь-якого індивідуального фрагменту ДНК. Для цього на одну із дорожок гелю наносять контрольну пробу, яка містить суміш стандартних фрагментів відомого розміру (**маркери**). Співвідношення між розміром досліджуваного фрагменту і пройденою ним відстанню встановлюють по швидкості міграції маркерів. Рестрикційна карта – це фізична карта взаєморозміщених фрагментів досліджуваної ДНК. Вона являє собою лінійну послідовність сайтів, в яких рестриктуючі ферменти впізнають свої сайт-мішені. Відстань між сайтами рестрикції вимірюють в нуклеотидних парах ДНК. Більш детальну інформацію про досліджувану ДНК дає секвенування.

Секвенування- визначення нуклеотидної послідовності ДНК.

Вичерпну інформацію про молекулу ДНК можна отримати, тільки визначивши її нуклеотидну послідовність. Так, просеквенувавши ген, часто вдається визначити його функцію, порівнявши його нуклеотидну послідовність з генами, функція яких уже відома. Без результатів визначення нуклеотидної послідовності неможливо проводити дослідження по молекулярному клонуванню. Секвенування дає можливість досить швидко визначити нуклеотидну послідовність фрагментів довжиною 350-1000 нуклеотидів і більше, які утворюються при розщепленні ДНК рестриктазами.

Секвенування того чи іншого фрагменту ДНК можна провести використовуючи наступні методи:

- хімічний
- ферментативний

- з допомогою вектору на основі фагу M13.

Хімічне секвенування базується на вибірковій хімічній деградації нуклеотидів. Метод був запропонований в 1977р. А.М.Максамом та В.Гілбертом і названий їх іменем. Для секвенування даним методом необхідно одержати одноланцюгову молекулу ДНК, один із кінців якої мітять з допомогою ізотопу ^{32}P , препарат міченої ДНК ділять на чотири порції і кожен обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну або дві із чотирьох основ. Додавання 60% мурашиної кислоти руйнує пуринові основи (А+Г), а додавання диметилсульфату – тільки гуанидинові основи; чистий гідразин руйнує піримідинові основи (Т+Ц), а в присутності 1,5М NaCl вибірково руйнуються тільки цитозинові основи. Дуже важливо підібрати умови реакції таким чином, щоб на кожен молекулу ДНК приходилось тільки декілька пошкоджень. При обробці пошкоджених молекул піперидином в ДНК утворюється розрив в тому місці, де знаходилась пошкоджена основа.

В результаті утворюється набір мічених фрагментів, довжини, яких визначаються відстанню від зруйнованої основи до кінця молекули. Фрагменти, які утворюються в усіх чотирьох реакціях піддають електрофорезу на чотирьох сусідніх дорожках в акріламідному гелі в денатуруючих умовах; потім проводять радіоавтографію, і фрагменти, які містять радіоактивну мітку, залишають відпечатки на рентгенівській плівці. По їх положенню можна визначити на якій відстані від міченого кінця знаходилась зруйнована основа, а знаючи цю основу – її положення. Так, по набору полос на рентгенівській плівці визначають нуклеотидну послідовність фрагменту ДНК, який аналізують. Проте даний метод має ряд недоліків пов'язаних з довготривалістю та значною трудоемкістю. На сучасному етапі на основі хімічного синтезу розроблені вдосконалені і швидкі методи секвенування, в тому числі твердофазне секвенування та секвенування з використанням звернено-фазової хроматографії.

Ферментативне секвенування, або дидезоксинуклеотидний метод або метод секвенування шляхом термінації (зупинки синтезу) ланцюгу, який був запропонований Ф.Сенгером в 1977р. В основі метода лежить принцип реплікації комплементарного ланцюгу ДНК на одноланцюговій матриці при проходженні в різних місцях послідовності ДНК перериванні синтезу, тобто термінації росту ланцюгу. Основним моментом ферментативного секвенування є термінація синтезу ланцюга, який будується. Термінуючими агентами, які призводять до зупинки реплікації є 2, 3 – дидезокситрифосфати (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ). Ці модифіковані основи не можуть утворювати фосфодиефірний зв'язок з наступним дезоксирибонуклеотидом. В результаті ріст (елонгація) даного ланцюгу термінується в тому місці, де в ДНК включився дидезоксирибонуклеотид.

Враховуючи те, що в основі секвенування по Сенгеру лежить процес реплікації ДНК, то основним ферментом являється ДНК-полімераза

(використовують ДНК-полімеразу I). В присутності одноланцюгової ДНК-матриці, короткого полінуклеотидного праймеру та нуклеотидів по принципу комплементарності буде проходити синтез другого ланцюгу ДНК. При цьому подовження ланцюгу буде проходити до того часу, поки замість дезоксинуклеотиду не приєднається дидезоксинуклеотид. Приєднання останнього призведе до зупинки синтезу.

В пробірках собирають чотири реакційні суміші, які мають однаковий склад: денатурований фрагмент ДНК-матриці, чия нуклеотидна послідовність визначають, чотири дезоксинуклеотиди, радіоактивно мічений короткий (16-24 п.н.) праймер, комплементарний фрагменту ДНК-матриці, з якого ДНК-полімераза I продовжить синтез, і сама ДНК-полімераза I. В кожну пробірку потім додають тільки один із дидезоксирибонуклеотидів. В кожній пробірці ланцюг, який синтезується буде піддаватись термінації в тому місці, де ДНК-полімераза I приєднає дедизоксинуклеотид, який був добавлений в реакційну суміш, тобто в одній пробірці синтез обірветься при приєднанні до комплементарного ланцюгу ддАТФ, в іншій – ддГТФ і т.д. Поскілки обірвання ланцюгу проходить в випадкових місцях, то одержуємо, набір фрагментів всіх можливих довжин, починаючи з праймера до кінця фрагменту, який секвенується. Одержані фрагменти ДНК розділяють в поліакріламідному гелі (з точністю до одного нуклеотиду), проводять радіоавтографію і по картині розподілення фрагментів в чотирьох пробах встановлюють нуклеотидну послідовність ДНК.

Маючи таку інформацію можна локалізувати на ДНК біологічно важливі ділянки. Так, наприклад, показано, що реплікація вірусу SV 40 завжди починається в одному специфічному Hind III-фрагменті і продовжується в обох напрямках. Рестрикційні карти і рестрикційні фрагменти були також використані для картування ділянок ДНК, на яких синтезується мРНК для вірусних білків.

Секвенування ДНК з допомогою вектору на основі фагу M13.

Для визначення нуклеотидної послідовності клонуваних ДНК використовують наступні підходи:

- застосування фагу M13 E.coli як вектору;
- вбудовування фрагменту, що досліджується у відповідний плазмідний вектор та побудова його рестриктної карти.

ДНК фагу M13 являє собою одноланцюгову кільцеву молекулу і коли ним інфікують E.coli, спочатку утворюється дволанцюгова реплікативна форма фагової ДНК, а одноланцюгові кільцеві молекули синтезуються на цій дволанцюговій молекулі як на матриці. ДНК M13 містить несуттєву частину, яку можна замінити необхідним фрагментом ДНК, при цьому інфекційність рекомбінантних вірусних частин зберігається. M13 – система має наступні переваги: виділена дволанцюгова реплікативна форма може існувати як плазміда,

а одноланцюгова фагова ДНК – використовуватись як матриця для секвенування ДНК.

На сучасному етапі визначена послідовність більшості прокаріотичних організмів та послідовності декількох тисяч генів еукаріот, розшифрований геном людини. Повністю налагоджено автоматичне секвенування на основі обох методів, що значно спрощує та здешевлює секвенування. Особливо широко використовується автоматизований ферментативний метод визначення нуклеотидних послідовностей. Використання флуоресцентних барвників, зв'язаних з термінуючими нуклеотидами, дає можливість проводити всі реакції в одній пробірці. Крім того, розроблено принципово нові підходи до секвенування, наприклад секвенування за допомогою гібридизації з фіксованими олігонуклеотидними чипами, секвенування шляхом використання ендонуклеаз та ряд інших методів. Всі ці методи дозволяють досить швидко вирішувати проблеми секвенування як великих ділянок ДНК, так і будь-яких геномів. Одержані результати заносять в бази даних – банк генів. Найбільш великими є банки генів Genbank (США), EMBL (ОЕ), DDBJ (Японія), які об'єднані в єдину мережу INCD. Нуклеотидні послідовності, які представлені в цих банках даних, доступні по адресам в Інтернеті.

Знаючи нуклеотидну послідовність гену та генетичний код, легко визначити амінокислотну послідовність білку, який її кодує. Раніше для визначення структури білка приходилось проводити ретельний та дуже трудомісткий аналіз виділеного та очищеного білку. Зараз часто буває простіше визначити структуру білка через нуклеотидну послідовність, чим з допомогою прямого секвенування білка. Існує велика кількість комп'ютерних програм, які дають можливість проводити комп'ютерний аналіз одержаних секвенованих послідовностей, в тому числі порівняння з відомими послідовностями, визначення ступеню гомології, виявлення специфічних (наприклад, регуляторних) послідовностей, можливість моделювати вторинні структури РНК.

Зразу ж за розробкою швидких методів секвенування з'явилися більш швидкі і прості методи синтезу порівняно довгих олігонуклеотидів з певною, заданою послідовністю. Тепер досить легко можна синтезувати послідовність до 100 нуклеотидів. Автоматизація цієї процедури ще більше полегшує та прискорює синтез.

Конструювання рекомбінантних ДНК.

Під рекомбінантними розуміють ДНК, утворені об'єднанням *in vitro* двох чи більше фрагментів ДНК, виділених із різних біологічних джерел. Певні фрагменти ДНК, в тому числі і фрагменти, які містять гени, одержують з використанням рестриктаз. Рестриктази можуть утворювати фрагменти як з тупими кінцями так і з

липкими кінцями. З'єднання фрагментів в одну молекулу проводять декількома методами, які залежать від того, які кінці мають фрагменти ДНК, що зшиваються:

- з'єднання фрагментів по однойменним липким кінцям;
- з'єднання фрагментів по тупим кінцям;
- з'єднання фрагментів з різнойменними кінцями.

Розглянемо коротко кожен метод.

З'єднання фрагментів по однойменним липким кінцям. Деякі рестриктази, наприклад EcoR I, вносять в ланцюги ДНК симетричні, розташовані з утворенням «сходинки» розриви на рівних відстанях від центру сайту впізнавання. Ці комплементарні один одному ділянки мають тенденції до асоціації за рахунок спарювання основ і тому їх називають комплементарними або «липкими» кінцями.

Спарювання основ проходить тільки між комплементарними послідовностями, тому AATT - кінці, які утворились при дії рестриктази EcoR I, не будуть спарюватись з ACTG – кінцями, які утворюються при дії Hind III. Але два фрагменти (незалежно від їх походження), які утворились під дією одної і тої рестриктази можуть «злипатись» за рахунок утворення водневих зв'язків між одноланцюговими ділянками комплементарних нуклеотидів.

Проте після такого спарювання цілісність подвійної спіралі не відновиться, оскільки залишаються два розриви у фосфодиефірному остові. Для їх відновлення тобто зшивання використовують ДНК-лігазу, яка завершує утворення рекомбінантної молекули ДНК.

З'єднання фрагментів по тупим кінцям. «Тупі» кінці фрагментів ДНК, отримані після дії рестриктаз, що роблять прямий розріз всередині сайту рестрикції, також можуть бути з'єднані за рахунок дії ДНК-лігази. В даному випадку реакція лігування (зшивання) має свої особливості і її ефективність нижче ніж зшивання по тупим кінцям. Проте перевага даного методу полягає в тому, що не має значення, які рестриктази утворювали ці «тупі» кінці. Фрагменти, які утворюються в результаті дії різнойменних рестриктаз, легко з'єднуються.

З'єднання фрагментів з різнойменними кінцями.

«Липкі» кінці можна ферментативним шляхом приєднати до молекул ДНК з «тупими» кінцями. Для цього затупляють «липкі» кінці. Даний процес проводять двома шляхами:

- відщеплюють нуклеотиди «липких» кінців за допомогою ферменту нуклеаза SI, яка руйнує тільки одноланцюгову ДНК;
- «липкі» кінці добудовують за допомогою ДНК-полімерази I, функція якої полягає в до синтезуванні другого ланцюгу ДНК.

В результаті із фрагменту ДНК з «липкими» кінцями одержують фрагмент з «тупими» кінцями, який з'єднується за допомогою ДНК-лігази з іншим фрагментом ДНК з «тупими» кінцями. Після того як фрагменти ДНК були з'єднані, їх необхідно ввести в клітину – реципієнт. Для здійснення даної мети використовують спеціальні молекули - вектори.

Векторні молекули. Трансформація.

Вектор – це рекомбінантна молекула ДНК (або РНК) в яку може бути вбудований чужерідний ген і яка містить елементи автономного репліко ну і сигнальні послідовності, необхідні для того, щоб забезпечити можливість експресії вбудованого гену, який, як правило не має власних регуляторних елементів. Вектори здатні акцептувати чужерідну ДНК і забезпечити її реплікацію, експресію чи трансформацію (перенесення в інші організми).

На сучасному етапі створено велику кількість векторів і по профілю використання їх можна розділити на декілька типів:

- **Вектори для клонування.** Використовують для збільшення кількості (ампліфікації) фрагмента ДНК, вбудованого в такий вектор за допомогою реплікації. Найчастіше використовують плазміди, бактеріофаги (фаги). Для клонування великих фрагментів геному використовують вектори – штучні бактеріальні і дріжджові хромосоми (BAC і YAC).
- **Експресійні вектори.** Їх використовують для аналізу конкретних послідовностей генів і їх білкових продуктів, а також для напрацювання конкретного білку. Існує велика кількість експресійних систем, особливо для прокаріотичних організмів. Є також вектори для експресії генів в клітинах дріжджів, рослин та ссавців. Експресійні вектори для еукаріотичних організмів завжди містять експресійну касету, яка складається із промотору здатного працювати в даному організмі і сайту поліаденілювання.
- **Вектори для трансформації.** Використовують для введення чужорідних фрагментів ДНК в геном реципієнта. Зазвичай такі вектори містять специфічні послідовності, здатні інтегруватися в геном.

Часто до складу векторної молекули входить **маркерний ген**, який після проникнення вектору в клітину надає їй фенотип, який свідчить про присутність вектору. Тобто вектор повинен мати селективну генетичну ознаку, найчастіше використовують широко розповсюджені в природі гени стійкості до антибіотиків. Білкові продукти цих генів, зазвичай ферменти, які модифікують антибіотики та інактивують їх дію. В основному використовують ген неоміцинфосфотрансферазу (ген *ntp II*), який інактивує антибіотик канаміцин. В присутності даного гену бактеріальна клітина набуває стійкості до канаміцину і на середовищі з цим антибіотиком утворює клон або колонію клітин. Клітини, які не містять ген *ntp II* на даному середовищі гинуть. Таким чином, присутність маркерного гену *ntp II* в

векторній конструкції дозволяє виявити ті клітини в яких присутній вектор і відібрати їх.

Вимоги до векторної молекули:

- 1) Вектор повинен мати унікальний сайт рестрикції для декількох рестриктаз, що дає можливим вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК.
- 2) Повинен мати генетичний маркер, який дозволяє знайти трансформовані клітини.
- 3) Вектор повинен мати унікальний сайт впізнавання рестриктазою в неіснуючій для реплікації області.
- 4) Повинен мати специфічні атрибути, для того щоб їх можна було використовувати, як клонуючі вектори.
- 5) Повинен мати певну ємкість і не абортувати вбудований фрагмент.
- 6) Вектор повинен реплікуватися в певних клітинах за рахунок послідовності точки початку реплікації (ори джин).

Потенційними векторами для рослинних організмів можуть бути:

- 1) Вектори, отримані на основі природніх рослинних векторів, здатних інтегруватися в геном рослини-хазяїна. Ti- та Ri- плазміни. (бактеріальні вектори).
- 2) Вектори, отримані на основі рослинних патогенів, які характеризуються природною здатністю до введення чужерідної ДНК в рослини (фіто віруси, віроїди).
- 3) Вектори, які можуть існувати, як незалежні реплікони в рослинних клітинах (мітохондріальна та хлоропластна ДНК).
- 4) Вектори, отримані на основі нестабільних компонентів геному рослин (транспозуємі елементи).