

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології
Кафедра біотехнології та біоінженерії

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти.

Миколаїв

2025

УДК 606:633/635

О-75

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВПШТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 16 квітня 2025 р., протокол № 8.

Укладачі:

Гиль М. І. – доктор с.-г. наук, професор, академік НАНВО України.

Посухін В.О. – асистент кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

Калиниченко Г. І. – кандидатка с.-г. наук, доцентка, голова науково-методичної комісії факультету кафедри технології виробництва продукції тваринництва Миколаївського національного аграрного університету;

Коломієць Ю.В. – д. с.-г.н., професор, декан факультету захисту рослин, біотехнології та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

ЗМІСТ

Лекція № 1 «Предмет, завдання і методологія біотехнології рослин»	4
Лекція № 2 «Культура клітин як біологічна система»	8
Лекція № 3 «Класифікація клітинних технологій рослин»	12
Лекція № 4 «Морфогенез та регенерація рослин у культурі <i>in vitro</i> »	15
Лекція № 5 «Культивування зародків <i>in vitro</i> . Запліднення <i>in vitro</i> »	21
Лекція № 6 «Одержання безвірусного садивного матеріалу»	27
Лекція № 7 «Генетична інженерія рослин»	30
Лекція № 8 «Проблеми біобезпеки та екологічної безпеки»	37
Список рекомендованої літератури	42

Лекція № 1 «Предмет, завдання і методологія біотехнології рослин»

План:

1. Предмет і завдання біотехнології рослин.
2. Історія розвитку біотехнології.
3. Зв'язок біотехнології з іншими біологічними та сільськогосподарськими дисциплінами.
4. Значення біотехнології рослин.

1. Предмет і завдання біотехнології рослин.

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 0,1 мм, яка практично не містить вірусів.

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.

2. Історія розвитку біотехнології.

Термін біотехнологія з'явився 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.

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 саморегульованих 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 інших антибіотиків шляхом глибинної ферментації. Культивування рослинних клітин, одержання вірусних вакцин, мікробіологічна трансформація стероїдів.
- IV. Ера керованого біосинтезу (1961-1975).** Виробництво бактеріальних поліцукрів, 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.

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 XX ст. Було зроблено ряд великих відкриттів, які вплинули на розвиток біотехнології. Великим успіхом стало створення іммобілізованих ферментів, що дозволило вирішити частину технологічних проблем.

3. Зв'язок біотехнології з іншими біологічними та сільськогосподарськими дисциплінами.

Біотехнологія як самостійна галузь знань і сукупність технологій у промисловому виробництві сформувалася за останні 30 років на основі фундаментальних досліджень в галузі фізіології, генетики, біохімії та молекулярної біології рослин.

Біотехнологія базується на досягненнях наступних наук:

- Молекулярна біологія.
- Мікробіологія.
- Вірусологія.
- Біохімія.
- Генетика.
- Фізіологія рослин.
- Клітинна біологія.

4. Значення біотехнології рослин. Значення біотехнології для рослинництва.

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 неродино-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 вірусу. Інший метод – це введення в рослину частини генетичного матеріалу вірусу, 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.

План:

1. Культура клітин як клонова популяція.
2. Культивування окремих клітин.
3. Довгостроково вирощувані (субкультивовані) культури.

1. Культура клітин як клонова популяція.

В основі клітинної інженерії лежить гібридизація соматичних клітин – злиття нестатевих клітин з утворенням єдиного цілого. Вона може бути повною або придбати окремі частини клітини-донора: цитоплазму, мітохондрії, хлоропласти, ядерний геном або його блоки. Культури клітин вищих рослин мають дві сфери застосування:

- вивчення біології клітини, що існує поза організмом, обумовлює провідну роль клітинних культур у фундаментальних дослідженнях по генетиці і фізіології, молекулярній біології і цитології рослин. Популяціям рослинних клітин властиві специфічні особливості: генетичні, епігенетичні (залежні від диференційованої активності генів) і фізіологічні. При тривалому культивуванні гетерогенної по цих ознаках популяції відбувається розмноження клітин, фенотип і генотип яких відповідає умовам вирощування, отже, популяція еволюціонує. Все це дозволяє вважати, що культури клітин є новою експериментально створеною біологічною системою, особливості якої поки що мало вивчені. Культури клітин і тканин можуть бути адекватною моделлю при вивченні метаболізму і його регуляції в клітинах і тканинах цілої рослини;
- культивовані клітини вищих рослин можуть розглядатися як типові мікрооб'єкти, достатньо прості в культурі, що дозволяє застосовувати до них не тільки апаратуру і технологію, але і логіку експериментів, прийнятих в мікробіології. Разом з тим, культивовані клітини здатні перейти до програми розвитку, при якій із культивованої соматичної клітини виникає ціла рослина, здатна до росту і розмноження. Існує декілька напрямків створення нових технологій на основі культивованих тканин і клітин рослин:
- отримання біологічно активних речовин рослинного походження;
- традиційних продуктів вторинного метаболізму (токсинів, гербіцидів, регуляторів росту, алкалоїдів, стероїдів, терпеноїдів, що мають медичне застосування);
- синтез нових сполук, що можливо завдяки початковій неоднорідності клітинної популяції, генетичній мінливості культивованих клітин і

селективному відбору клітинних ліній із стійкими модифікаціями, а в деяких випадках і направленому мутагенезу;

- культивовані в суспензії клітини можуть застосовуватися як мультиферментні системи, здатні до широкого спектру біотрансформацій хімічних речовин (реакції окислення, відновлення, гідроксилювання, метилування, деметилування, гліколізування, ізомеризації). В результаті біотрансформації отримують унікальні біологічно активні продукти на основі синтетичних з'єднань або речовин проміжного обміну рослин інших видів;
- прискорене клональне мікророзмноження рослин, що дозволяє з одного експланта отримувати від 10 000 до 1 000 000 рослин в рік, причому всі вони будуть генетично ідентичні;
- отримання безвірусних рослин;
- ембріокультура і запліднення *in vitro* часто застосовуються для подолання статевої несумісності або недорозвиненості зародка, для отримання рослин після віддаленої гібридизації. При цьому запліднена яйцеклітина видаляється із зав'язі з невеликою частиною тканини перикарпа і переноситься на поживне середовище. У таких культурах можна спостерігати і стадії розвитку зародка;

2. Культивування окремих клітин.

Окремі клітини культивують для отримання клонів, вивчення їх генетичної і фізіологічної мінливості або стабільності. Крім того, культивування окремих клітин дозволяє вивчати умови, що визначають виникнення стимулів до ділення у клітин, ізольованих від впливу інших клітин популяції або тканин. Окремі клітини важливі і для клонової селекції, гібридних і трансформованих ліній мутантів. Зазвичай, в такі клітини вводять маркерні гени, які дозволяють запроваджувати селекційні методи виведення нових сортів сільськогосподарських культур.

Крім того, окремі клітини можуть бути моделлю для порівняльного вивчення фізіологічних процесів в тканині і ізольованій клітині (для вивчення фотодихання можна порівнювати процес фотосинтезу на рівні окремих клітин мезофіла листка і цілої тканини).

Вирощування ізольованих клітин складається з двох етапів: ізолювання непошкодженої клітини рослинної або калусної тканини; створення умов, сприятливих для росту і розвитку ізольованої клітини.

На першому етапі необхідно виділити непошкоджену і життєздатну клітину з тканини цілої рослини або калусної тканини. Цього можна досягти шляхом обробки тканини пектиназами, що сприяє мацерації її клітин. Проте не завжди після такої обробки клітини зберігають здатність до подальших

ділень і утворення тканини. Краще отримувати окремі клітини із суспензійних культур або рихлого калусу. Ідеальними окремими клітинами є протопласти, що утворили клітинну стінку. Потім клітини ізолюють мікроманіпуляторами, або шляхом послідовних розведень. При перших же спробах культивування окремих клітин виникла проблема: як змусити ділитися клітини, ізольовані від впливу інших клітин популяції або тканин? Окремі клітини поводитися інакше, ніж їх скупчення у вигляді агрегатів в суспензії або калусній масі на поверхні поживного середовища.

При її вирішенні виникла гіпотеза про «фактор кондиціонування» (так було названо речовину, стимулюючу ділення окремих клітин). Встановлено, що цей чинник має хімічну природу, термолабільен, водорозчинний, низькомолекулярний, видонеспецифічний, не заміняє відомі фітогормони, синергічний із брассиностероїдами.

Клітину ізолюють за допомогою мікроманіпулятора з рихлого калусу безпосередньо на шматочок фільтру розміром 8 x 8 мм, поміщений на верхівку калусної тканини, з якої була взята клітина. Калус повинен знаходитися у фазі активного росту. Як «нянька» можна використовувати калусну тканину іншої рослини спорідненого роду. В цьому випадку клітини ростуть і діляться. У міру старіння «калусу – няньки» фільтр із клітинами переноситься на молодий калус. Коли тканина з клітини сягає розмірів 0,5-1 мм, її переносять безпосередньо на поживне середовище.

Інший метод «годуєчого шару» полягає в тому, що використовують суспензію клітин того ж виду, що і певна клітина близького виду. Клітинна суспензія повинна знаходитися в ранній експоненціальній фазі росту. У 1959 році Бергман запропонував фільтрувати суспензійну культуру (у його експериментах це були тютюн і квасоля) стерильно через один шар батисту (0,3 x 0,1 мм). В результаті отримували суспензію, на 90 % що складається з окремих клітин, змішаної з агаризованим поживним середовищем того ж складу, що використовувався при культивуванні суспензії (середовище містило 0,6% агару). Суміш розливали тонким шаром (1 мм) в чашки Петрі. Агар розділяв клітини, але не перешкоджав обміну хімічними сигналами між ними, а товщина шару дозволяла спостерігати за їх поведінкою під мікроскопом.

Індукція ділень окремих клітин можлива при застосуванні дуже багатого поживного середовища (середовища Као і Михайлюка). При цьому об'єм середовища, в яке переносять клітини, повинен бути мінімальним (мікрокраплі об'ємом до 20 мкл).

Всі ці способи культивування дозволяють клітині «відчувати» фактор кондиціонування. Він або виробляється в достатній кількості клітинами

«годууючого шару», «тканини – няньки», або міститься в суспензії, де раніше культивувалися клітини, або розбавляється у великому об'ємі середовища.

Таким чином, фактор, що викликає ділення клітин, виробляється самими клітинами, але в невеликій кількості. Збільшувати число клітин, що його виробляють можна до тих пір, поки він не розбавляється у великих об'ємах поживного середовища, або ж зменшувати його об'єм, в якому вирощуватиметься клітина, змусивши її ділитися.

3. Довгостроково вирощувані (субкультивовані) культури.

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

У циклі вирощування калюсні клітини після низки поділів проходять нормальний онтогенез: ростуть розтягуванням, диференціюються та деградують (відмирають). Зростання каллюса відбиває S-подібну криву. Ростовий цикл починається з посадки експланту на середу (початок культивування), а завершується в момент припинення мітозів (стаціонарна фаза).

У лагфазі (латентній фазі) клітини не діляться, не збільшуються у розмірі мають низьку метаболічну активність. В експоненціальній фазі (фазі логарифмічного зростання) клітини активно діляться мітозом. У ранній експоненті збільшується кількість мітохондрій (синтезується АТФ), рибосом, всіх видів РНК, синтезуються білки, активізується метаболізм, інтенсивно поглинається кисень. Пізня експонента, чи фаза латентного зростання, характеризується зниженням питомої швидкості зростання, уповільненням клітинного поділу, збільшенням середнього розміру клітин з допомогою розтягування. У стаціонарній фазі розмір клітин продовжує збільшуватися, а їх поділ припиняється. У пізній стаціонарній фазі (фаза деградації) за рахунок виснаження середовища клітини старіють та вмирають. Тривалість ростового циклу калюсних клітин становить 21-28 днів.

У процесі культивування каллюс пасерують (пересаджують на свіже живильне середовище) кожні 4-6 тижнів. Маса транспланта (фрагменту тканини, який пасерують на свіже живильне середовище) становить 60-100 мг на 20-40 мл середовища. Середовище для індукції первинного каллюсогенезу та культивування пересадкової каллюсної культури відрізняється за вмістом фітогормонів. Т. до. калюсні клітини в пересадочній культурі здатні самостійно синтезувати ауксини, їх вміст у середовищі культивування зменшують.

Лекція № 3 «Класифікація клітинних технологій рослин»

План:

1. Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції.
2. Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу.
3. Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин.

1. Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції.

Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції пов'язані зі зміною генотипу дочірніх рослин у порівнянні з вихідними.

До цієї групи належать:

1. Культура калусної тканини – культивування калусу в умовах *in vitro* з метою одержання соматоклональних варіантів.

Соматоклональна варіабельність (мінливість) – зміна спадкової інформації в процесі культивування клітин і тканин в умовах *in vitro*.

Головні причини виникнення соматоклональних варіантів:

- 1) генетична гетерогенність клітин вихідного експланту;
- 2) генетична та епігенетична мінливість, індуковані умовами культивування.

Внаслідок соматоклональної варіабельності у клітинах рослин виявлено зміни:

- 1) рівня плоідності (поліплоїдія);
- 2) кількості хромосом (анеуплоїдія);
- 3) структурні зміни хромосом (делеції, дублікація, транслокації, інверсія);
- 4) зміни мітохондріальної і пластидної ДНК.

Соматоклональні варіанти можуть відрізнятися від вихідних рослин за такими ознаками:

- 1) біохімічними;
- 2) якісними;
- 3) кількісними.
2. Мутагенез *in vitro* – це процес виникнення спадкових змін у клітинах рослин, що культивують *in vitro*, під дією мутагенів.

Виділяють види мутагенезу:

- 1) природний (спонтанний) – виникає під впливом чинників зовнішнього середовища і фізіолого-біохімічних змін у самому організмі;
- 2) штучний (індукований) – спричинюється мутагенами.

Мутагени бувають:

- 1) фізичні:

- a) електромагнітне іонізуюче випромінювання (космічні, рентгенівські і гама-промені);
 - b) корпускулярне іонізуюче випромінювання (альфа-, бетачастини, протони, нейтрони);
 - c) ультрафіолетові промені.
- 2) хімічні (колхіцин, аналоги азотистих основ ДНК – 5- бромурацил, 5-фторурацил);
 - 3) біологічні (віруси, плазмід, транспозони, ДНК).

2. Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу.

- 1. Клональне мікророзмноження** – одержання в культурі *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідній рослині.

Якщо як експлант використовується апікальна меристема невеликого розміру (до 0,2 мм), можна одержати безвірусні рослини.

- 2. Культивування зародків *in vitro* (ембріокультура)** – передбачає вирощування в культурі *in vitro* зародків, попередньо ізольованих із дозрілого (нормально сформованого) або з недозрілого (на ранніх стадіях розвитку) насіння.

Культура зародків з дозрілого насіння використовується для:

- 1) прискореного отримання рослин з насіння, що погано або зовсім не проростає;
- 2) виведення зародку із стану спокою, що починається під час дозрівання насіння на рослині.

Культура зародків з недозрілого насіння використовується для:

- 1) подолання нежиттєздатності зародків, коли живильне середовище замінює ендосперм (одержали гібриди ячменю і жита, кукурудзи і сорго);
 - 2) селекції ранньостиглих сортів, коли плід досягає раніше ніж зародок;
 - 3) експериментального мутагенезу.
- 3. Запліднення *in vitro*** допомагає здолати труднощі, що виникають внаслідок невідповідності репродуктивних органів схрещуваних рослин невідповідність. Як експланти використовують зав'язі, насінневі зачатки, які висаджують на живильне середовище. Через 2-3 дні «підсівають» пилок, відбувається запліднення, розвивається насінина, з якої у пробірці, минаючи стадію спокою, формується рослина.
 - 4. Культура пиляків та пилку** – розвиток зародку з пилку в умовах *in vitro*. Отримуються гаплоїдні рослини, у яких можна подвоїти кількість хромосом і отримати гомозиготні диплоїди, які використовують у гетерозисній селекції.

5. **Кріозберігання** – це збереження генофонду рослин при глибокому охолодженні рідким азотом (-196 0 C). Як матеріал для заморожування використовують бруньки, меристеми, зародки, клітини, протопласти. Метод використовують для створення банків генетичних ресурсів рослин.

3. Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин.

Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин – вирощування в біореакторах клітин рослин з метою одержання біологічно активних речовин. Так отримані мутантні клітинні лінії раувольфії зміїної – продуценту індольних алкалоїдів, які містять в 10 разів більше цінного для медицини антиритмічного алкалоїду – аймаліну; дискореї дельтовидної – продуценту диогеніну, який використовується для синтезу гормональних препаратів; отриманий штам рути пахучої, який містить в 220 разів більше алкалоїду рутакридона, ніж в самій рослині; із суспензійної культури наперстянки шорсткої, яка містить серцевий глікозид –дигитоксин, отримали більш якісну форму – дигоксин – для використання в медицині; із суспензійної культури м'яти отримали ментол для трансформації пулегона і ментола.

Лекція № 4 «Морфогенез та регенерація рослин у культурі *in vitro*»

План:

1. Тотипотентність рослинних клітин.

2. Основні механізми регенерації рослин.
3. Типи вторинної диференціації та морфогенезу.
4. Індукція морфогенезу за допомогою фітогормонів. Отримання рослин-регенерантів.

1. Тотипотентність рослинних клітин.

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 ізольовані протопласти *in vitro*.

Перевагою останнього підходу є можливість для науковця самому вибирати 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 перепрограмується 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 ізольованих рослинних тканин і клітин. Практично всі тканини при ізольованні 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 ізольованих 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.

2. Основні механізми регенерації рослин.

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.

3. Типи вторинної диференціації та морфогенезу.

Диференціація клітин рослин *in vitro* може проходити різними шляхами і в різному ступені – 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 з перетворення їх в апекси стебел або коренів, флоральні елементи.
- Соматичний ембріогенез (біполярні структури) – це утворення в калусній або суспензійній культурі ембріодів, тобто зачатків інтактної 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 ізольованої 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, ізольованих по направленню 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 ендogenous фактори.

4. Індукція морфогенезу за допомогою фітогормонів. Отримання рослин-регенерантів.

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 цитокинінів (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 (химерних) 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 запобігання 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 утворення кореневої системи у рослин-регенерантів, який можна стимулювати декількома шляхами:

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

Лекція № 5 «Культивування зародків *in vitro*. Запліднення *in vitro*»

План:

1. Статеве розмноження рослин.
2. Несумісність та її генетичні основи.
3. Культура ізольованих зародків (ембріокultura).
4. Запліднення *in vitro*. Подолання стерильності за віддаленої гібридизації.

1. Статеве розмноження рослин.

Статевим називають такий тип розмноження, при якому нові особини утворюються внаслідок статевого процесу, суть якого полягає у взаємній асиміляції (злитті) двох фізіологічно неоднорідних клітин. Через це

утворюється нова клітина – зигота. При цьому зливаються вміст цитоплазми і ядра клітин, а хромосоми об'єднуються в ядрі зиготи, і тому її ядро має кількість (набір) хромосом вдвоє більшу, ніж в ядрах клітин, що зливаються. Кожна хромосома в ядрі зиготи зберігає свою індивідуальність.

У зиготі об'єднується спадковий матеріал двох генетично нетотожних батьків. Це і є біологічною суттю статевого процесу, який забезпечує появу генетично різноманітнішого потомства з ознаками материнського і батьківського організмів. Нащадки, які утворюються внаслідок статевого процесу, більш життєздатні і краще пристосовані до різних умов. Після деякого періоду спокою клітина зиготи ділиться і дає початок новій особині.

Статевий процес виник у рослин на певному етапі історичного розвитку, можливо, спочатку як живлення, поїдання особинами одна одної. З часом дві клітини вступали в симбіоз, який надалі дав початок статевому процесу. З'явившись, статевий процес ускладнювався. Паралельно з еволюцією рослин удосконалювались його типи і форми.

Різнорманітність форм статевого процесу можна об'єднати у два типи: гаметогамию і агаметогамию. Суть першого, більш досконалого, полягає в злитті спеціалізованих зачатків – гамет; для другого характерне злиття гаплоїдних соматичних клітин, а не спеціалізованих гамет.

У більшості насінневих рослин чоловічі гамети в процесі еволюції втратили джгутики і здатність самостійно рухатись, їх називають сперміями.

2. Несумісність та її генетичні основи.

Під несумісністю розуміють нездатність пилкових трубок життєздатних пилових зерен проростати через стовпчик і зав'язь у зародковий мішок і забезпечувати подвійне запліднення, при самозаплідненні (самонесумісність) або при запиленні пилом рослин інших видів і родів (перехресна несумісність). Як самонесумісність, так і перехресна несумісність генетично детерміновані.

Основна функція самонесумісності – попередження самозапилення (інбридінгу) і забезпечення перезапилення між неспорідненими особинами одного виду (аутбридінгу).

Відомі три основні типи генетичної самонесумісності: гаметофітний, спорофітний і гетероморфний.

Гаметофітна самонесумісність вперше була встановлена у тютюну виду *Nicotiana sanderae*, тому її називають несумісністю типу *Nicotiana*. При цьому типі несумісності пригнічується проростання пилку і ріст пилових трубок на приймочці маточки і в стовпчику. Вона зумовлена серією алелей гена S. При цьому жоден із алелей не виявляє домінування або іншого типу взаємодії.

Диплоїдні тканини маточки містять два алелі гена несумісності S1 S2. Гаплоїдне пилокве зерно містить алель S1 або S2. Ріст таких пилкових трубок буде пригнічуватися алелями, наявними у маточці. Це виявляється в тому, що пилові зерна або не утворюють трубок, або пилові трубки ростуть повільно і припиняють свій ріст, не досягнувши мікропіле. При перехресному запиленні частина пилових зерен, які несуть алелі S3, S4, S5, будуть нормально проростати на приймочці маточки і забезпечать запилення. Гаметофітна несумісність контролює перехресне запилення у видів конюшини (*Tr. pratense*, *Tr. repens* та інших), у донника лікарського (*Melilotus officinalis*), у жита (*Secale cereale*), у буряка (*Beta vulgaris*) та ін.

Спорофітна несумісність також контролюється системою множинних алелей, але визначається генотипом рослин, яка запилюється. У цьому випадку виявляється домінування одного алеля над іншим. Наприклад, якщо алель S1 домінує над алелем S2, то пилок рослини S1 S2 матиме несумісність з маточками рослин, які мають алель S1. Якщо материнська рослина має генотип S2 S3, то на його приймочках будуть проростати пилові зерна рослин з генотипом S1S1 і S1S2. Спорофітний тип несумісності властивий рослинам, які мають пилові зерна з трьома ядрами (представники родин складноцвітих, хрестоцвітих).

Гетероморфна несумісність з'являється у гетеростильних рослин – гречки, первоцвіту, деяких видів льону. У гетеростильних рослин із генотипом ss або aa, квіти містять маточку із довгим стовпчиком (довгостовпчасті), а рослини Ss або Aa – з коротким. За такого типу несумісності зав'язування насіння відбувається лише у випадку, якщо пилок довгостовпчикових квітів (ss) запилить приймочки маточок короткостовпчикових квітів (Ss). Половина нащадків від такого схрещування будуть складати рослини з довгостовпчастими квітками, і половина – із короткостовпчастими.

Разом із тим зустрічаються рослини із стовпчиками трьох типів – довгим, середнім і коротким. Довжина стовпчика в цьому випадку визначається більш складно: довгі – mmss, середні – MMss або Mmss, і з коротким MMSS, MMSs, MmSs, або mmSs, mmSS.

3. Культура ізолюваних зародків (ембріокультура).

В біотехнології рослин існують і інші напрями досліджень, які вже знайшли практичне використання. Для основних культурних видів розроблені умови вирощування рослин в ембріокультурі – в культурі незрілих, недорозвинених, гібридних зародків для їх дорощування та пророщування. Ембріокультура – це культура зиготичних або соматичних зародків рослин *in vitro*. Для отримання ембріокультури зародки ізолюють і культивують на

штучному живильному середовищі для дорощування, тобто, стимулюють проходження всіх необхідних стадій ембріогенезу, дозрівання або проростання. Для ініціації ембріокультури можуть використовуватися зародки від самих початкових стадій розвитку, сформовані зародки, які мають всі необхідні органи і потребують лише дозрівання, а також зрілі зародки. Інколи, для формування та дозрівання зародків їх не видаляють, а дорощують в культивованих *in vitro* запліднених зародкових мішках, молодих насінинах або плодах. Склад живильного середовища для ембріокультури розрізняється залежно від генотипу і виду рослини, а також значно залежить від ступеня сформованості зародка. Так, в ранньому ембріогенезі необхідним є додавання фітогормонів і інших рістрегулюючих речовин. Для культури сформованих і зрілих зародків, як правило, використовують прості безгормональні середовища зі зниженим вмістом сахарози та зменшеним вдвічі вмістом макро- і мікросолей.

Для орхідних актуальним є пророщування насіння в культурі *in vitro*, а для інших культур розроблені технології штучного запилення, запліднення та ембріогенезу в культурі *in vitro*. Ембріокультура широко використовується, коли в насінинах утворюються зародки, але за різних обставин не розвивається ендосперм. На рослині такі насінини і такі зародки не розвиваються, а гинуть через відсутність живлення. Ізолювання та експлантація на живильне середовище дозволяють забезпечити їх всіма необхідними речовинами та отримати з них рослини.

Широко застосовується ембріокультура для отримання міжвидових та міжродових гібридів, оскільки при віддалених схрещуваннях часто вдається отримати зародки, але не розвивається ендосперм. Цей підхід поширений в селекції плодових культур, злаків, зокрема, тритікале, та інших рослин. Ембріокультуру використовують для дорощування «нежиттєздатних» зародків, пророщування незрілих зародків для отримання додаткових генерацій протягом року і скорочення таким чином тривалості селекційного процесу, для збереження цінних генотипів у вигляді ізольованих зародків на холоді, для дослідження процесів накопичення запасних речовин в зародках залежно від складу живильного середовища, генотипу, віку та інших факторів.

4. Запліднення *in vitro*. Подолання стерильності за віддаленої гібридизації.

Техніка штучного запліднення у рослин *in vitro* складається з наступних етапів: ізолювання зародкових мішків і яйцеклітин, ізолювання сперміїв, злиття гамет *in vitro*, культивування зигот та зиготовміщуючих зародкових мішків, культивування молодих зиготичних зародків.

Для ізоляції зародкових мішків і яйцеклітин сім'язачатки відділяють від зрілих суцвіть, в яких ще не відбулося запліднення. На наступному етапі їх інкубують у живильному середовищі, доповненому мацеруючими ферментами целюлазою, пектиназою, пектоліазою або мацерозимом. Ці ферменти розщеплюють клітинні оболонки в оточуючих тканинах, після чого зародкові мішки та яйцеклітини можна видалити тонкими голками. Для ізоляції спермій використовують рН-шок, за дії якого цитоплазма вегетативної клітини пилкового зерна, генеративна клітина або спермії виходять через апертуру. Після виходу з пилкового зерна *in vitro* в ізольованих сперміях відбувається збільшення синтезу ДНК і білка, що вказує на їх активацію.

Ізольовані гамети самі по собі становлять значний інтерес для експериментального вивчення постгамної фази запилення, подвійного запліднення, ембріогенезу та ендоспермогенезу. Гамети рослин не містять целюлозної оболонки і є істинними протопластами, що дозволяє використовувати їх в програмах з генетичної інженерії. Ізольовані гамети також використовують для запліднення *in vitro*. Для цього нерухомі жіночі гамети рослин – яйцеклітину та центральну клітину зародкового мішка, приводять в контакт з чоловічими гаметами-сперміями і створюють умови для їх об'єднання шляхом електрозлиття або хімічним методом в мікрокраплинах живильного середовища, яке вміщує іони кальцію, або шляхом мікроін'єкцій спермій у жіночі гамети. Розвиток зародка із зигот, отриманих від запліднення *in vitro*, в цілому відповідає перебігу ембріогенезу відповідного виду рослин *in vivo*. Для окремих видів рослин отримано розвиток ендосперму після штучного злиття центральної клітини зародкового мішка і спермія.

Головна мета віддаленої гібридизації полягає в поєднанні корисних ознак, які мають різні види, роди.

Важливі дослідження з віддаленої гібридизації здійснив І.В.Мічурін. Він схрещував різні види плодових (яблуню і грушу, сливу і абрикос, вишню і сливу, грушу і горобину), овочевих (гарбуз і огірки, гарбуз і диня та ін.).

Академік М.В.Цицин займався проблемою віддаленої гібридизації майже 50 років. Його гібриди – пшениця і пирій, пшениця і житняк, жито і пирій та інші – є цінними формами.

Науковий і практичний інтерес мають гібриди соняшнику і топінамбура, пшениці м'якої і твердої, пшениці і жита, пшениці і ячменю та ін. Віддалені гібриди мають внутрішньовидові переваги, вони стійкі проти несприятливих умов, хвороб і шкідників.

Проте віддалена гібридизація пов'язана з великими труднощами: несхрещуваність, висока самостерильність, низька фертильність, занижена врожайність, якість продукції.

Серйозною проблемою в одержанні насіння за віддалених схрещувань є різниця в кількості хромосом різних видів і родів рослин. Наприклад, пилок і яйцеклітина жита мають гаплоїдну (одинарну) кількість хромосом – 7, а пшениця тверда – 14. У різних видів картоплі набір хромосом: 24, 48, 60, 72.

Для подолання несхрещуваності видів з різною кількістю хромосом застосовують метод штучного збільшення плоїдності хромосом в однієї з батьківських форм. У селекції з дикими видами несхрещуваність можна подолати методом біотехнології, суть якої полягає в дорощуванні заплідного зародка під час штучного живлення.

Подолати несхрещуваність культурних видів з дикими допомагає метод містків (посередників).

Схрещування різних видів багаторічних культур (яблуня, груша та ін.) вдається виконати способом попереднього вегетативного зближення, який розробив І.В.Мічурін. Суть цього способу полягає в тому, що схрещуваний вид прищеплюють у крону материнської форми. Коли прищепа утворює квітки, їх запилюють пилом, зібраним з підщепи.

Значне місце для подолання несхрещуваності за віддаленої гібридизації займають прості способи: регулювання запліднення середовищем (температура, вологість, освітленість); стимулювання запліднення біостимуляторами; стимуляція пилку батьківської форми пилом материнської форми; спосіб змішування пилку з декількох батьківських форм.

Ускладнює віддалену гібридизацію те, що з одержаного насіння виростають гібриди (рослини), які нездатні відтворювати потомство через стерильність. Для того, щоб такі гібриди давали насіння, доводиться застосовувати протягом 1–2 років штучне запилення пилом однієї з батьківських форм (частіше материнських). Цей метод наближається до бекросу, дає позитивні результати, гібриди від віддалених схрещувань стають фертильними (плодовитими).

Гібридне насіння від віддалених схрещувань дрібне, щупле, з недорозвиненим зародком, в першому поколінні воно практично сходів не дає. Для підвищення якостей таке насіння пророщують у живильному середовищі в пробірці або в чашках Петрі з наступним пересаджуванням у відкритий ґрунт.

Віддалена гібридизація, не зважаючи на значні недоліки в її застосуванні, відкриває дуже широкі можливості перед вченими для створення нових видів і форм рослин.

Слід визнати, що провідне місце в науці про віддалену гібридизацію належить І.В.Мічуріну (плодові, ягідні культури, виноград), В.М.Лебедєву, В.Є.Писареву, А.Ф.Шуліндіну (гібридизація пшениці і жита), С.М.Букасову, О.Н.Камеразу, І.Г.Пушкарьову (міжвидова гібридизація картоплі), Г.В.Пустовойту (міжвидова гібридизація соняшнику), М.В.Цицину (віддалені пшенично-пирійні гібриди), П.Г.Альсміку (віддалена гібридизація картоплі), Ф.Г.Кириченку (міжвидова гібридизація м'якої і твердої пшениці), П.Г.Голодризі (міжвидова гібридизація винограду), Х.К.Доскалову (міжвидова гібридизація томатів), Г.Д.Карпеченку (міжвидова гібридизація капусти).

Лекція № 6 «Одержання безвірусного садивного матеріалу»

План:

1. Загальна характеристика вірусів рослин.
2. Шкодочинність вірусних хвороб сільськогосподарських культур.
3. Культура апікальних меристем рослин *in vitro*.
4. Термотерапія. Хемотерапія.

1. Загальна характеристика вірусів рослин.

Віруси представлені дуже дрібними частками і за рідкісним виключенням їх не видно у світловий мікроскоп. Віріони не є клітинами. Розмір вірусів не є ознакою, яка однозначно їх відрізняє від живих організмів, – найбільш великі віруси мають розмір, що перевищує 400 нм; в той же час деякі рикетсії мають клітини розміром 200×400 нм, мікоплазми і хламідії мають діаметр 150–350 нм. Таким чином, розмір великих вірусів перевищує розмір цих прокаріотичних паразитів.

Віруси мають геном, що містить гени. Геном усіх живих організмів представлений дволанцюговою ДНК, проте геном вірусів може бути представлений як ДНК, так і РНК, причому нуклеїнова кислота може бути у одноланцюговій або дволанцюговій формі. У загальному випадку геном вірусів набагато менше генома живої клітини.

Віруси є паразитами. Віруси відрізняються від клітин способом розмноження. Нові клітини завжди виникають безпосередньо з передіснуючих клітин, але нові віріони вірусу ніколи не утворюються безпосередньо з передіснуючих віріонів. Нові віріони утворюються в процесі реплікації, який протікає усередині клітини-хазяїна і включає синтез компонентів віріона, за яким йде їх збирання в готовий віріон. Таким чином, віруси є паразитами клітин, які залежать від своїх хазяїв у більшості своїх потреб. Клітина надає вірусу будівельні блоки, такі як амінокислоти і нуклеотиди; механізми синтезу білку (рибосоми) і енергію у вигляді аденозинтрифосфату (АТФ).

2. Шкодочинність вірусних хвороб сільськогосподарських культур.

Вірусні хвороби дуже поширені серед окремих видів рослин, вони здатні призвести до зниження врожаю приблизно на 20% і більше. Особливо небезпечні вірусні хвороби для видів рослин, що вегетативно розмножуються, оскільки, потрапивши у рослину, віруси передаються з садивним матеріалом наступним поколінням. Потрапляють віруси до рослини найчастіше з комахами-переносниками – попелицями та жуками. Повністю позбавити садивний матеріал від вірусів методом термотерапії неможливо, оскільки віруси починають гинути лише при температурах вище 55°C, що одночасно призводить і до загибелі самої рослини.

3. Культура апікальних меристем рослин *in vitro*.

Рослина має верхівкову та бічні пазушні апікальні меристеми, які навіть в ураженій рослині лишаються вільними від вірусів, оскільки ростуть швидше, ніж віруси поширюються вздовж рослинного організму. Для отримання оздоровлених рослин апікальну меристему розміром 200-250 мкм в стерильних умовах видаляють з верхівкових або бічних бруньок та експлантують на живильне середовище, склад якого є індивідуальним для кожного виду і навіть сорту рослин. Впродовж місяця з меристеми виростає маленька рослинка, яка містить стебло з листками, в пазусі кожного листка бруньку та корені. Отримані таким чином рослини перевіряють на відсутність вірусів методами серологічної діагностики. На наступному етапі безвірусні меристемні рослини мікроклонально розмножують шляхом активації

пазушних бруньок через мікроживцювання. Для цього меристемну рослину в стерильних умовах розрізають на живці, кожен з яких містить ділянку стебла з листком та брунькою в пазусі листка. Коли з живців виростають рослини, стерильне живцювання повторюють, в цілому до п'яти разів. Таким чином вдається дуже швидко розмножити вихідні, безвірусні меристемні рослини на безліч стерильних копій. У картоплі, якщо збільшити в середовищі вміст сахарози, на коренях оздоровлених меристемних рослин прямо у пробірці починають утворюватися мікробульби. Безвірусні пробірочні рослини та мікробульби пересаджують для подальшого розмноження в теплиці, а потім в польові умови. На етапі тепличного вирощування також застосовують різні прийоми мікророзмноження. Для картоплі це живцювання *in vivo* з наступним укоріненням, підкопування та видалення мінібульб для стимуляції утворення нових бульб тощо. При вирощуванні отриманого безвірусного садивного матеріалу у ґрунті дуже важливо дотримуватися санітарних заходів, спрямованих на запобігання ураження попелицями та іншими комахами, які виступають переносниками нових вірусів в оздоровлений матеріал. Для цього герметизують теплиці, організовують передбанники при вході і виході з теплиці, проводять інсектицидну обробку теплиць. В полі посіви безвірусної картоплі розмішують подалі від картоплесховищ та посівів картоплі, чергують їх зі стежками із злакових трав. Наприкінці липня на «насінневих» посівах картоплі скошують бадилля. Цей прийом запобігає повторному ураженню попелицями, у яких саме в цей період розпочинається масовий літ. Необхідна кількість «насінневих» бульб стандартного розміру у цей час під кущем картоплі вже сформована і скошування бадилля не призводить до втрати садивного матеріалу.

4. Термотерапія. Хемотерапія.

Метод термотерапії полягає у дії критичних температур на віруси та бактерії, які містяться у рослинному матеріалі. Термотерапія може проводитись як *ex vitro*, так і в умовах *in vitro*. Високі температури руйнують РНК та білкові оболонки вірусів, зумовлюючи втрату їх інфекційної здатності.

Рослини, які піддаються термотерапії поміщують у спеціальні термокамери, де протягом першого тижня підвищують температуру кожного дня на 2 С, доводячи її до 37 С. Важливо підтримувати також інші умови у термокамерах – інтенсивність освітлення, тривалість фотоперіоду та відносну вологість не менше 90%.

Тривалість термотерапії залежить від термостійкості вірусу та виду рослини. Але у випадку зараження веретеноподібними, мозаїчними,

ниткоподібними вірусами термообробка має низьку ефективність. У цьому випадку її краще комбінувати разом із культурою апікальних меристем.

Застосування термотерапії разом із культурою меристем дозволяє оздоровити від вірусів більше 90% рослин-регенерантів суниці, 50% – малини, 25% – червоної та чорної смородини.

Хіміотерапія, тобто, обробка хімічними речовинами поверхні рослинних об'єктів, не приносить користі, оскільки при інфікуванні вірусна нуклеїнова кислота опиняється усередині клітини і не підпадає під дію хімічних агентів, які стерилізують виключно поверхню.

Лекція № 7 «Генетична інженерія рослин»

План:

1. Способи перенесення генів в реципієнтні клітини.
2. Ідентифікація рекомбінантних клонів.
3. Експресія трансформованих генів і способи її оптимізації.
4. Стан та перспективи генно-інженерних досліджень рослин.

1. Способи перенесення генів в реципієнтні клітини.

Генетична інженерія рослин являє собою унікальну можливість цілеспрямованого збільшення генетичного різноманіття, коли до геному рослини вноситься конкретний сторонній ген або гени, спрямовано змінюється її геном для поліпшення тієї чи іншої функції. Генетична інженерія забезпечує спадкове удосконалення рослини і завжди має практичний вихід у селекцію. Генетично-інженерні дослідження закінчуються створенням нового сорту, лінії, гібрида тощо, які мають бути зареєстровані як інтелектуальна власність.

Існують два основні способи перенесення сторонньої ДНК у рослинну клітину: *Agrobacterium*-опосередкована трансформація та біолістична трансформація.

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація** рослин основана на використанні грамнегативних бактерій роду *Agrobacterium* (родина *Rhizobiaceae*, відділ *Gracilicutes*) – широко розповсюджених ґрунтових бактерій. Цей спосіб перенесення ДНК є найбільш ефективним для дводольних рослин, хоча в останні роки здійснені успішні спроби адаптувати його для застосування на однодольних. До участі у генетичній трансформації зазвичай залучаються два види – *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Обидва види агробактерій несуть велику Ті-плазмиду, частину якої (Т-ДНК) агробактерія за попадання на пошкоджену поверхню ураженої рослини переносить в геном рослинної клітини.

Вважається, що специфічність щодо вбудовування ТДНК в геном рослинної клітини відсутня, і Т-ДНК може вбудовуватися в будь-яку хромосому і будь-яку ділянку на хромосомі, але переважно у ділянки з підвищеною транскрипційною активністю. Процес переносу Т-ДНК у рослинну клітину можна поділити на наступні етапи: прикріплення агробактерії до рослинної клітинної стінки, проникнення Т-ДНК усередину рослинної клітини, інтеграція Т-ДНК в геном рослини та експресія генів Т-ДНК.

Бактерії прикріплюються до рослинних клітин в місцях пошкодження. Сайтами зв'язування на поверхні бактерій, як вважають, є молекули β -глюкану та О-антигенного ланцюгу ліпополісахариду зовнішньої мембрани.

У прикріпленні агробактерії до рослинної клітинної стінки суттєву роль відіграють гени *chvA*, *chvB* та *pscA*, розташовані на бактеріальній хромосомі. Клітинна стінка рослини ушкоджується внаслідок виділення бактеріями пектолітичних ферментів, що забезпечує тісний контакт бактерій з плазмалемою рослинної клітини. Цей контакт необхідний для передачі ДНК від бактерій в рослинну клітину. Передача ДНК відбувається без порушення цілісності мембрани рослинної клітини, але потребує певного її стану – компетентності.

Індукція початкових етапів *Agrobacterium* опосередкованої трансформації може відбуватися лише у місці пошкодження рослини, де виділяються аттрактанти – низькомолекулярні сполуки ацетосирінгон, глюкоза, глюкуронова кислота, де закислоється середовище. Процес вирізання та інтеграції Т-ДНК в рослинну хромосому здійснюють продукти генів, локалізованих у *vir*-районі Тіплазмиди. Вважають, що перенесення Т-ДНК відбувається подібно до кон'югативного переносу ДНК у бактерій. Сама

бактеріальна клітина в рослинну клітину не проникає, а лишається у міжклітинному просторі. Вона використовує рослинні клітини з вбудованою Т-ДНК як фабрику для виробництва специфічних органічних сполук опінів – джерела нітрогену та карбону, необхідних для бактеріальної клітини.

Т-ДНК Ті-плазміді є майже ідеальним вектором для введення сторонніх генів в геном рослинної клітини через широке коло рослин-господарів агробактерій та особливий спосіб успадкування. Інтегрована у геном рослини Т-ДНК успадковується домінантно за законами Менделя, а її гени мають власні промотори, під контролем яких можуть експресуватися вставлені в Т-ДНК сторонні гени.

Для використання в генній інженерії рослин Т-ДНК видаляють з Ті-плазміді за допомогою рестриктаз та вбудовують в один зі стандартних плазмідних векторів для клонування сегменту Т-ДНК в клітинах *E. coli* – плазмиду рBR322. Бактерії, які містять плазмиду рBR322 з ділянкою ТДНК, розмножують, після чого плазмиду виділяють. На наступному етапі, з використанням рестриктаз у Т-сегмент вбудовують цільовий сторонній ген, який необхідно передати рослині. Отриманий молекулярний гібрид знову розмножують в клітинах кишкової палички, а потім вводять у клітини агробактерії, яка несе відповідну повну (інтактну) Ті-плазмиду. В результаті гомологічної рекомбінації між Тсегментами нативної і сконструйованої Ті-плазміді Т-ДНК з вбудованим стороннім геном включається в Ті-плазмиду, заміщуючи нормальну Т-ДНК. Таким чином, отримують клітини *A. tumefaciens*, які несуть Ті-плазмиду з вбудованим у Т-ДНК цільовим геном. Далі рослинні тканини або ізольовані клітини інфікують цими генетично модифікованими агробактеріями шляхом кокультивування (спільного культивування на живильному середовищі). Агробактерії передають у рослинний геном Т-ДНК з вбудованим цільовим геном. Рослинні клітини, тканини і регенеровані з них цілісні рослини стають генетично модифікованими.

Для спрощення наведеної вище процедури запропоновано використовувати так звані **бінарні вектори**. Для цього клітина агробактерії повинна містити як найменше дві різні модифіковані Ті-плазміді. Одна з них, плазміда-помічник, несе тільки *vir*-район, гени якого будуть приймати участь у вирізанні Т-ДНК. Інша Ті-плазміда вміщує сегмент Т-ДНК з вбудованим цільовим геном. Продукти *vir*-генів здатні вирізати Т-ДНК як на власній плазміді, так і на сусідній, тобто *vir*-гени можуть працювати незалежно від їх місцезосташування. Якщо агробактерії разом містять Ті-плазмиду з областю *vir* та іншу плазмиду з Т-ДНК, до якої вбудовано цільовий ген, вони здатні трансформувати клітини рослин.

2. Ідентифікація рекомбінантних клонів.

Індивідуальний **клон рекомбінантної ДНК** представляє лише невелику частку геному донорного організму або тільки одну із тисяч мРНК, які синтезує донорний організм. Зазвичай, започатковують колекцію усіх сегментів ДНК геному, які можливо отримати за дії ферментів рестрикції. Зокрема, всю геномну ДНК розділяють на сегменти, розміри яких визначаються конкретним вектором для клонування, і вставляють кожний у різні копії вектора, створюючи тим самим колекцію рекомбінантних молекул ДНК. Взяті усі разом, вони представляють цілий геном. Потім ці молекули шляхом трансформації або трансдукції вводять в окремі реципієнтні клітини бактерій, де вони ампліфікуються. Така колекція клітин бактерій або бактеріофагів, які несуть рекомбінантні ДНК, називається геномною бібліотекою. Якщо використовується вектор для клонування, який акцептує вставку у середньому 10 тис.п.н. і якщо весь досліджуваний геном має довжину 100000 тис.п.н., що відповідає розміру генома нематоди *Caenorhabditis elegans*, то весь геном буде представлений 10000 окремими рекомбінантними клонами ДНК. Для впевненості у тому, що всі нуклеотидні послідовності геному представлені у колекції, геномні бібліотеки створюють таким чином, щоб кожний сегмент геному був повторений до 5 разів. Тотальне клонування всіх виділених фрагментів ДНК також називається шот-ган експериментом (shot-gun experiment).

Знаходження конкретного клону у бібліотеці проводять з використанням зондів. **Зонд** – це невелика ділянка ДНК або РНК, завдяки комплементарному зв'язуванню якої з цікавлячим нас геном можливо ідентифікувати необхідний клон.

Зондування ДНК передбачає зв'язування у розчині через повну або часткову комплементарність шляхом випадкового зіткнення двох одониткових фрагментів нуклеїнових кислот – гена пошуку і зонду. Ген пошуку і зонд утворюють стабільний гібрид, що і надає можливість вилучити конкретний ген із великої колекції рекомбінантних фрагментів ДНК. Для проведення цієї операції всі молекули ДНК-бібліотеки повинні бути переведені в одонитковий стан шляхом нагрівання. Одонитковий зонд, мічений радіоактивно або хімічно, вводиться у розчин з одонитковими фрагментами ДНК-бібліотеки для пошуку в ній комплементарного фрагменту. Найчастіше розмір зондів становить 15-20 пар нуклеотидів. Вони гібридизуються зі специфічними послідовностями в межах більш крупних клонованих ДНК-фрагментів. Іншими словами, зонди виступають «живцями» для ідентифікації більш великої «здобичі».

Процедура зондування специфічного гена в бібліотеці полягає в наступному:

1. Блотінг. Колонії або бляшки бібліотеки з чашки Петрі переносяться на абсорбуючу нітроцелюлозну мембрану шляхом розташування мембрани на поверхні середовища. Колонії або бляшки чіпляються за поверхню і лізуються *in situ*, далі ДНК денатурується.
2. Гібридизація. Мембрана омивається розчином одониткового зонду, специфічного до фрагмента ДНК, який шукають.

Зонд сам є клонованим шматочком ДНК, який має послідовність, гомологічну бажаному гену. Зонд повинен бути міченим радіоактивним ізотопом або флуоресцентним барвником. У такий спосіб розташування необхідного клону з'ясовується за розташуванням мітки. При використанні радіоактивних міток мембрана вміщується на шматочок рентгенівської плівки і засвічується у місці, відповідному до локалізації радіоізоотопу. Засвічена таким чином плівка називається **авторадіограмою**. Якщо для мічення зонду використовується флуоресцентне забарвлення, мембрана опромінюється світлом визначеної довжини хвилі. Після активування флуоресценції і фотографування у відповідному місці на знімку локалізується забарвлений фрагмент ДНК. Цей фрагмент можна видалити шляхом екстракції з відповідної зони гелю, яку попередньо механічно вирізають.

3. Експресія трансформованих генів і способи її оптимізації.

Дуже важливо при конструюванні векторів на основі Тіплазмід підібрати такі промотори, які забезпечать експресію трансгена в рослинах. Для цього промотор повинен бути сильним, тобто, забезпечувати активну експресію, бути здатним до регуляції, надавати можливість тканино- та органоспецифічної експресії. Цим вимогам відповідає популярний у сучасній генетичній інженерії рослин 35S промотор вірусу мозаїки кольорової капусти.

Введення сторонніх генів у рослинні клітини у складі векторних конструкцій, окрім *Agrobacterium* опосередкованої трансформації, може відбуватися шляхом електропорації, використання карбідних та силіконових фібрил, поліетиленгліколю. Ці методичні прийоми забезпечують утворення у клітинних стінках і плазматичних мембранах отворів, через які плазмідні проникають в рослинну клітину. Але найбільш поширеним і ефективним у теперішній час є метод перенесення сторонніх генів в геном рослинних клітин, запропонований у 1987 році Джоном Санфордом, який називається **біолістична трансформація** (біолістика, біологічна балістика, мікробомбардування). Біолістика ґрунтується на механічному перенесенні плазмідної ДНК, сорбованої на мікрочастинках твердої речовини (золота,

вольфраму, платини) діаметром 0,6-1,2 мкм, котрі розганяються до значних швидкостей у генній гарматі, як правило, в атмосфері гелію. Ці мікрочастинки спрямовують на клітини чи тканини рослинного об'єкта. Обстріл мікрочастинками призводить до проникнення плазмідної ДНК усередину рослинної клітини. В рослинній клітині чужорідна ДНК вбудовується в хромосоми випадковим порядком і успадковується за законами класичної генетики. Особливо зручним метод біолістики є для рослин, які погано піддаються *Agrobacterium* опосередкованій трансформації, зокрема, для злаків.

Для трансформації за участю агробактерій найчастіше використовують листові диски та калусні культури, тоді як для біолістики коло рослинних об'єктів для перенесення сторонніх генів розширене і включає калуси, суспензійні культури, молоді зиготичні зародки, ембріоїди, незрілий пилок та інші.

4. Стан та перспективи генно-інженерних досліджень рослин.

Практичне генно-інженерне удосконалення рослин відбувається за тими ж напрямками, за якими проводиться селекція тієї чи іншої культурної рослини. Основними серед них є збільшення продуктивності, покращення якості врожаю та продуктів, які з нього виробляються, підвищення стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів, адаптація до промислових технологій виробництва цільових продуктів з рослинної сировини та інші. Означені напрямки у теперішній час мають різний ступінь розробленості.

В генетичній інженерії рослин, як виключно селективні, маркерні та репортерні, успішно використовуються гени βглюкуронідази, β-лактамази, фосфоманоизомераз і неоміцинфосфотрансферази кишкової палички, ген люциферази світляка, гени зеленого флуоресцентного білка медузи, червоного флуоресцентного білка коралу *Discosoma* та інші.

Першою трансгенною харчовою рослиною, дозволеною до комерційного використання у 1994 році, стали томати сорту FlavrSavr, створені фірмою Calgene (США). Ці томати вирощуються влітку і за рахунок зміни терміну дозрівання можуть довго зберігатися, досягаючи зрілості лише взимку. Вагомими практичними генно-інженерними розробками стали сорти рослин зі стійкістю до гербіцидів та комах. Ці ознаки є моногенними, для забезпечення їх фенотипового прояву достатньо перенести в геном рослини один сторонній ген та забезпечити його експресію. Полігенні ознаки, такі як врожайність, продуктивність, системна стійкість до хвороб, модифікація

складних метаболічних шляхів для збільшення чи зменшення синтезу певного метаболіту для генно-інженерного поліпшення потребують спеціальних підходів і чималих зусиль, відтак у теперішній час знаходяться у стані інтенсивної розробки.

Стійкість до абіотичних факторів. Основними абіотичними факторами, від яких страждають культурні рослини, є посуха, спека, приморозки, холод, а також гербіциди та інші хімічні речовини. Особливо актуальним створення стійкості до абіотичних факторів у рослин із залученням генів сторонніх організмів стає у разі відсутності механізмів природної стійкості. Сорти, стійкі до гербіцидів, створено для сої, тютюну, томатів, кукурудзи та інших злаків. Отримано стійкість до гербіцидів глюфосинату амонію, хлорсульфурону, гліфосату, дикамби та інших за рахунок введення в геном рослин чужорідних генів *bar* бактерії *Streptomyces hygroscopicus*, мутантного гена ацетолактатсинтетази, знайденого у тютюну і арабідопсису, мутантних генів *aroA* *Salmonella typhimurium*, мутантного гена стійкості до дикамби з геному *Pseudomonas maltophilia* та інших.

Стійкість до біотичних факторів. Культурні рослини страждають від різних типів біоти, що призводить до зниження врожайності, вилягання, в'янення, усихання і може закінчитися повною загибеллю рослини. Пошкодження рослин спричиняється шкідниками – комахами, нематодами, гризунами тощо. Хвороби рослин викликають фітопатогени грибної, бактеріальної та вірусної природи.

Отримано трансгенні рослини кукурудзи, тютюну, томату, картоплі, бавовнику та інших культурних видів, стійкі до основних лускокрилих та твердокрилих шкідників. Найчастіше для створення рослин, стійких до комах, використовують Vt-гени з геному *Bacillus thuringiensis*. До вирішення цієї проблеми також залучають ген інгібітору цистинових протеїназ з геному рослини таро (*Colocasia esculenta*, *Araceae*), ген(Е)- β -каріофілінсинтази з геному рослини орігано (*Origanum vulgare*, *Lamiaceae*).

Підвищення продуктивності рослин та покращення якості врожаю. Кардинальне підвищення продуктивності і врожайності рослин за рахунок модифікації їх геному вкрай складне завдання, оскільки ці ознаки є полігенними, тобто, контролюються великою кількістю генів, реалізація яких у фенотипі ускладнюється алельними і міжалельними взаємодіями. Для підвищення продуктивності пропонується вбудовувати сторонні гени, відповідальні за підвищення синтезу фітогормонів і генів фітохромів – білків, які входять в систему фоторецепторів і залучені до функцій рослин, які регулюються світлом. Перспективним вважається введення в геном культурних рослин гена гемоглобіну від грамнегативної бактерії *Vitreoscilla*

для більш ефективного використання рослинами кисню, мутантних генів регуляції біосинтезу крохмалю та інших.

Виробництво фармацевтичних продуктів в рослинах. Розвиток нової галузі – виробництва фармацевтичних продуктів в рекомбінантних рослинах є альтернативою мікробному синтезу. Перевагами отримання рекомбінантних фармацевтичних продуктів у рослинах, а не шляхом мікробного синтезу, є екологічність виробництва та відсутність необхідності очищення кінцевого продукту.

Лекція № 8 «Проблеми біобезпеки та екологічної безпеки»

План:

1. Оцінка ризику використання трансгенних рослин.
2. Фіторемедіація.
3. Біотехнологія екологічно безпечного виробництва.

1. Оцінка ризику використання трансгенних рослин.

Найчастіше розглядають вплив трансгенних рослин на навколишнє середовище, що може проявлятися в тому, що:

- Сконструйовані гени можуть передаватися з пилком диким видам і їх гібридні нащадки набудуть властивості підвищеної насіннєвої продуктивності або здатності конкурувати з іншими рослинами;
- набудуть властивості бур'янів і витіснять інші рослини, що ростуть поряд;
- стануть прямою загрозою для людини, свійських і диких тварин (наприклад «наслідок токсичності чи алергенності»).

У результаті вивчення трансгенного і звичайного ріпаку спостерігали значні відмінності у виживанні насіння, трансгенні рослини менш стійкі порівняно із звичайними. Вивченням частоти перенесення гена *bag* (стійкості проти гербіциду Басти) встановлено, що частота перехресного запилення дорівнює: на відстані 1 м – 1,4 %; 3 м – 0,4 %; 12 м – 0,025 і 47 м – 0,00034% (3 гібриди рослин на 1 млн. рослин).

Визначення частоти перехресного запилення між трансгенною картоплею та пасльоновими *S.nigrum* і *S.dulcamara* показало, що коли контрольні і трансгенні рослини вирощували у сусідніх рядках, частота схрещування між ними дорівнювала 24 %. Після збільшення відстані до 10 м – 0,017 % і на відстані 20 м гібридних рослин не спостерігали.

Ще одним аспектом позитивної дії трансгенних рослин на навколишнє середовище є отримання трансгенних рослин із кращою здатністю засвоювати мінеральні сполуки, що крім посилення росту перешкоджає змиванню останніх у підґрунтові води і надходженню у джерела водопостачання.

Переваги ГМ – культур в порівнянні із традиційними:

У США за період 1996–2004 років прибутки фермерам, які вирощували модифіковані культури зросли на 27 млрд. доларів. Використання пестицидів зменшилось на 6 % (що становить 172 тис. тон) в порівнянні із традиційними технологіями. Суттєво зменшено викиди CO₂ в атмосферне повітря – більше ніж на 10 млрд. кг, що еквівалентно вилученню з обігу 5 млн. автомобілів щорічно.

Дослідження показують, що екологічний ризик у разі вирощування трансгенних рослин можна порівняти з ризиком випробування нових селекційних сортів. Всі речовини, які присутні у трансгенних рослинах існують в природі. Однак швидкість прояву цих ознак різна і те, що у природі відбувається протягом тисячоліть і десятків тисяч років, методами біотехнології прискорюється до років.

Чи існує небезпека зміни трансгенних рослин таким чином, щоб вони стали токсичними для людей і тварин? Навіть теоретично важко уявити, що введення одного з генів у вищий еукаріотичний організм, геном якого складається з десяти тисяч генів, змінить його метаболізм так, що рослина почне синтезувати токсичні сполуки, не пов'язані з експресією введеного гена. У кожному випадку введення нового гена у рослини та одержані генетично змінені їх форми мають проходити ретельні дослідження продуктів метаболізму, що кодуються введеними генами, і лише після цього рекомендувати для впровадження у сільськогосподарське виробництво.

З появою генетично модифікованих організмів, біотехнологія і генна інженерія все більше завойовують світовий ринок, що має позитивні аспекти: ми одягаємося у вироби з трансгенної шкіри і бавовни, і це дійсно не завдає жодної істотної загрози людству. Більше того сьогодні не можливо уявити медицину без ГМ – інсуліну, ГМ – інтерферону, які таким способом можна одержувати у промислових масштабах, рятуючи мільйони життів. Перспективним напрямком може бути і «хірургія генів», заміна мутантних генів нормальними, що допоможе в лікуванні онкологічних і спадкових

захворювань. Проте до широкого використання ГМО неоднозначне ставлення навіть серед вчених. Одні з них вважають, що беззастережне впровадження ГМ – продуктів є порушенням прав людини, проведенням експериментів над людиною. На жаль, позиції певних сторін цієї дискусії часто продиктовані не об'єктивними обставинами, а комерційною зацікавленістю. Перед вченими постають непрості питання як етичного характеру, так і такі, що пов'язані з прогнозуванням можливих, нині ще недостатньо досліджених, наслідків поширення ГМО і безконтрольного вживання ГМ - продуктів. Так зване генетичне забруднення біосферного генофонду відбувається на фоні втрати біологічного та генетичного різноманіття багатьма наземними та водними екосистемами.

Генетично модифікований (або трансгенний) організм містить неприродну для себе комбінацію генетичного матеріалу, переміщеного завдяки техніці генетичної інженерії з метою отримання бажаних ознак. Ген, що має корисні характеристики, приєднують до фрагмента бактеріальної кільцевої ДНК (плазмід), який стає носієм зазначеного гена. До цієї конструкції додають так званий регуляторний ген «промотор», який сигналізуватиме про роботу вбудованого гена. Застосування ген – маркерів вказує на якій саме клітині знаходиться вбудований ген. Всю цю конструкцію вміщують у бактерію, здатну розмножуватись, створюючи копії генної конструкції. І тільки тоді створений комплекс переносять в інший організм. Метод, завдяки якому проводиться локалізація створеного комплексу дістав назву **біобалістика**. Його суть полягає в тому, що штучно сконструйовані генетичні конструкції приєднуються до частинок золота та вистрілюють ними в клітини організму, з яких і вирощують повноцінний організм – рослину, яка і є генетично модифікованою. Наука володіє і іншими способами перенесення генів від одного організму до іншого (стосовно багатоклітинних еукаріот застосовують транспозони, або «стрибаючі гени», здатні змінювати свою дислокацію у межах певної хромосоми та навіть її гомологічної пари).

Основні ризики використання ГМО:

Агротехнічні. Практичне використання методів генної інженерії найпоширеніше в сільськогосподарському виробництві. Серед ГМ – рослин, які широко вирощують в світі – соя, бавовна і ріпак. У деяких країнах дозволено вирощувати трансгенні помідори, кар-топлю, рис, кабачки. Експерименти проводять на соняшнику, цукрових буряках, тютюні, винограді, плодових деревах тощо. Поширеними є трансгени, стійкі до гербіцидів, шкідників і вірусів.

Екологічні. Найважливіший екологічний аспект застосування ГМО та їх вплив на біорізноманіття.

Медичні. У ході досліджень встановлено, що пацюків, яких годували трансгенною картоплею, почав знижуватись імунітет, а після споживання ГМ – томатів у тварин відмічено порушення тканин шлунку. У них зменшувався об'єм мозку, розпочинались патології печінки, селезінки, кишкового тракту. Споживання цієї їжі може спричиняти у людей зміни обміну речовин, складу крові, десенсибілізацію до певних препаратів.

2. Фіторе mediaція.

Фіторе mediaція – складова фітотехнологій, що направлена на видалення чи розкладання поллютантів. Фітотехнології використовують вивчені природні фізіологічні властивості зелених рослин з метою відновлення ґрунтів, забруднених важкими металами і/або органічними сполуками. Це дешеві й екологічно привабливі технології для вилучення, деградації та фіксації забруднювачів.

Фіторе mediaція, за визначенням агентства з охорони навколишнього природного середовища США – набір технологій, які ґрунтуються на природних фізіологічних властивостях рослин деконтамінувати ґрунти, забруднені металами та (або) органічними сполуками. Світовою науковою спільнотою підраховано, що вартість очищення ґрунту, забрудненого важкими металами, радіонуклідами, нафтою чи пестицидами за допомогою рослин, що використовують лише енергію сонця, становить лише 5% від витрат на інші способи відновлення. Тому фіторе mediaція є більш екологічно доцільним і дешевим методом відновлення ґрунтів порівняно з фізико-хімічними і технічними способами, навіть з урахуванням обмеженості часових ресурсів для досягнення кінцевої мети. Процеси фіторе mediaції базуються на здатності рослин акумулювати, деградувати, стабілізувати, трансформувати і випаровувати забруднювачі з великої кількості природних матриць, зокрема, ґрунту та води.

3. Біотехнологія екологічно безпечного виробництва.

Сьогодні спостерігається тотальна біологізація майже всіх галузей господарства. Так, в медицині на зміну хіміко-фармакологічним препаратам приходять «ліки біологічної природи», виготовлені за використання біологічно активних компонентів живих організмів. У сільському господарстві успішно опановуються нові біологічні засоби захисту рослин, в промисловості, взагалі, та в енергетиці, зокрема, надалі все більша увага приділяється широкому застосуванню мікроорганізмів, які здатні не лише вибірково концентрувати певні метали або інші хімічні сполуки, а й

переробляти так звані «відходи цивілізації» на корисний продукт – метан або водень.

Вирішення екологічних проблем неможливе без застосування новітніх екобіотехнологій для діагностики забруднень довкілля, очищення стічних вод, знешкодження небезпечних газових викидів, використання перспективних засобів утилізації твердих і рідких промислових відходів, підвищення ефективності методів біологічного відновлення забруднених ґрунтів, заміни низки агрохімікатів на біотехнологічні препарати тощо. Важливим напрямом також має стати розробка екобіотехнологій, спрямованих на виробництво біогазу та водню з органічних відходів, мікробіологічна деструкція ксенобіотиків, застосування біоіндикації та біотестування в системі екологічного моніторингу.

Для вирішення екологічних проблем найчастіше вдаються до використання біологічних методів.

Методи біологічних досліджень включають різні методики та способи визначення:

- порівняльно-описовий;
- експериментальний;
- спостережний (моніторинговий);
- статистичний;
- моделювання.

Особливо ефективним для контролю зовнішнього середовища є використання принципів складової частини біотехнології – промислової мікробіології, оскільки експериментальні експрес методи з застосуванням біооб'єктів мають певні переваги над іншими методами.

Переваги біологічних методів:

1. Технологічні мікробні продуценти синтезують потрібні людині речовини (білки, амінокислоти, вітаміни, ферменти, інші органічні сполуки) в сотні разів швидше, ніж рослини чи тварини;
2. біотехнологічні процеси здійснюються на спеціальних підприємствах за використання екологічно безпечних технологій;
3. підприємства можуть функціонувати в будь-якій географічній зоні, в тому числі на залишених землях;
4. значна кількість відходів сільськогосподарського виробництва та інших галузей народного господарства є сировиною для мікробіологічних виробництв;
5. виключається екологічно небезпечне втручання в навколишнє середовище у вигляді пестицидів, добрив.

Промислова біотехнологія та біоіндустрія в цілому вважається екологічно безпечною галуззю з майже безвідходними виробництвами. Проте дотримання біобезпеки біотехнологій та моніторинг біотехнологічних виробництв є профілактичними мірами запобігання впливу потенційних технологічних повітряних та водних викидів, що можуть містити живі та мертві (непатогенні) клітини продуцентів біопродуктів, на кругообіг речовин у навколишньому середовищі, а також можливі впливи (індивідуальна алергічна надчутливість, сенсibilізація) клітин чи їх метаболітів на здоров'я обслуговуючого персоналу та навколишнього населення.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бирта Г., Бургу Ю. Генно-модифіковані організми. За і проти. Київ : Центр навчальної літератури, 2019. 128 с.
2. Дубровна О. В., Чугункова Т. В., Бавол А. В., Лялько І. І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ : Логос, 2012. 428 с.
3. Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А., Філіпова Л. М. Мікроклональне розмноження окремих видів рослин (протоколи технологій) : науково-практичний посібник. Біла Церква : БНАУ, 2019. 84 с.
4. Мацкевич В. В., Роговський С. В., Власенко М. Ю., Черняк В. М. Основи біотехнології рослин : навч. посіб. Біла Церква : БНАУ, 2010. 135 с.
5. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : підруч. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
6. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с.
7. Розмноження та оздоровлення насіннєвого матеріалу картоплі: навчальний посібник / А. А. Подгаєцький та ін. Суми : ПВКФ Видавництво «МакДен», 2019. 164 с.
8. Трохимчук І., Плюта Н., Логвиненко І. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник. Київ : Кондор, 2019. 304 с.

Навчальне видання

ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

Курс лекцій

Укладачі:

Гиль Михайло Іванович

Посухін Вадим Олександрович

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 13,0

Тираж ____ прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкт видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.