МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Т. М. Манушкіна

Біотехнологія в рослинництві

Курс лекцій

Миколаїв
2014

УДК
ББК
М

Автор: Т.М. Манушкіна

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії агрономічного факультету Миколаївського національного аграрного університету від _____ р., протокол № ___.

Рецензенти:

О. М. Дробітько – канд. с.-г. наук, директор ФГ «Олена» Братського району Миколаївської області;

Т. Г. Самойленко – канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри рослинництва та садово-паркового господарства, Миколаївський національний аграрний університет

Манушкіна Т. М.
М Біотехнологія в рослинництві : курс лекцій / Т. М. Манушкіна. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 51 с.

У курсі лекцій викладено опис сучасних методів біотехнології, що інтенсивно використовуються в рослинництві: культури клітин, тканин та органів, клітинної та генетичної інженерії. Надано конкретні рекомендації студентам, майбутнім агрономам з використання знань з курсу «Біотехнологія в рослинництві» на практиці.

УДК
ББК

© Миколаївський національний аграрний університет, 2014

© Манушкіна Т. М., 2014

ЗМІСТ

Вступ ……. 4

Лекція 1. Предмет, завдання і методологія біотехнології рослин. Культура ізольованих клітин та тканин …….. 6

Лекція 2. Культура калусної тканини. Морфогенез та регенерація рослин у культурі клітин та тканин …….. 16

Лекція 3. Клональне мікророзмноження рослин. Кріозбереження живого рослинного матеріалу……. 20

Лекція 4. Культура ізольованих протопластів …….. 31

Лекція 5. Молекулярна біологія і генетична інженерія…… 39

Список рекомендованої літератури …….. 50

ВСТУП

Біотехнологія – один із пріоритетних напрямів розвитку сучасної біологічної науки, головним завданням якого є використання біологічних процесів, систем і органів у різних галузях, таких, як клітинна та генетична інженерія рослин, тварин і людини, використання іммобілізованих ферментів, виробництво антибіотиків, біогазу та ін. Із сучасних методів біотехнології в рослинництві інтенсивно використовуються методи культури клітин, тканин та органів, емріокультури, гаплоїдії і дигаплоїдії, сомаклональної варіабельності, а також клітинної та генетичної інженерії.

Основною ***метою*** вивчення біотехнології рослин є засвоєння студентами її теоретичних основ і формування практичних навичок, що необхідно для формування висококваліфікованих сучасних фахівців сільського господарства.

Завдання дисципліни – розкрити теоретичні і практичні питання методів біотехнології рослин: культури калусних тканин та суспензійної культури, клітинної селекції, клонального мікророзмноження, культури протопластів та соматичної гібридизації, трансгенозу рослин та ДНК-технологій.

В результаті вивчення дисципліни «Біотехнологія в рослинництві» студент повинен ***знати*:**

- суть біотехнології як однієї з основних галузей сучасної біології;
- основні методи біотехнології;
- закономірності росту і розвитку ізольованих клітин, тканин рослин в умовах *in vitro*;
- принципово нові біотехнології в сільському господарстві;
- методи отримання трансгенних рослин.

Студент повинен ***уміти*:**

- користуватися навчальною, методичною та науковою літературою з біотехнології;
- підготовити посуд, інструменти та прилади для біотехнологічних досліджень;
- приготувати живильне середовище;
- працювати в біотехнологічній лабораторії та використовувати основні методи біотехнології;

Предметом навчальної дисципліни є клітини, тканини і органи сільськогосподарських культур.

Об'єктом навчальної дисципліни є морфо генетичні потенції клітин, тканин і органів сільськогосподарських рослин в умовах *in vitro*.

Обсяг дисципліни складає 108 години або 3,0 кредити, в тому числі 10 – лекційних, 10 – лабораторних та 88 години – самостійних занять.

Розподіл навчального часу за темами лекцій наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

РОЗПОДІЛ НАВЧАЛЬНОГО ЧАСУ ЗА ТЕМАМИ ЛЕКЦІЙ

№ п/п	Теми лекцій	Кількість годин
МОДУЛЬ І. Біотехнологія рослин як наука		
1.	Предмет, завдання і методологія біотехнології рослин. Клітинні технології	2
МОДУЛЬ ІІ. Клітинні технології для вирішення теоретичних питань і практичних завдань рослинництва та селекції		
2.	Культура калусної тканини. Морфогенез та регенерація рослин у культурі клітин та тканин	2
3.	Клональне мікророзмноження рослин. Кріозбереження живого рослинного матеріалу	2
МОДУЛЬ ІІІ. Молекулярна біотехнологія: принципи та застосування		
4.	Культура ізольованих протопластів	2
5.	Молекулярна біологія і генетична інженерія	2
Разом		10

МОДУЛЬ І. БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН ЯК НАУКА

Лекція 1. Предмет, завдання і методологія біотехнології рослин

План

1. Предмет і завдання біотехнології рослин.
2. Основні терміни біотехнології рослин.
3. Історія розвитку біотехнології.
4. Значення біотехнології для рослинництва.
5. Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції.
6. Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу.
7. Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин.

1. Предмет і завдання біотехнології рослин

Сучасна біотехнологія представляє собою сукупність технологій, які передбачають використання біологічних процесів живих клітин, макро- і мікромолекул з метою одержання заданих продуктів.

Використання в практиці сільського господарства біотехнологій обумовлене необхідністю підвищити врожаї і поліпшити якість основних сільськогосподарських культур, пошуком економічно вигідних та екологічно безпечних технологій.

У сучасній біотехнології рослин виділяють **три напрями**:

1) технології, що ґрунтуються на використанні культури клітин, тканин та органів рослин. Використовуються для одержання з біомаси культивованих *in vitro* клітин біологічно активних речовин, що використовують в медицині, харчовій, косметичній промисловості тощо. Клітинні технології використовують також для отримання віддалених гібридів, створення гомозиготних диплоїдів (подвоєних гаплоїдів), розмноження та оздоровлення цінних генотипів;

2) ДНК-технології - молекулярно-генетичні методи аналізу рослин, пов’язані з аналізом молекулярно-генетичного поліморфізму рослин, детекцією патогенів, добором рослин з потрібними для селекціонера генами;

3) отримання трансгенних рослин методами генної інженерії, які дають змогу виділяти ділянки ДНК, які містять потрібні гени і вводити їх у геном рослин. Сьогодні у рослини вводяться гени стійкості проти гербіцидів і шкідників, а також гени, що контролюють білки тварин, людини, лікарські речовини тваринного походження. У 2002 році світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн. га (в 1996 р. – в 35 разів менше). Найбільші посівні площі під трансгенними культурами зайняті у США, Канаді, Аргентині, Китаї.

Основна мета біотехнології – це створення нових сортів рослин, порід тварин, штамів мікроорганзмів, використання організмів і біологічних процесів у виробництві, зокрема, для синтезу в промислових масштабах кормових білків, амінокислот, бар (інтерферон, гормон росту, інсулін, алкалоїди, глікозиди).

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.

2. Основні терміни біотехнології рослин

Клітинна інженерія – метод отримання нових рослин шляхом маніпуляцій з клітинами.

Генетична (генна) інженерія - метод отримання нових рослин шляхом маніпуляцій з генами.

Клональне мікророзмноження – одержання в культурі in vitro нестатевим шляхом рослин (найчастіше з апікальної меристеми), генетично ідентичних вихідній рослині.

In vitro – вирощування живого матеріалу у склі, на штучних живильних середовищах в асептичних умовах.

Диференціювання – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між материнськими та дочірніми клітинами, стан

спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших. Проявляється морфологічними, фізіологічними і біохімічними змінами клітин.

Дедиференціювання – перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації, яка призводить до втрати більшості ознак спеціалізації.

Експлант – фрагмент тканини або органа, що використовується для вирощування in vitro самостійно або для одержання первинного калусу.

Калус – тканина, що виникла внаслідок дедиференціації та неорганізованої проліферації клітин на поверхні рани.

Проліферація – новоутворення клітин і тканин розмноженням.

Примордій – зачаток органа.

Клон – культура, що виникла з однієї клітини.

Морфогенез – виникнення та розвиток спеціалізованих клітин, органів і частин організму.

Органогенез – процес виникнення *de novo* у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів (коренів і пагонів).

Гемогенез – утворення (диференціація) бруньок калусними клітинами.

Гіногенез – процес формування рослин із клітин зародкового мішка.

Ризогенез – утворення коренів.

Субкультивування (пасажування) експланта – перенесення експланта, калусу, рослини-регененранта на свіже живильне середовище.

Трансгенна рослина – рослина, що містить в своєму геномі чужорідний рекомбінантний ген (гени).

Цикл вирощування (пасаж) – період між двома субкультивуваннями.

3. Історія розвитку біотехнології

Біотехнологіні дослідження розпочалися з кінця XIX століття як частина досліджень з фізіології рослин. Як самостійна наука та прикладний напрям інтенсивного розвитку набула з середини XX століття (табл. 1).

Таблиця 1

Історія розвитку біотехнології

Рік	Етап розвитку
1	2
1893	**К. Рехінгер** отримав калюсну тканину зі шматочків коренів цукрових буряків, кульбаби та сегментів стебла тополі.
1902	**Г. Хаберландт** вперше обгрунтував принципи вирощування ізольованих клітин на штучних середовищах і їх тотипотентність.
1922	**Кнудсон** довів можливість одержання сіянців орхідей з насіння в стерильних умовах.
1930-ті	**Ф. Уайт** (США) і **Р. Готре** (Франція) почали широкомасштабні дослідження з культивування тканин і органів рослин *in vitro.*
1939	**Стріт** розробив умови для суспензійної культури.
1949	**Ф. Калінін** розпочав роботи з культивування рослин *in vitro.*
1957	**Ф. Скуг** і **К. Міллер** (США) встановили роль цитокінінів та ауксинів для диференціації коренів і пагонів з калюсної тканини. **Ж. Морель** (Франція) визначив дію гіберелінів на розвиток експлантів в культурі *in vitro.*
1958	**Р. Бутенко** розпочала дослідження з культури клітин і тканин рослин в Росії.
1959	**Ж. Морель** розробив метод культури меристем.
1960	**Е. Кокінг** вперше одержав протопласти ферментативним способом.
1971-1975	**Е. Кокінг** (Англія), **Е. Такебе** (Японія) розпочали роботи з масового ізолювання та злиття протопластів.
	Г. Мельхерс (ФРН), **Ю. Глєба** (Україна) отримали перші соматичні гібриди рослин способом злиття протопластів.
	С.Малюта, Б. Левенко, В. Кунах, В. Кордюм, В Моргун (Україна) провели перші в СРСР досліди з трансгенозу рослин за допомогою бактеріофагів та чужорідної ДНК.

Продовж. табл. 1	
1	2
1983	**Д.Шелл** (Німеччина) і **М. Ван Монтагю** (Бельгія) вперше в світі отримали трансгенні рослини.
1994	У США зареєстровано першу трансгенну рослину харчового використання – томат «Флейвр-Сейвр» з подовженим терміном зберігання.
1999	Кількість трансгенних сортів рослин у світі досягає 120 і вони займають 40 млн. га посівних площ.
2002	Посівні площі під трансгенними культурами в світі становлять близько 57 млн. га.

В Україні значних наукових результатів в біотехнології рослин досягли вчені Ф.Калінін (гормональна регуляція), Б.Левенко (калусна культура, клітинна селекція і генетична трансформація), Ю. Глєба, В. Сидоров, М.Кучук, Я. Блюм, В. Кунах, В. Кордюм, В. Моргун (соматична гібридизація і генетична трансформація), А. Здруйковська-Ріхтер (культура зародків плодових культур), Л. Бугаєнко, Н.Єгорова, О. Митрофанова (клональне мікророзмноження с.-г. рослин).

4. Значення біотехнології для рослинництва

Практичне значення методів біотехнології для інтенсифікації рослинництва наведено у табл. 2

Таблиця 2

Значення біотехнології для рослинництва

Метод біотехнології	Завдання, що вирішуються	Практичні результати
1	2	3
Клональне мікророзмноження та одержання оздоровленого садивного матеріалу	створення системи первинного насінництва сільськогосподарських культур	картопля, виноград, суниці, плодові, овочеві, декоративні, ефіроолійні культури
	прискорене розмно-ження цінного селекційного матеріалу	те саме

Продовж. табл. 2

1	2	3
	розмноження рідкісних і зникаючих видів рослин	орхідні, глід Пояркової; еспарцет Паласа
	розмноження рослин, що погано розмножуюся вегетативним способом	хвойні породи, пальми
Кріозбереження генофонду	створення кріобанків генів рослин	сільськогосподарські культури
Клітинна селекція	одержання сомаклональних варіантів та мутантних форм	пшениця, стійка до фузаріозу; еспарцет, стійкий до грибкових хвороб
Запліднення *in vitro* (ембріокультура)	подолання прогамної і постгамної несумісності, одержання міжродових і міжвидових гібридів	Слива, персик, нектарин
Соматична гібридизація	створення нових генотипів, які неможливо одержати статевим шляхом внаслідок несумісності	
Культура пиляків, мікроспор та макроспор (експериментальна гаплоїдія)	одержання гаплоїдів і створення гомозиготних ліній	ячмінь
Культура ендосперму	одержання триплоїдних і поліплоїдних рослин	кукурудза, рис

Продовж. табл. 2		
1	2	3
Генна інженерія	створення нових генотипів шляхом генетичної трансформації	соя, картопля, кукурудза, томат
Клітинна гібридизація та імунологічні дослідження	створення методів діагностики вірусних хвороб рослин із застосуванням моноклональних антитіл	віруси сільськогосподарських культур
Культивування рослинних клітин в біореакторах	одержання рослинної біомаси в необмеженій кількості	женьшень, радіола рожева, раувольфія зміїна

5. Клітинні технології для одержання генетичного різноманіття для селекції

Клітинні технології рослин – це сукупність прийомів культивування рослинних клітин *in vitro* з метою одержання заданих організмів або речовин.

Їх класифікують на три групи залежно від збереження або зміни генотипу.

І група - 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 сомаклональних варіантів.

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

Головні причини виникнення сомаклональних варіантів:

1) генетична гетерогенність клітин вихідного експланту;

2) генетична та епігенетична мінливість, індуковані умовами культивування.

Внаслідок сомаклональної варіабельності у клітинах рослин виявлено зміни:

1) рівня плоїдності (поліплоїдія);

2) кількості хромосом (анеуплоїдія);

3) структурні зміни хромосом (делеції, дублікація, транслокації, інверсія);

4) зміни мітохондріальної і пластидної ДНК.

Сомаклональні варіанти можуть відрізнятися від вихідних рослин за такими ознаками:

1) біохімічними;

2) якісними;

3)кількісними.

2. М**утагенез *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:

а) електромагнітне іонізуюче випромінювання (космічні, рентгенівські і гама-промені);

б) корпускулярне іонізуюче випромінювання (альфа-, бета-частини, протони, нейтрони);

в)ультрафіолетові промені.

2) хімічні (колхіцин, аналоги азотистих основ ДНК – 5-бромурацил, 5-фторурацил);

3) *біологічні* (віруси, плазміди, транспозони, ДНК).

3. Клітинна селекція – відбір клітин з необхідними ознаками за допомогою селективних факторів. До живильного середовища додають селективні агенти, внаслідок чого створюється селективний тиск на клітину. Клітини, що неспроможні протистояти впливу селективних агентів, гинуть, а ті, що вижили, мають генетичні зміни стійкості до селективних факторів. Такі клітини дають початок калюсам і рослинам-регенерантам.

Для виділення стійких клітин застосовують селективні агенти, що наведено у табл. 3. Їх додають до складу живильного середовища, концентрація та експозиція дії селективних агентів підбирається експериментально залежно від генотипу рослин.

Таблиця 3

Застосування селективних агентів у клітинній селекції рослин

Вид стійкості	Селективний агент
Стійкість до гербіцидів	Гербіциди
Стійкість до важких металів	Важкі метали
Стійкість до антибіотиків	Антибіотики
Стійкість до засолення	Хлорид натрію
Стійкість до патогенів	Токсини патогенів
Посухостійкість	Маніт, сорбіт
Морозостійкість	Низькі температури

6. Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу

II група - Клітинні технології для полегшення та пришвидшення селекційного процесу рослин

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 достигає 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, насіннєві 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.

7. Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин

III група - Клітинні технології для одержання біологічно активних речовин – вирощування в біореакторах клітин рослин з метою одержання біологічно активних речовин. Так отримані мутантні клітинні лінії раувольфії зміїнної – 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.

МОДУЛЬ ІІ. КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ТЕОРЕТИЧНИХ ПИТАНЬ І ПРАКТИЧНИХ ЗАВДАНЬ РОСЛИННИЦТВА ТА СЕЛЕКЦІЇ

Лекція 2. Культура калусної тканини. Морфогенез та регенерація рослин у культурі клітин та тканин

План

1. Калусогенез як основа створення клітинних культур. Дедиференціювання та калусоутворення *in vitro*.
2. Методика одержання калусних культур.
3. Тотипотентність рослинних клітин.
4. Основні механізми регенерації рослин.
5. Типи вторинної диференціації та морфогенезу.

1. Калусогенез як основа створення клітинних культур. Дедиференціювання та калусоутворення *in vitro*.

Калусогенез – процес утворення калусу.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калусна. Саме на калусні перетворюються спеціалізовані і меристемні клітини рослин після їх перенесення в умови *in vitro* на штучні живильні середовища. На калусні клітини перетворюються не лише пошкодженні тканини, а й не пошкодженні. Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калусну є дія регуляторів росту у таких концентраціях та співвідношеннях, які на клітину в організмі як єдиній системі не діяли. Можна стверджувати універсальність перетворення на калусні всіх типів клітин, ізольованих із рослини та культивованих у відповідних умовах. Утворення калусу не у всіх випадках пов’язане з поверхнею експланта, а може відбуватися в наслідок проліферації внутрішніх тканин без зв’язку з поверхнею зрізу.

Процес дедиференціювання та калусоутворення in vitro пов’язаний з наступними змінами у клітинах:

1) експресії (активності) *генів*;

2) спектра ферментних та структурних білків (зменшуються або зовсім зникають білки, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків, запасним клітинам бульб і кореня, з’являються білки властиві калусним клітинам).

3) метаболізму клітини, активізуються процеси, що забезпечують дедиференціацію і наступне розмноження клітин;

4) стимулюється синтез усіх форм РНК і розпочинається реплікація ДНК (тобто клітини готуються до поділу).

У тканинах експланта, що складаються з високоспеціалізованих клітин, які у нормі не діляться, зміни пов'язані з травматичними синтезами. Припускають, що травма призводить до вивільнення бар – *індукторів або еліситорів клітинних поділів*, що відрізняються від гормонів. У ролі таких еліситорів можуть виступати продукти руйнування полісахаридів клітинної стінки, що обумовлюють подальші зміни метаболізму та поділу клітин.

Калуси можуть утворювати будь-які клітини рослин із живим ядром.

Експланти для одержання калусу – це клітини:

1) паренхіми листків;
2) паренхіми стебел;
3) запасаючої паренхіми кореня;
4) флоеми коренеплодів;
5) пелюсток квіток;
6) ендосперму;
7) пилку.

Водночас, диференційовані клітини не завжди здатні утворювати калус, що особливо часто спостерігається у злаків, у яких калус одержують лише із ділянок недозрілої основи листка.

Здатність до калусоутворення, темп і тип росту ізольованих клітин, їх здатність до різних типів морфогенезу залежать від:

1) складу живильного середовища;
2) умов культивування (освітлення,температури);
3) тривалості пасажу;
4) віку рослини-донора;
5) фізіологічного стану рослини донора;
6) умов вирощування рослини донора;
7) сезону експлуатування;
8) стадії розвитку вихідного органу;
9) тканинної належності експланта;
10) розміру експланта;
11) орієнтації експланта на живильному середовищі. та інших специфічних особливостей.

2. Методика одержання калусних культур

У природі для рослин калус є тканиною, що виникає звичайно при травмах. Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втрачених органів. Для одержання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин попередньо стерилізують, вміщують на штучне живильне середовище в культуральні посудини і вирощують в асептичних умовах. Залежно від виду рослин субкультивування калюсу проводять через 30-60 днів.

3. Тотіпотентність рослинних клітин

Тотіпотентність (*від лат.totus — весь, цілий і potentilla — сила*) – властивість соматичних клітин рослин реалізувати повною мірою свій потенціал розвитку, тобто реалізувати **омніпотентність** ядра з утворенням цілого організму; здатність рослинних клітин фенотипово реалізовувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра.

Тотіпотентною є зигота рослин. Тотіпотентність можуть виявляти багато соматичних клітин. Наприклад, розвиток рослини з клітини листка у бегонії. Якщо цей листок відокремити і помістити у вологу камеру, то він може утворювати цілий пагін, але дослідження показали,що початок пагону дає лише одна клітина епідермісу. При цьому вона спочатку проходить процес дедиференціації, тобто набуває ознак і властивостей ембріональних клітин. В цій клітині починається інтенсивний синтез цитоплазми з органелами, зникає центральна вакуоля після чого клітина переходить до поділу. Омніпотентність (тотіпотентність) наглядно проявляється в дослідах з культурою клітин, тканин і органів в штучних умовах на спеціальних живильних середовищах.

4. Основні механізми регенерації рослин

Регенерація (від лат. regeneratio – відродження, вторинний розвиток) – відновлення втрачених або пошкоджених органів і тканин, цілого організму з його частини.

В основі регенерації лежать явища диференціювання клітин і морфогенезу.

Диференціювання – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між материнськими та дочірніми клітинами, стан спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших. Проявляється морфологічними, фізіологічними і біохімічними змінами клітин.

Основою диференціювання є диференціальна активність генів, які відповідають за синтез білків, що зумовлюють диференціювання.

Морфогенез (утворення морфологічних структур) – виникнення та розвиток спеціалізованих клітин, органів і частин організму.

Залежно від механізму процесу виділяють типи регенерації:

1) фізіологічна – відновлення органів після їх природного зношування (клітини кореневого чохлика, елементи ксилеми, кора дерев);

2) травматична – відновлення органів після їх механічного пошкодження;

3) меристемна – пов'язана з наявністю у рослинах апікальних та інтеркалярних меристем, які внаслідок пошкодження активізуються і регенерують тканини, органи чи цілі організми. Виділяють наступні типи меристемної регенерації:

а) відновлювання апікальних меристем (після ізолювання на живильне середовище регенерує ціла рослина);

б) органогенез з існуючих зачатків проембріо – відростання пазушних бруньок стебла після зняття апікального домінування;

в) органогенез із новоутворених адвентивних зачатків – стеблові живці утворюють корені внаслідок активації періклінальних поділів камбію чи перицикл, які виконують функцію латентних меристем. Індукція поділів спричинюється накопиченням ІОК в нижній частині меристеми.

5. Типи вторинної диференціації та морфогенезу.

В умовах in vitro виділяють такі типи морфогенезу:

1) гістогенез – утворення калусними клітинами елементів тканин (меристемних, провідних, механічних);

2) органогенез – процес виникнення *de novo* у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів:

а) ризогенез – утворення коренів*;*

б) гемогенез – утворення (диференціація) бруньок калусними клітинами*;*

3) ембріогенез (соматичний ембріогенез) – утворення ембріонів, які містять (подібно до зародка) зачатки стебла та кореня.

Для стимулювання певного типу морфогенезу у біотехнологічних дослідженнях використовують гормони: ауксини, цитокініни, гібереліни.

Ауксини: ІОК – індоліл-3-оцтова кислота, ІМК – індоліл-3-масляна кислота, НОК – α-нафтилоцтова кислота, 2,4-Д –

2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота. Стимулюють процеси росту й розтягнення клітин, сприяють формуванню калусної тканини, утворенню коренів.

Цитокініни: кінетин – 6-фурфуриламінопурин, зеатин, NN-дифенілсечовина, 6-БАП – 6-бензиламінопурин. Регулюють процеси поділу клітин, їхньої диференціації; сприяють утворенню пагонів у калусній тканині.

Гібереліни: гіберелова кислота ($ГК_3$); $ГК_1$, $ГК_2$ та інші. Стимулюють ріст і витягування стебла за рахунок розтягнення клітин. Викликають партенокарпію, зміну статі, сприяють виходу насіння зі стану спокою.

Культивують експланти у культуральній кімнаті. Умови культивування підбираються експериментально. ***Для більшості рослин помірної зони умови культивування наступні:***

1) тривалість пасажа – 30-60 діб;
2) температура – 20-26 ^{0} С;
3) інтенсивність освітлення –2-3 клк;
4) фотоперіод – 8 – 16 год;
5) відносна вологість повітря – 60-70%

Лекція 3. Клональне мікророзмноження рослин. Одержання безвірусного садивного матеріалу

План

1. Завдання та переваги клонального мікророзмноження.
2. Типи клонального мікророзмноження.
3. Основні етапи клонального мікророзмноження.
4. Одержання безвірусного садивного матеріалу.
5. Вірусологічний контроль садивного матеріалу.

1. Завдання та переваги клонального мікророзмноження

Клональне мікророзмноження – масове нестатеве розмноження рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру, з використанням техніки *in vitro*.

Ця біотехнологія існує на ***двох рівнях:***

1) мінірівень, як допоміжна в селекційному процесі для здійснення швидкого розмноження унікальних рослин – донорів

цінних генів, стерильних ліній, гібридів, мутантів, сомаклональних варіантів;

2) макрорівень клонального мікророзмноження пов'язаний з необхідністю одержання значних кількостей посадкового матеріалу вегетативно розмножуваних рослин.

Перевагами цієї біотехнології, що дозволили досягти їй високого ступеня комерціалізації в світі, є:

1) високі коефіцієнти розмноження (до 10^5 - 10^6 мериклонів за рік);

2) скорочення площ у закритому ґрунті, зайнятих під маточними і розмножуваними рослинами;

3) можливість цілорічної роботи в лабораторних умовах і планування випуску рослин у необхідні терміни;

4) можливість одержувати вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються в звичайних умовах;

5) можливість одержувати посадковий матеріал, оздоровлений від патогенів;

6) можливість депонування рослин за низьких позитивних температурах або кріозбереження.

Клональне мікророзмноження базується на регенераційній здатності тотіпотентних клітин рослин. Геном соматичних клітин рослин містить повну інформацію про розвиток усього організму. Під дією комплексу факторів відбувається індукція морфогенетичної програми. В межах організму функціональна диференціація клітин зумовлюється вибірковою експресією генів під впливом сукупності регуляторних систем тканин – позиційної інформації (клітинного оточення, полярності та ін.). При експлантації клітин, тканин чи органів зв'язок між регуляторними факторами організму порушується і їх організований розвиток, що веде до регенерації рослин, контролюється як внутрішніми, так і зовнішніми чинниками.

Здатність до регенерації є складною ознакою, що пов'язана з експресією інших кількісних ознак організму. Регенераційні та проліферативні процеси в експлантах детерміновані генотипом рослини-донора, тому морфогенетичні реакції рослин специфічні в межах виду, сорту і типу експланта.

2. Типи клонального мікророзмноження

Залежно від характеру морфогенетичних процесів в культурі тканин виділяють ***типи клонального мікророзмноження:***

1) активація розвитку вже існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні й сплячі бруньки стебла);

2) індукція виникнення бруньок або ембріоїдів de novo.

Останній тип ділиться на три методи:

а) виникнення організованих структур безпосередньо із спеціалізованих тканин експланта (тканин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листка);

б) *виникнення організованих структур з первинного калуса, утвореного клітинами експланта;*

в) виникнення організованих структур із субкультивованої калусної тканини або клітин суспензійної культури.

Обов'язковою умовою клонального мікророзмноження є збереження генетичної стабільності на всіх етапах процесу від експланта до рослини-регенеранта. Диференціація соматичних клітин в онтогенезі рослин призводить до втрати геномом стабільності (ендополіплоїдії, ампліфікації деяких генів, змін на рівні повторів ДНК). Тому при розмноженні в культурі *in vitro* шляхом індукції адвентивних пагонів безпосередньо з тканин експланта не виключена можливість одержання неоднорідного потомства. Однак, цей метод є досить ефективним для розмноження деяких видів рослин (цибулинних, пальм, деяких декоративних рослин).

Геномна мінливість характерна для соматичних клітин при індукції процесів дедиференціації і калусогенезу. Показано також, що тривале субкультивування калуса супроводжується накопиченням генних мутацій. З гетерогенних калусних тканин регенерують рослини з широкою генетичною варіабельністю – сомаклональні варіанти, що використовуються для розширення різноманіття вихідного селекційного матеріалу. Регенерація рослин з калусів, що культивуються під дією селективних факторів (складу живильного середовища, температури та ін.) покладена в основу методу клітинної селекції.

Найбільш надійним з точки зору одержання генетично ідентичного вихідним формам потомства є *метод активації вже існуючих у рослині меристем.* Меристемні тканини рослин містять диплоїдний набір хромосом і підтримуються в ембріонально активному стані.

Можливими механізмами підтримання генетичної стабільності апікальних меристем є:

1) організація їх у вигляді дискретних зон;

2) висока активність систем репарації ДНК;

3) негативна селекція змінених клітин.

Апікальна меристема - це верхівкова твірна тканина стебла і кореня. Апікальна меристема стебла утворює клітини первинних тканин, що диференціюються (вже в меристематичній зоні) і формують примордії листків і пазушних бруньок, стебло і метамери суцвіть. Більша частина вищих рослин має проміжний тип росту, за якого в пазухах листків знаходяться додаткові меристематичні тканини, здатні сформуватися в пагін після зняття апікального домінування.

Культура меристем – це асептичне вирощування на живильних середовищах ізольованої з апексу або пазушної бруньки пагона апікальної меристеми з одним або двома листковими примордіями.

Культура апікальних меристем ***використовується*** для:

1) одержання рослин, генетично ідентичних вихідному генотипу;

2) одержання рослин, вільних від патогенів;

3) зберігання зародкової плазми (кріозбереження).

Морфогенез ізольованих меристем у культурі in vitro і подальше мікророзмноження може бути реалізоване двома шляхами (рис. 1):

1) регенерацією пагонів нормальних пропорцій з наступним їх поділом на "однобрунькові" мікроживці, які використовуються як вторинні експланти для повторного циклу розмноження;

2) стимуляцією розвитку всіх пазушних бруньок і меристематичних бугорків у результаті пригнічення апікального домінування первинного пагона. Регенеранти мають вигляд пучків пагонів, кожен з яких може бути рекультивований з аналогічним результатом.

3. Основні етапи клонального мікророзмноження

Процес клонального мікророзмноження складається з чотирьох основних етапів:

1-й етап – ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*;

2-й етап – власне мікророзмноження;

3-й етап – укорінення мікропагонів;

4-й етап – адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

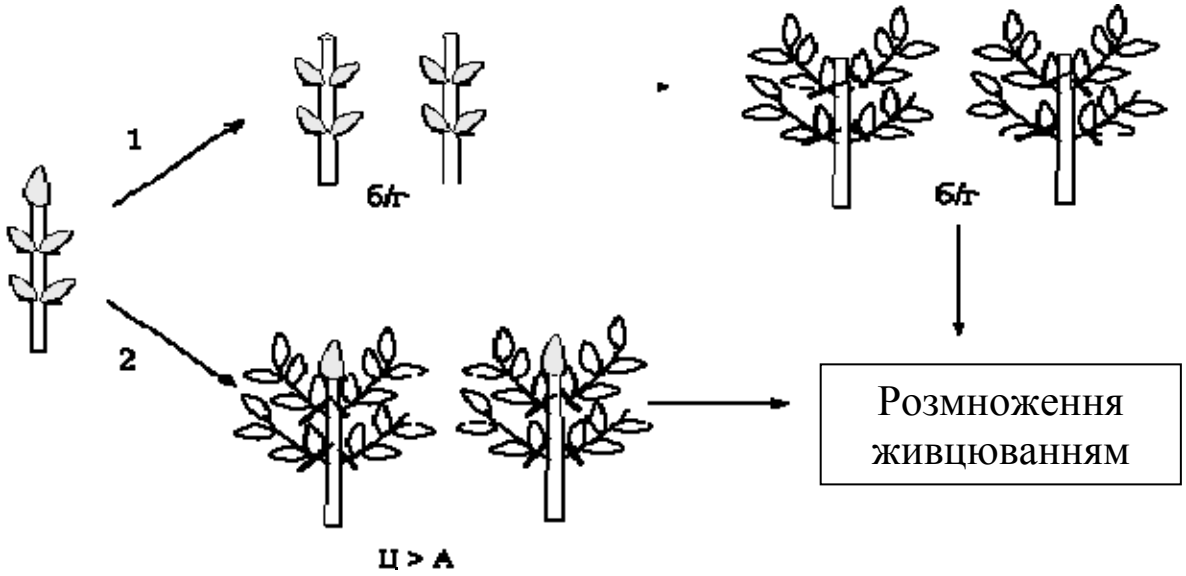

Рис. 1 Шляхи морфогенезу ізольованих меристем у культурі in vitro

У культурі *in vitro* морфогенез є наслідком контрольованої індукції. Клональне мікророзмноження передбачає індукцію гемогенезу в ізольованих меристем з подальшим утворенням пагонів і укорінених рослин. Формування пагонів, коренів й інтегрованого рослинного організму є комплексним процесом і контролюється численними ***факторами:*** генетичними, фізіологічними, гормональними і фізичними.

Генетичні фактори, що регулюють морфогенетичні реакції, діють на рівні класу, родини, роду, виду, різновидності, сорту рослини. Експериментальними роботами багатьох дослідників доказано, що дводольні трав'янисті рослини володіють більшими морфогенетичними потенціями, ніж тканини і органи дерев'янистих та однодольних трав'янистих рослин. Значною регенераційною здатністю характеризуються види рослин з родин *Solanaceae, Asteraceae, Umbeliferae, Cruciferae*; низькою – з родин *Poaceae* та *Fabaceae*.

До ***фізіологічних факторів***, що впливають на регенераційні процеси *in vitro*, відносяться фізіологічний вік донорної рослини, сезонність ізоляції експланта, розмір експланта, розміщення бруньок на пагоні (для меристематичних тканин).

Гормональні фактори. Ініціація розвитку експланта та утворення пагонів і коренів значною мірою залежить від складу живильного середовища: вмісту і співвідношення макро- і мікроелементів, вітамінів, сахарози, гормонів. Ізольовані меристеми

культивують на середовищах Мурасиге і Скуга, Лінсмаєра і Скуга, Ніча, Уайта, Гамборга В5, Шенка і Хільдебрандта.

F. Skoog і C. Miller показали, що характером росту і морфогенезу в культурі тканин можна управляти, маніпулюючи вмістом і співвідношенням ауксинів і цитокінінів у живильному середовищі. При високому співвідношенні гормонів цитокінін – ауксин відбувається розвиток пазушних меристем або утворення адвентивних бруньок, при низькому – індукується коренеутворення, а при середньому спостерігається утворення і проліферація калуса.

Ауксини регулюють процеси поділу і розтягування клітин, сприяють формуванню коренів і провідних пучків. ***Цитокініни*** поліфункціональні у своїй дії на різних етапах росту і розвитку: вони стимулюють мітози, диференціацію клітин, знімають апікальне домінування. В культурі *in vitro* до складу живильних середовищ включають цитокініни: кінетин, БАП, зеатин, 2-ізопентиладенін (2-iP), ізопентениладенозін (ІПА), тідіазурон.

Аналіз робіт багатьох дослідників дозволяє зробити висновок, що реакція експлантів на рівень екзогенних гормонів ***специфічна*** в межах виду, сорту, органу-донора експланта, розміру експланта, тканини. Така ***специфічність*** обумовлена ***рядом факторів***: морфогенним потенціалом експланта, здатністю клітин експланта синтезувати ендогенні гормони, наявністю клітин, компетентних до обробки екзогенними гормонами, наявністю набору регульованих генів.

Регенерація, ріст і розвиток експлантів в ізольованій культурі значною мірою залежить від ***фізичних факторів***: консистенції живильного середовища, кислотності середовища, температури, світла, відносної вологості повітря. Консистенція живильного середовища впливає на постачання експлантів і мікропросли поживними речовинами, видалення продуктів метаболізму і, як наслідок, розвиток рослин з нормальною або зміненою морфологією. Для культивування тканин та органів більшості видів рослин оптимальним є живильне середовище з pH 5,5 - 6,0. Для більшості рослинних тканин температурний оптимум становить 23–26 ^{0}C. Звичайно ізольовані тканини рослин культивують при освітленні люмінесцентними лампами з інтенсивністю 1–6 клк і 14-16-годинному фотоперіоді, але іноді ці параметри потребують коригування відповідно з вимогами до них материнської рослини. Під

час клонального мікророзмноження експланти культивують при відносній вологості повітря 60–70 %.

Уперше метод культури меристем було розроблено в 1952 році G. Morel і C. Martin. У Росії дослідження з культури меристем розпочато в 1960 році Р.Г. Бутенко. Відтоді створено біотехнології клонального мікророзмноження майже для 2400 видів рослин.

На сьогодні в світі найбільш широко використовується клональне мікророзмноження на основі культури меристем у ланках первинного насінництва картоплі, суниці, винограду в зв'язку із можливістю елімінації вірусів; комерційними є технології розмноження *in vitro* декоративних квіткових рослин, що пов'язано з високими коефіцієнтами розмноження, технологічністю і можливістю одержувати рослини в період найбільшого на них попиту.

Розроблено технології клонального мікророзмноження плодових і ягідних, субтропічних культур. Перспективними напрямами біотехнології є розробка способів клонального мікророзмноження важкорозмножуваних рослин і цінних деревних порід, а також рідкісних та зникаючих видів флори з метою їх збереження і репатріації в природне середовище для відновлення популяцій.

4. Одержання безвірусного садивного матеріалу

На сьогодні головними ***способами одержання безвірусних рослин*** є:

1) відбір і розмноження здорових маточних рослин на основі ранньої і точної діагностики;

2) біотехнологічні прийоми оздоровлення посадкового матеріалу.

Окремі безвірусні рослини слід виділяти шляхом позитивного відбору з використанням методів діагностики: за зовнішніми симптомами, біотесту на рослинах-індикаторах, серологічних методів, електронної та імуноелектронної мікроскопії. Виділені безвірусні рослини використовуються як маточні для одержання здорового посадкового матеріалу.

У разі, коли всі рослини цінного сорту або селекційної форми заражені вірусами, для їх оздоровлення залучають ***біотехнологічні методи:***

- культуру апікальних меристем;
- термотерапію;
- хемотерапію.

Метод культури апікальних меристем основується на тому факті, що концентрація вірусу в інфікованих клітинах зменшується в

напрямку до верхівки пагона, і апікальні меристеми можуть бути вільними від нього. Перші теоретичні дослідження, в яких було виявлено градієнт концентрації вірусів у рослині, були проведені T.H. Thung, P.R. White, P. Limasset і P. Cornuet. Згодом G. Morel і C. Martin одержали методом культури меристематичних верхівок безвірусні рослини жоржин, картоплі, цимбідіуму.

Зараз накопичено фактичний матеріал, що свідчить про здатність вірусів проникати в зону апікальних меристем. З огляду на цей факт, звільнення певної кількості меристемних рослин від вірусів у культурі *in vitro* може відбуватися з декількох ***причин:***

1) наявності вільної від вірусів зони верхівкової меристеми на певній відстані від термінальних клітин, що утворюється внаслідок: меншої швидкості руху вірусів порівняно зі швидкістю поділу клітин точок росту; блокування швидкого транспорту вірусних часточок по меристемі через відсутність у ній провідної системи; відсутності міжклітинників серед клітин верхівкових меристем і недостатньої налагодженості системи плазмодесм, що ускладнює апопластичний і симпластичний шлях переміщення вірусів; більшої конкуренції вірусів з меристематичними клітинами, що активно діляться, за АТФ та інші макроергічні молекули, переважання синтезу нормальних нуклеопротеїдів над синтезом вірусних;

2) вірусінгібуючої дії компонентів живильного середовища;

3) видалення вірусних часточок, що містяться в клітинах меристеми, в ході диференціації.

Техніка оздоровлення рослин на основі культури меристем розроблена для багатьох видів сільськогосподарських і декоративних рослин. Високої ефективності оздоровлення вдалося досягти у суниці, картоплі, квітково-декоративних культур. Однак, у ряду культур вихід безвірусних рослин незначний – у цимбідіуму – 1 %, хризантеми – 3,8 %, гвоздики – 19,8 %, троянди – 30,0 %.

Підвищення ефективності звільнення рослин від вірусів досягається поєднанням методу культури меристем з термотерапією або хемотерапією.

Термотерапія **–** це обеззаражування рослин від вірусів під дією підвищених температур (найчастіше 36–42 ^{0}C). Ефективність терапії залежить від термостійкості вірусів і термотолерантності уражених рослин. При термотерапії рослин, уражених термолабільними вірусами, іноді вдається вилікувати повністю всю рослину. Однак, більшість вірусів є термостабільними і точка їх термічної інактивації

знаходиться в межах 50–70 ^{0}С. Під час термотерапії рослин від термостабільних вірусів звільняються тільки органи, що відросли під час термообробки.

Механізм терапевтичного ефекту вивчений недостатньо і може бути пояснений декількома гіпотезами:

1) висока температура призводять до втрати інфекційності вірусних часточок, викликаючи деструкцію їх нуклеїнової кислоти або білкової оболонки (у термолабільних вірусів);

2) висока температура діє на віруси через метаболізм рослини, викликаючи дисбаланс між синтезом і деградацією вірусних часточок в сторону деградації;

3) під дією високих температур зростає інгібуюча активність клітин рослини-господаря;

4) під дією підвищених температур відбувається денатурація білкових вірусних рецепторів клітини, які беруть участь в початкових етапах інфекційного процесу, і клітини втрачають сприйнятливість до вірусу.

Термотерапія ділиться на два способи – водяна і повітряна обробка.

При *водяній* термотерапії інфікований матеріал у стані спокою занурюють у гарячу воду (температура від 35 до 80 ^{0}С, експозиція обробки – від 3 - 90 хвилин до 30 годин), або у термокамери типу водяного бака. Однак, за температури вище 50 ^{0}С навіть при короткочасній дії можуть виникати незворотні пошкодження твірних тканин, зокрема, камбію. Крім того, іноді така обробка не дає позитивних результатів щодо звільнення рослин від вірусів.

Повітряній термотерапії піддають рослини, що вегетують, витримуючи їх у термокамерах за температури 36–38 ^{0}С. Такий спосіб має два варіанти: термообробка рослин *in vivo* та *in vitro*.

У першому варіанті попередньо укорінені рослини культивують у термокамерах за температури 37±1 ^{0}С, освітленості 5-10 клк/м^2, фотоперіоду 14-16 годин, відносної вологості повітря 50-80 %, експозиції 7-100 днів. Верхівки пагонів, що відросли в таких умовах, укорінюють у кліматичних камерах або прищеплюють на індикаторні сорти чи безвірусні підщепи, чи експлантують меристеми з відрослих пагонів і вводять їх у культуру *in vitro*. Виявлено позитивний вплив високих температур на точку росту і процеси морфогенезу рослин в умовах *in vitro*, помічено стимулюючий вплив на адаптацію мікророслин до умов *in vivo*. Таким методом високої ефективності

оздоровлення вдалося досягти у квітково-декоративних, плодових культур, винограду.

Термотерапія *in vitro* застосовується для рослин, що характеризуються низькою термотолерантністю. Рослини-регенеранти в культурі *in vitro*, вирощені до певної стадії, поміщають у термокамери з температурою 37±1 ^{0}C. Після закінчення обробки теплом апікальні частини мікророслин укорінюють на живильному середовищі, а потім дорощують у культурі *in vivo*. Ефективність такого способу звільнення від вірусів показана для троянди, цимбідіуму – 80 %, винограду, вишні, сливи – 100 % та інших культур.

Відомі випадки, коли терапевтичний ефект наставав при пониженій температурі. Так, при культивуванні меристем *Trifolium repens* за температури 10 ^{0}C протягом 13–15 тижнів було одержано рослини, вільні від чотирьох вірусів.

У теперішній час одним з методів боротьби з фітовірусними інфекціями є ***хемотерапія.*** Відомо декілька класів речовин з прямою антивірусною активністю, що, пригнічують репродукцію вірусу в рослині (рибавірин, азацитидин та похідні олігоаденілатів). Вплив обробки такими речовинами на інфекційність може бути результатом дії як на вірус, так і на сприйнятливість клітини-господаря. Досліджуються сполуки, здатні активувати захисні механізми рослини та індукувати системну набуту резистентність (бензотіадизол, стробілурин-похідні, саліцилова кислота, 2,6-дихлорізонікотинова кислота та ін). Проте жодна з антифітовірусних сполук не набула застосування проти широкого кола вірусів.

На сьогодні найбільш відомий метод хемотерапії полягає у внесенні сполук-інгібіторів вірусів у живильне середовище для культивування на ньому апікальних меристем.

5. Вірусологічний контроль садивного матеріалу

Технології одержання вільного від вірусної інфекції посадкового матеріалу передбачають застосування ***вірусологічного контролю*** на всіх етапах розмноження рослин. Найбільш ефективним тестом на наявність мінімальної кількості вірусу в рослині є імуноферментний аналіз (ІФА, ELISA – enzyme-linked-immuno-sorbent assay). В основі ІФА лежить реакція між антигеном, що міститься в досліджуваному зразку, і антитілами до нього, міченими ферментом. Антитіла виступають як специфічний детектор антигену, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, з допомогою якого візуалізується утворення

комплексів посередництвом кольорової реакції між ферментом і субстратом до нього. Існує чотири основні модифікації ІФА: прямий, непрямий, “сендвіч” та ПАП-(пероксидаза-антипероксидазний) метод.

ІФА характеризується високою чутливістю (концентрація антигена в соці 1 нг/мл) та вірусоспецифічністю (з допомогою моноклональних антитіл “сендвіч”-методом можна розрізняти штами вірусів, що мають відмінності хоча б за одним амінокислотним залишком). Такі переваги методу, а також мінімальна кількість рослинного матеріалу, необхідного для проведення аналізу, і швидке одержання результатів зробили ІФА зручним для відбору безвірусних маточних рослин і аналізу одержаних після терапії рослин при виробництві оздоровленого посадкового матеріалу.

Безвірусні рослини відносять до категорії ***оригінальний посадковий матеріал***, який використовується для створення оздоровлених маточників. У цих маточниках здійснюється комплекс профілактичних і захисних заходів проти повторної інфекції: знищення бур’янів-резерваторів вірусів, боротьба з хворобами і шкідниками (можливими переносниками вірусів). Паралельно проводиться робота з клонової селекції. Потомство оригінальних рослин – елітний посадковий матеріал служить для закладки маточників супереліти та еліти в розсадницьких господарствах, які передають матеріал першої репродукції в господарства, що спеціалізуються на вирощуванні сільськогосподарської культури з метою одержання товарної продукції.

МОДУЛЬ ІІІ. МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ: ПРИНЦИПИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

Лекція 4. Культура ізольованих протопластів

План

1. Методи одержання протопластів.
2. Методи культивування протопластів.
3. Регенерація рослин з протопластів.
4. Методи соматичної гібридизації.
5. Типи соматичних гібридів та методи їх аналізу.
6. Практичне застосування соматичної гібридизації.

1. Методи одержання протопластів

Рослинна клітина оточена щільною і міцною пектиново-целюлозною оболонкою. Сусідні клітини рослинної тканини мають спільну серединну пластинку, що з обох боків оточена целюлозними та геміцелюлозними мікрофібрилами, з'єднаними пектиновими сполуками для міцності. Внаслідок цього клітини тканин міцно і жорстко скріплені між собою.

На початку 60-х років XX ст. англійський вчений Едвард Кокінг запропонував метод руйнування клітинної оболонки, в результаті якого живий вміст клітини, або клітина без оболонки але із плазматичною, клітинною мембраною, залишається неушкодженим та життєздатним. Клітина, позбавлена механічно або за допомогою ферментів клітинної оболонки, називається *протопластом.* Така «гола» клітина надалі потенційно спроможна відновити нову клітинну стінку, ділитися й утворювати клітинні агрегати, з яких можна одержувати рослини-регенеранти. Відсутність клітинної стінки дозволяє виконати низку генетичних маніпуляцій, пов'язаних з реконструюванням геному, а також одержати популяції гібридних клітин внаслідок злиття протопластів, виділених із клітин мутантного походження або клітин іншого виду чи навіть роду рослин (рис. 2).

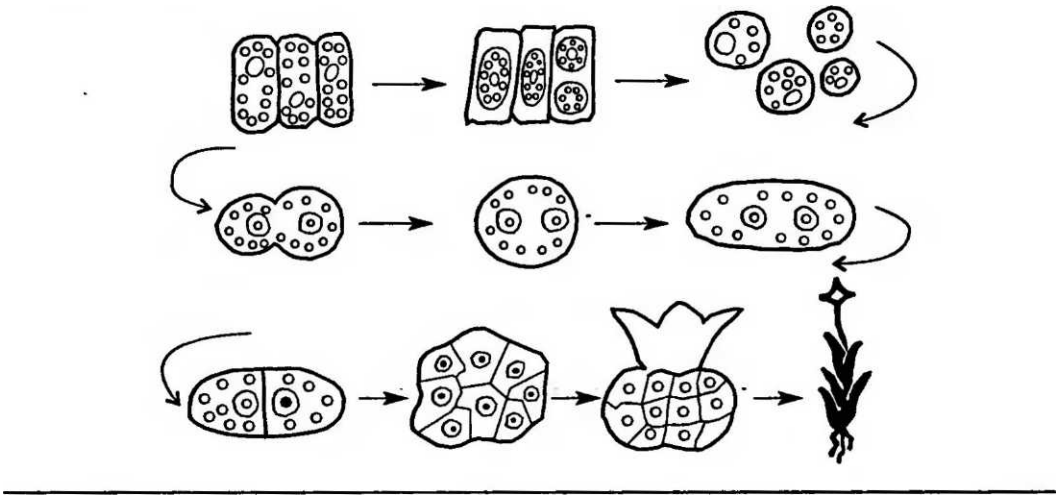

Рис. 2 **Схема отримання і злиття протопластів (за: Бутенко, 1975)**

Методи одержання протопластів:

1. ***Механічний*** – обробка осмотиками, механічне руйнування стінок клітин.

2. ***Ферментативний (ензиматичний) метод*** складається з 4 етапів:.

І етап: інкубація в середовищі з осмотиками - цукри (до 23%), сорбіт, маніт (0,4-0,7 М), що зневоднюють клітину, відокремлюючи протопласт від клітинної стінки;

ІІ етап: руйнування пектинових речовин серединних пластинок – під дією фермента пектинази, утворюються окремі клітини;

ІІІ етап: *руйнування* целюлози – під дією фермента целюлози;

IV етап: *відмивання від ферментів*, культивування протопластів в середовищі з сорбітом чи манітом, щоб не розірвлася мембрани.

На сучасному етапі застосовують однофазну обробку сумішшю ферментів (пектиназа, целюлаза, геміцелюлаза). Умови культивування: концентрація ферменту 0,025-5,0 % залежно від типу ферменту, температура 20-30^{0}С, pH 5,5 – 6,0.

Протопласти здатні:

1) *регенерувати клітинну стінку, ділитися*, утворюючи калус, регенерувати рослини;

2) *зливатися,* навіть із токсономічно віддаленими видами;

3) *піноцитозу* (введення вірусів, бактерій, хлоропластів, молекул ДНК – генетична трансформація).

Вихідний матеріал для виділення протопластів:

1) тканини листка;

2) клітинні суспензії;

3) тканини, що культивуються *in vitro.*

2. Методи культивації протопластів

Існують різні методи культивування протопластів.

Метод мікрокрапель. Застосовують для культивування незначної кількості протопластів, а також у разі тестування живильних середовищ у дослідженнях з оптимізації умов культивування. Звичайно об'єм крапель не перевищує 50 мкл. Для підтримання відповідної вологості в камері на середину чашки Петрі поміщають кілька крапель стерильної води.

Суспензії протопластів. Протопласти суспендують у тонкому прошарку (1 мм) рідкого живильного середовища, у колбах Ерленмейєра об'ємом 25 мл або в чашках Петрі (діаметром 60 мм) з погойдуванням або без нього.

Метод плейтингу. Протопласти, суспендовані у рідкому живильному середовищі, змішують з однаковим об'ємом культурального середовища з агаром, що до використання витримують на водяній бані за 45 °С. Для оптимальної аерації необхідно, щоб суміш вкривала дно чашки тонким шаром. Протопласти можуть бути суспендовані у напіврідкому середовищі (0,4 **%** агару) або на поверхні культурального середовища (0,8 **%** агару).

У деяких випадках у напіврідкому середовищі краще утворюються колонії. Відзначено збільшення поділів протопластів у разі нанесення їх на поверхню фільтрувального паперу, що знаходиться на агаровому середовищі. Часто застосування агарози або фітогелю поліпшує результати порівняно з використанням агару.

Камери для мікрокультивування протопластів виготовляються таким способом: на предметне скло наноситься крапля культурального середовища (до ЗО мкл), що містить один або декілька протопластів. По обидва боки краплі поміщають покривні скельця, на які кладуть ще одне покривне скельце. Щоб запобігти підсиханню, мікрокамеру ізолюють стерильним парафіном. Останнім часом використовують чашки Cuprak із невеличкими нумерованими гніздами, у які наносять краплі живильного середовища об'ємом 0,25—25 мкл, створюючи множину рядів із крапель.

Культивування на «живильному прошарку». Неподільні, але з активним метаболізмом клітини, опромінені рентгенівськими або гамма-променями і занурені в живильне середовище, можуть підтримувати ріст протопластів навіть за дуже низької щільності останніх (5—50 протопластів на 1 мм).

Спільне культивування з «живильною культурою» застосовується під час клонування соматичних гібридів, як «живильну культуру» часто використовують культуру хлорофілдефектних клітин.

Культивування мобілізованих протопластів. Протопласти, вкриті оболонками з альгінату кальцію, спроможні зберігати тургорний тиск в умовах осмотичного потенціалу культурального середовища, що можна використовувати під час їхнього культивування. Встановлено, що зниження осмотичного тиску культурального середовища підвищує життєздатність протопластів деяких видів рослин порівняно з контролем.

3. Регенерація рослин з протопластів

Регенерація рослин з протопластів включає такі етапи:

1) стерилізація листка;
2) видалення епідермісу;
3) мацерація, плазмоліз клітин мезофілу;
4) застосування ферментів;
5) виділення протопластів;
6) центрифугування;
7) культивування протопластів;
8) регенерація клітинної стінки;
9) поділ клітин;
10) утворення калусу;
11) регенерація рослин.

4. Методи соматичної гібридизації.

Соматична (парасексуальна) гибридизація – гібридизація за допомогою злиття протопластів в обхід статевого схрещування.

Це повністю штучний метод гібридизації, що використовується для багатьох видів рослин. Для записування парасексуальних гібридів замість знаку «Х» (АхВ), яким позначається статева гібридизація, використовується знак «+» (плюс). Наприклад, *N. tabacum + N. sulvestris.*

Для позначення гібридів, що мають гени ядра лише одного з батьків разом із цитоплазматичними (позаядерними) генами обох батьків або тільки іншого, використовують термін *цибрид.*

Отже, парасексуальна або соматична гібридизація за допомогою злиття протопластів (внаслідок реалізації тотипотентності рослинної клітини) призводить до утворення рослин із різними комбінаціями батьківських генів. Це новий спосіб гібридизації, що дає змогу долати обмеження статевого процесу та конструювати нові рослини.

Соматична гібридизація дає змогу:

1) схрещувати філогенетично віддалені види рослин (організмів), які неможливо схрестити статевим шляхом;

2) одержувати асимметричні гібриди;

3) зливати три і більше батьківських клітин;

4) одержувати рослини, гетерозиготні за позаядерними генами;

5) долати обмеження генеративних систем несумісності;

6) схрещувати форми, які неможливо схрестити статевим шляхом в наслідок відхилень в гаметогенезі або морфогенезі батьків.

Перші соматичні гібридні клітини були одержані в результаті експериментів з тваринними клітинами на початку 60-х років XX століття.

У сільськогосподарських рослин одержано пізніше, після розробки методів виділення і злиття протопластів. Дослідження проводять в інституті клітинної біології і генетичної інженерії НАН України. Соматична гібридизація є основним інструментом **клітинної інженерії**.

Під час злиття протопластів спочатку відбувається їх аглютинація (злипання), а потім власне злиття мембран. Механізм злиття протопластів незрозумілий, особливо неясно, як зливаються мембрани. Частота спонтанного злиття протопластів низька, причиною може бути випадкове зберігання плазмодесм між сусідніми плазмолізованими клітинами. Після видалення клітинної стінки плазмодесми збільшуються в розмірах, об'єднуючи вміст двох і більше клітин в одну.

Протопласти мають негативний поверхневий заряд, тому взаємно відпгтовхуються. Для процесу злиття це відштовхування долається або зняттям, або перерозподілом поверхневого заряду.

Для індукованого злиття протопластів використовується хімічний і електричний методи.

1. Хімічний – здійснюється у два етапи (рис. 3):

1. Обробка суспензії протопластів концентрованими розчинами ПЕГ (20-30%) – що викликає їх злипання.

2. Через 10-15 хвилин ПЕГ видаляється відмиванням розчином з pH 9-11 і високим вмістом Ca^{++} (100-300 Мм), у якому мембрани скупчених протопластів зливаються.

Ефективність методу: зливаються 10-50 % протопластів.

Недоліки: частина протопластів гине, зливаються більше двох протопластів, які є не життєздатними.

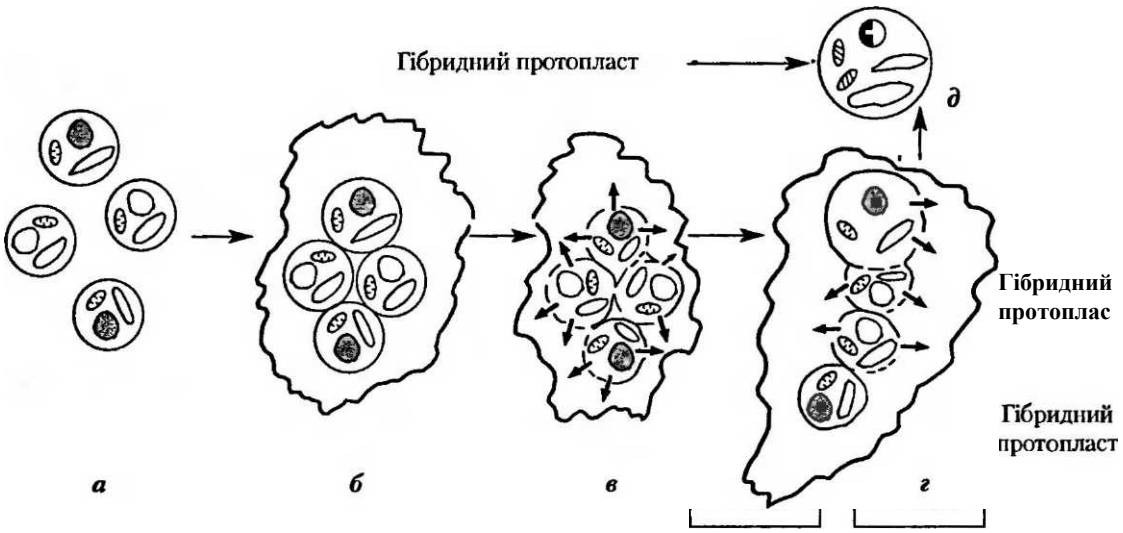

Рис. 3. **Схема злиття протопластів за допомогою ПЕГ:**

а **— суміш протопластів;** ***б*** **— злипання протопластів в результаті дегідратації під впливом ПЕГ; в — перетікання внутрішньо клітинного вмісту внаслідок утворення пор на мембранах;** ***г*** **— продукти злиття з порами на мембранах;** ***д*** **— гібридні або цибридні продукти злиття (за:**

2. Електричний - для аглютинації і злиття протопластів використовують електричне поле (рис. 4)**:**

1. . В суспензію протопластів вміщують два електроди. Змінний струм спричинює діелектрофорез, протопласти шикуються в ряд, приєднуючись полярними поверхнями один до одного.
2. Потім подається сильний імпульс (600 В/см, 10-20 мкс), який призводить до утворення пор у сильно стиснутих мембранах, і протопласти перетікають один в інший.
3. Потім дається згасаючий сигнал струму доти, доки відбувається змішування цитоплазми.
4. Після зняття струму злиті протопласти повертаються до сферичної форми.

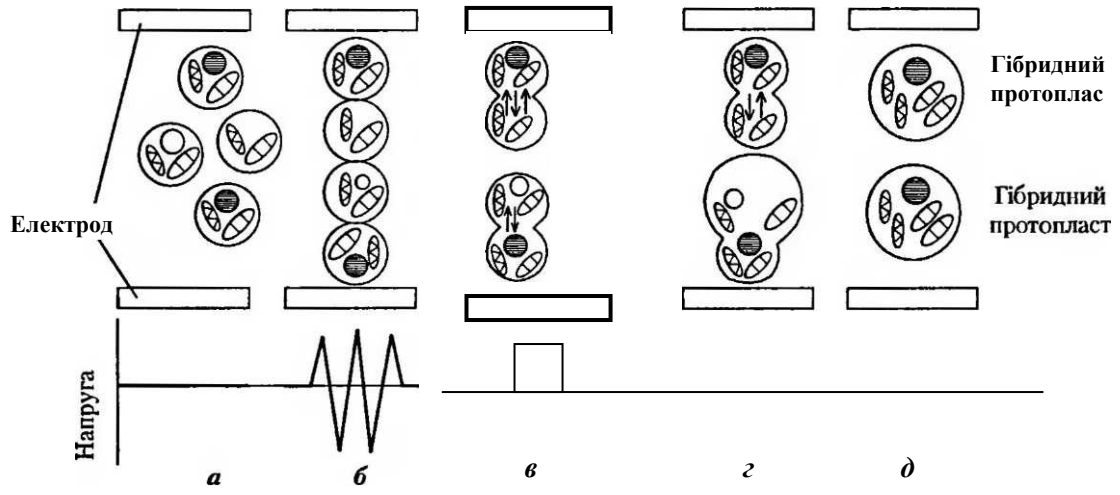

Рис. 4. **Етапи злиття протопластів під дією електричного поля (за: Борнман, 1991).**

Ефективність методу висока; без застосування хімічних стимуляторів, за кімнатної темп-ри і фізіологічних значень pH; злив протопластів різного тканинного і видового походження.

Недолік: дороге устаткування.

5. Типи соматичних гібридів та методи їх аналізу

Соматичні гібриди - клітини, одержані за допомогою злиття протопластів.

Цибрид – гібрид, що має гени ядра лише одного з батьків разом із цитоплазматичними (позаядерними) генами обох батьків або тільки одного.

Пластом – сукупність генетичного матеріалу пластид клітини. Кодує: нестійкість проти гербіциду, атрицину, антибіотиків; білки великих субодиниць рибулозо-бісфосфат-карбоксилази; будову деяких поліпептидів хлоропластів.

Мітохондріон – сукупність генетичного матеріалу мітохондрій клітини. Кодує: ЦЧС; морфологію квітки; частину поліпептидів АТФ синтетазного комплексу; будова деяких білків мітохондрій.

Для підтвердження гібридної природи отриманих внаслідок злиття клітин соматичних гібридів їх ***аналізують наступними методами****:*

1) цитогенетичні – кількість і морфологія хромосом;
2) біохімічні – електрофорез в ПААГ;
3) молекулярно-генетичний аналіз – ПЛР.

6. Практичне застосування соматичної гібридизації

На сьогодні можна окреслити такі потенційні ***напрями практичного використання соматичної гібридизації:***

1) утворення нових гібридних форм;

2) внесення в геном окремих генів і груп генів, частин і цілих хромосом;

3) використання методів соматичної гібридизації для створення ліній з доданими хромосомами;

4) дослідження модифікованих ознак, що отримані на рівні клітини методом рекомбінантної ДНК або внаслідок мутагенезу; можливе злиття нетотипо-тентних змінених протопластів з тотипотентними, де нові модифікації можуть бути збережені на рівні рослин-регенерантів; у такий спосіб стає можливим дослідження їхньої експресії і генетичної природи;

5) перенесення ознак, локалізованих в органелах; одержання цибридів із шуканими комбінаціями ядра і цитоплазми має найбільше значення для практичної селекції;

6) дослідження експресії і картування генів; феномен елімінації хромосом за соматичної гібридизації є основою для розробки методів локалізації генів на хромосомах; крім того, продукти злиття клітин можуть бути використані для вивчення експресії і регуляції активності генів; можливості досліджень у цьому напрямі істотно розширюються із застосуванням методів гаплоїдії, ізоферментного і рестрикційного аналізів ДНК і гібридизації *in situ.*

Соматичну гібридизацію можна розглядати як один із засобів генетичної трансформації рослин. У результаті об'єднання рослинних геномів (ядер і цитоплазми) виникають унікальні можливості для одержання нових комбінацій генів, що дуже важко або практично неможливо одержати з застосуванням класичних методів генетики і селекції, наприклад, перенесення цитоплазматичних ознак, таких, як ЦЧС, стійкість проти хвороб, гербіцидів. Крім того, поєднання методів соматичної гібридизації з методами молекулярної генетики використовують для вивчення генетики клітинних органел рослин.

Оскільки процес соматичної гібридизації пов'язаний з об'єднанням клітин різноманітних видів, то для визначення генетичної конституції отриманих гібридів враховують розбіжність хромосом під час перших поділів гібридних клітин, розподіл і рекомбінація хлоропластів, мітохондрій і інших клітинних органел.

Одержання гібридів (або цибридів) під час злиття соматичних клітин, на відміну від статевої гібридизації, цілком відбувається в штучних умовах. Генетичний статус гібридів може бути модифікований внаслідок змін, що часто трапляються під час культивування клітин і тканин. Процеси злиття, формування гібридних колоній клітин і регенерації рослин досить тривалі для здійснення цих змін. В результаті можливе ускладнення генетичного аналізу гібридних продуктів на рівні цілих рослин.

Лекція 5. Молекулярна біологія і генетична інженерія

План

1. Молекулярні основи спадковості.
2. Транскрипція генів еукаріотів.
3. Гени рослин.
4. Методи генетичної інженерії.
5. Перенесення генів в реципієнті клітини за допомогою векторів.
6. Методи прямого переносу генів в реципієнті клітини.
7. Аналіз трансформованих клітин.
8. Фенотипова і технологічна характеристики трансгенних рослин
9. Стан та перспективи генно-інженерних досліджень у рослинництві.

Генетична (генна) інженерія – це новітній напрям в генетиці та біотехнології, головною метою якого є цілеспрямована перебудова геному організмів шляхом зміни в них генетичної інформації за допомогою штучних прийомів перенесення генів. Серед них найголовнішими є:

1) синтез генів поза організмом;
2) виділення із клітин окремих генів або спадкових структур;
3) спрямована перебудова виділених спадкових структур;
4) копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів і генетичних структур;
5) об'єднання в одній клітині різних геномів (конструювання нового генотипу).

Основним завданням генетичної інженерії рослин є збагачення сортів новими ознаками: стійкістю до гербіцидів, шкідників, збудників хвороб, кращим якісним складом, поліпшеними смаковими та харчовими властивостями.

У світі вже вирощуються генетично змінені сорти сої, кукурудзи, рису, томатів, ріпаку. Розроблені методи отримання рослин, котрі не поглинають з ґрунту важкі метали, що особливо важливо для промислових районів, де концентрація важких металів у ґрунті безперервно зростає. Створені сорти здатні активно накопичувати різні корисні речовини: одні з них дають олію поліпшеного складу, інші – синтезують продукти, потрібні для виготовлення ліків, ще інші – визначаються збалансованим вмістом незамінних амінокислот.

1. Молекулярні основи спадковості.

У всіх клітинних організмах та у ДНК – вмісних вірусів збереження і передача спадкової інформації здійснюється молекулами ДНК, а у РНК-вмісних вірусів молекулами РНК.

Як носій генетичної інформації виконує функції:

1) самовідтворюється в процесі реплікації перед поділом клітин, з тим щоб кожна дочірня клітина отримала ідентичну генетичну інформацію;

2) передає закодовану генетичну інформацію молекулам іРНК (транскрипція) білку(трансляція).

2. Транскрипція генів еукаріотів

Організація еукаріотичних генів принципово відрізняється від організації генів бактерій. Основні розбіжності полягають в тому, що більшість структурних генів у еукаріотів мають безперервну структуру, де кодуючі ділянки (екзони) чергуються з некодуючими (інтронами). Незалежно від цього цілий ген транскрибується в про-іРНК, після цього послідовності, кодовані в інтронах, вирізаються, а в екзонах – з'єднуються. Цей процес називається **дозріванням (процесингом) іРНК.** Після дозрівання іРНК переноситься з ядра в цитоплазму, зв'язується з рибосомами і слугує матрицею для синтезу білків. Так само процесинг характерний для інших типів ядерної ДНК (рРНК, тРНК). У вищих рослин дозрівання ядерних РНК здійснюється за тими самими закономірностями, що й для тварин, грибів.

Етапи дозрівання ядерних РНК:

1) *кепірування* є характерною модифікацією 5'-кінця ІРНК який містить одну з пуринових основ (аденін або гуанін), за рахунок приєднання до нього метильованого у сьомому положенні гуанінового трифосфонуклеозида з утворенням неканонічного зв'язку 5'-5'. Ця модифікація забезпечується особливим ферментом — гуанілилтрансферазою. Утворені на 5'-кінцях ІРНК кепи (ковпачки) забезпечують пізнавання молекул іРНК малими субчасточками рибосом у цитоплазмі Кепірування здійснюється ще до закінчення синтезу первинного транскрипту.

2) *поліаденилювання* – приєднання до 3'-кінця поліА(100-200 залишків аденілової кислоти), після чого здійснюється транспорт іРНК з ядра*;*

3) *сплайсинг* – видалення інтронів і об’єднання екзонних ділянок*;*

4) *розщеплення полігенних транскриптів* на окремі молекули ДНК.

Регуляцію транскрипції здійснюють:

1) промотори – ділянка ДНК, з якою зв'язується РНК – полімераза, яка відповідає за ініціацію транскрипції (наприклад, послідовність ТАТА);

2) енхансери (підсилювачі) – регуляторні послідовності, що значно підвищують рівень транскрипції.

3) термінатори – це специфічні послідовності, у яких припиняється транскрипція і трансляція (стоп-кодони).

3. Гени рослин

Розмір геному рослин складає 50 тис.-100 тис. генів, що залежить від таксономічної групи. Для жодного виду точна кількість не встановлена у зв'язку зі складністю секвенування.

Особливості геному рослин:

1) клітини окремих органів рослини мають однакову кількість потенційно активних генів.

2) у всіх органах рослин експресуються загальні гени – «гени домашнього господарства», що кодують ферменти, необхідні для всіх клітин рослин;

3) клітини кожного з органів мають набори генів, що експресуються лише в цьому органі;

4) рослинні клітини об'єднує три відносно автономні генетичні системи: ядерну, мітохондріальну, пластидну.

4. Методи генетичної інженерії

ДНК-технології, або **технології рекомбінантних ДНК** передбачають:

1) виділення окремих генів (або їх синтез);

2) молекулярне клонування генів;

3) створення рекомбінантної ДНК.

Виділення та молекулярне клонування генів здійснюється за допомогою ферментів трьох видів:

1) рестриктаз;

2) лігаз;

3) зворотніх транскриптаз (ревертаз).

Рестриктази (різновид дезоксирибонуклеаз) – бактеріальні ферменти, які розрізають ДНК на короткі чи довгі відрізки, на окремі нуклеотиди. їх особливістю є специфічність – кожна з них розрізає ДНК у строго визначеному місці між окремими нуклеотидами, так званих сайтах рестрикції. Відомо більше 100 рестриктаз.

Лігази – ферменти, які «зшивають» вільні кінці ДНК шляхом утворення фосфодіефірного зв'язку між 5'-кінцем одного полінуклеотиду та 3'-кінцем іншого, внаслідок чого утворюється єдиний полінуклеотид більшого розміру. Вони беруть участь у синтезі ДНК під час реплікації, рекомбінації та репарації (відновленні структури ДНК після пошкодження).

Зворотні транскриптази (РНК-залежні ДНК полімерази, ревертази) – ферменти, подібні до ДНК-полімерази, проте синтезують ДНК не на ланцюзі ДНК, а й на РНК (що характерно для РНК-вмісних вірусів).

Клоновані гени переносять у клітину (трансформують її) за допомогою векторів, використовуючи плазміди бактерій, а також бактеріофаги, віруси, транспозони.

Плазміда (епісома) – позахромосомний генетичний елемент (переважно у бактерій), який є кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК. Вона перешкоджає потраплянню в клітину інших плазмід того самого типу з використанням принципа несумісності.

Звичайно плазміду розрізають рестриктазами в одному місці, вводять туди потрібні гени, додають лігазу, яка знову замикає кільцеву структуру ДНК плазміди з внесеним чужорідним геном. Потім плазміди шляхом «зараження» переносять у будь-які клітини, де починають працювати нові гени, внесені у складі плазміди.

Прийоми експериментального втручання, які дають змогу по раніше наміченому шляху перебудувати геном організмів, змінюючи його генетичну інформацію, покладено в основу генетичної (генної) інженерії. В це поняття не входить перебудова геному звичайними генетичними методами — штучно спричиненими (індукованими) мутаціями та рекомбінаціями внаслідок схрещувань.

Класичними процесами (методами) генетичної інженерії вважаються:

1) синтез генів поза організмом;

2) виділення із клітин окремих генів, фрагментів хромосом, цілих хромосом, клітинних ядер, інших органел (зокрема, пластид);

3) цілеспрямована перебудова виділених структур;

4) копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів чи генетичних структур;

5) перенесення та введення таких генів чи генетичних структур у геном, який потрібно змінити (трансгеноз);

6) експериментальне поєднання різних геномів у одній клітині.

Методи ДНК-технологій дають змогу отримувати рекомбінантні ДНК з фрагментів геномів різних організмів, клонувати такі штучно створені молекули, вводити їх у клітину і створювати умови для експресії. Маніпуляції в цьому випадку здійснюються з молекулами ДНК, і перенесення генів (трансгеноз) не залежить від спорідненості організмів. В цьому полягає основна відмінність генної інженерії від традиційних методів перебудови генотипів. Однак ця особливість генетичної інженерії не означає, що лише шляхом штучного введення в геном чужого гена або сукупності генів можна відразу отримати новий сорт чи клітинний штам. Слід пам'ятати, що будь-яке штучне втручання в геном різко змінює генетичний баланс і може призвести до геномного стресу, наслідком якого є зниження життєздатності, продуктивності клітин та організмів. Крім того, в окремих випадках перенесений ген у чужому генотиповому оточенні з низки причин може зовсім не функціонувати, для його експресії необхідні додаткові (порівняно складні) генно-інженерні втручання. Ці обмеження генетичної інженерії змушують розглядати її як ефективний шлях створення принципово нового вихідного матеріалу, який потребує подальшого вдосконалення шляхом селекції.

Трансформація (трансгеноз, перенос) клонованих генів здійснюється двома способами:

1) за допомогою векторів;
2) методами прямого переносу.

5. Перенесення генів в реципієнті клітини за допомогою векторів

Створення ефективних систем векторів для перенесення генів — один з найважливіших напрямів генної інженерії, що розвивається досить інтенсивно.

На сьогодні сконструйовано спеціальні вектори для перенесення (трансформації) чужорідних генів у клітини вищих рослин. Серед існуючих і потенційно можливих векторів виділяють такі групи:

1) вектори, отримані на основаі бактеріальних плазмід, здатних інтегруватись у геном рослини-реципієнта (Ті-плазміди агробактерій *A. tumefaciens* та Ri-плазміди *A. rhizogenes)',*
2) вектори, сконструйовані на основі ДНК вірусних і віроїдних патогенів рослин;
3) вектори, які можуть існувати в рослинних клітинах як незалежні реплікони (мітохондріальні та хлоропластні ДНК);

вектори, отримані на основі мобільних генетичних елементів.

Найперспективніші вектори сконструйовані на основі плазмід Ті та Ri. Взаємовідносини між ґрунтовою бактерією *A. tumefaciens* і дводольними рослинами спричинюють утворення корончастих галів, а бактерії *A. rhizogenes* – утворення «бородатих коренів». Це є прикладом природної генетичної інженерії.

Ідеальна векторна система на основі тДНК має відповідати таким вимогам:

1) містити сигнали, необхідні для перенесення і стабільної інтеграції ДНК у ядро рослин;

2) містити інфомацію, потрібну для забезпечення цих процесів;

3) не мати функцій, що могли б перешкоджати регенерації рослин;

4) мати систему для експресії генів, уведених у рослинні клітини;

5) мати маркер, що дає змогу добирати трансформовані клітини;

6) забезпечувати простий спосіб введення чужорідної ДНК у цей вектор.

6. Методи прямого переносу генів в реципієнті клітини

Пряме перенесення генів полягає у введенні їх у клітини (протопласти) рослини крізь плазматичну мембрану. Це можливо тому, що ДНК здатна проходити крізь останні.

Перші експерименти з генетичної трансформації рослин були проведені на протопластах прямою обробкою ДНК з використанням селективних генів. Частіше використовували і використовують дотепер ген неоміцинфосфотрансфе-рази II (nptll) бактеріального походження, що визначає стійкість до канаміцину і деяких інших аміноглікозидних антибіотиків. Значною перевагою цього гена є здатність надавати лише трансформованим клітинам змоги до росту і позеленіння за певних концентрацій цих антибіотиків в живильному середовищі. Його немає в геномі вищих рослин, тому, без сумнівно, це не прояв будь-якої інтродукованої ознаки активацією «мовчазного» гена.

Доведено, що в регенерованих рослин відсутні химерність і мозаїчність, ген передається нащадкам під час запилення рослин, стабільний, успадкування відбувається за законами Менделя і ген достатньо стійко підтримується як в гомозиготному, так і в гетерозиготному стані. Частота перенесення за прямої трансформації варіює від 10^{-3} до 10^{-2}.

Останнім часом у разі прямої обробки ДНК почали використовувати репор-терний ген, що кодує синтез зеленого флюоресцентного білка' (gfp від green fluorescent protein) медузи. Експресію гена gfp визначають за ультрафіолетового освітлення, не вбиваючи зразок, що аналізують.

Репортерний ген – це привнесений ген, експресія якого не надає клітині будь-яких селективних переваг, однак призводить до появи будь-якого забарвлення як у разі обробки специфічними субстратами, так і в інтактній системі. Ре-ортерні гени знайшли надзвичайно широке застосування в генетичній інженерії рослин як спосіб швидкої і недорогої детекції трансформації рослинної клітини. Першими репортерними генами були гени нопалін- та октопінсинтази агробактерій. Активність цих генів призводить до накопичення в трансформованих тканинах рослин особливих речовин опінів, які легко визначаються після електрофорезу та специфічного забарвлення. Пізніше почали використовувати репортерний ген GUS (В-глюкуронідазу). Трансгенні клітини, що експресують цей ген, за перенесення на специфічний субстрат забарвлюються в блакитний колір.

Метод прямої обробки протопластів ДНК має чимало суттєвих недоліків, серед яких головними є складність процедури отримання протопластів, відсутність регенерації рослин із протопластів для багатьох видів, можливість появи сомаклональних варіантів і значний термін від моменту ізолювання протопластів до отримання трансгенних рослин.

Існує кілька чинників, що можуть стимулювати збільшення частоти трансформації цим методом:

1) *електропорація* – вплив електричним полем;
2) *ступінь соніфікації* – вплив ультразвуком;
3) *тепловий шок*;
4) *особливості генетичних конструкцій;*
5) ступінь гомологічної рекомбінації;
6) концентрація і молекулярна маса поліетиленгліколю (ПЕГ);
7) якість і синхронізація протопластів;
8) умови культивування протопластів після трансформації;
9) послідовність додавання ДНК і ПЕГ.

Поширеною модифікацією методу прямої обробки протопластів є **електропорація (електропульсація)**. Суть її полягає в тому, що об'єкти обробляються дуже нетривалими електроімпульсами за наявності

екзогенної ДНК. Вважається, що в результаті електропульсації утворюються тимчасові транспортні канали, через які і відбувається проникнення макромолекул. Для трансформації можуть бути використані лінійні й суперспіралізовані плазміди. Проте лінійні ДНК приблизно у 10 разів ефективніші для стабільної трансформації. Додавання ДНК-носія (наприклад, ДНК молочка лосося, обробленої ультразвуком), вдвічі збільшує частоту стабільної трансформації.

За допомогою електропорації отримано трансгенні рослини кукурудзи, пшениці, тополі та деяких інших видів. При цьому ефективність трансформації досягає 10%. Генетичний аналіз генів, вбудованих електропорацією протопластів показав, що вони успадковуються за Менделем із розщепленням 3:1 у разі самозапилення та 1:1 за перехресного запилення з вихідним генотипом.

Технічно складнішим є **метод мікроін'єкції ДНК**, який застосовується для трансформації рослин. Наприклад, за його допомогою в незрілих зародках пшениці вивчали частоту перенесення репортерного гена GUS і селектованого гену bar. Ефективність перенесення цим методом становила близько 1 %. Вивченням нащадків у п'яти поколіннях практично не виявлено втрати активності транс-генів і відхилення від менделівського розщеплення.

Мікроін'єкція археспоріальної тканини кукурудзи перед стадією мейозу, кокультивування (за слідом пилкової трубки) ДНК з генами cat, nptll показала інтеграцію трансгенів і їх експресію протягом 6—8 статевих поколінь. Серед них відібрані ранньоквітучі, низько- і високорослі, стійкі проти посухи форми рослин, які мають селекційну цінність.

Таким чином, пряме перенесення генів у протопласти досягається:

1) механічним шляхом;

2) за дії певних хімічних речовин, наприклад ПЕГ за наявності Ca^{2+}, полівінілового спирту та ін.;

3) електропорацією (під дією електричного струму), в основі чого лежить пробивання електричним струмом клітинних мембран; протопласти разом з ДНК вміщують у середовище для електропорації, до складу якого входить маніт, певний час виропгують (інкубують), а потім переносять до кювети з електродами

і пропускають електроімпульс високої напруги (1—2 кВ/см) тривалістю від мікросекунди до десятків мілісекунд;

4) мікроін'єкціями; вони можуть бути надійним засобом перенесення чужорідних генів як у рослинні, так і тваринні клітини; виходячи з того що клітини і тканини можна ефективно застосовувати ін'єкції, то цей метод, вважається одним із важливих і перспективних; зокрема, за допомогою мікрокапіляра у клітини мезофілу листка вводять незначну кількість (близько 2 пкл) розчину ДНК, після чого виживає 50—90 % клітин (ДНК вводять в ядро, цитоплазму), близько 90 % з них регенерують трансгенні рослини.

Серед недоліків прямого перенесення слід назвати такі:

1) необхідність роботи з протопластами, що пов'язано з труднощами під час роботи з багатьма важливими сільськогосподарськими культурами;

2) технічно складна процедура іммобілізації протопластів;

3) технічно складне введення ізольованої ДНК за допомогою спеціальних мікропіпеток.

Переваги порівняно з іншими методами полягають у такому:

1) відсутність видової специфічності рослини, що трансформується;

2) можливість зробити ін'єкцію ДНК не лише у протопласт, а й у інші клітини рослини – пилок, яйцеклітини, зародки, ембріоїди, невеликі агрегати клітин, регенерація рослин з яких не така складна, як з протопластів;

3) методами мікроін'єкцій можна маніпулювати не лише з ДНК, а й переносити клітинні органели та окремі хромосоми.

7. Аналіз трансформованих клітин

Для виявлення експресії гена, включеного в тДНК, розрізняють трансформовані і нетрансформовані рослинні клітини за допомогою селективного маркера (наприклад, стійкість до антибіотиків). Позитивні результати отримані в дослідах із тютюном після введення в нього химерних генів, сконструйованих із промотора нопалінсинтетази, бактеріального гена стійкості до канаміцину і термінуючих сигналів нопалінсинтетазного гена. Рослинні клітини з химерними генами стають стійкими до канаміцину. Химерні гени використовують як домінантні селективні маркери для добору трансформованих клітин, з яких потім регенерують фенотипово

нормальні фертильні рослини. У таких рослин ген стійкості експресується у всіх тканинах і успадковується за законами Менделя.

8. Фенотипова і технологічна характеристики трансгенних рослин

Дослідження впливу перенесених генів на фенотип і господарсько цінні ознаки трансформованих рослин і їх нащадків є обов'язковим етапом програм із застосуванням методів генної інженерії.

Показано, що велика частина трансформованих рослин томатів із NPTII-геном мали нормальний фенотип, давали плоди і життєздатне насіння. Трансгенні рослини *Brassica napus* мали нормальну морфологію і були фертильними. Аналогічні результати отримані для рослин томатів, що включають ген Bxn (кодують фермент бромоксинілнітрилазу) і тютюну з високим рівнем експресії хітинази, а також гена білкової оболонки ВТМ і його антисмислової РНК.

Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що введення одного або кількох генів негативно не впливає на господарсько цінні ознаки трансформованого сорту. Отже, введення нових генів, що визначають важливі господарські ознаки, сприяє вдосконаленню існуючих сортів і гібридних рослин.

9. Стан та перспективи генно-інженерних досліджень у рослинництві

У світі вже вирощуються генетично змінені сорти сої, кукурудзи, рису, томатів, ріпаку. Розроблені методи отримання рослин, котрі не поглинають з ґрунту важкі метали, що особливо важливо для промислових районів, де концентрація важких металів у ґрунті безперервно зростає. Створені сорти здатні активно накопичувати різні корисні речовини: одні з них дають олію поліпшеного складу, інші – синтезують продукти, потрібні для виготовлення ліків, ще інші – визначаються збалансованим вмістом незамінних амінокислот.

У 2002 р. світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн га, що майже вдвічі перевищує територію Англії. Порівняно з 1996 р. світові площі під трансгенними культурами зросли у 35 разів (з 1,7 млн га у 1996 р. до 58,7 млн га у 2002 р.). Такі високі темпи зростання посівних площ свідчать про зростаючу довіру до результатів біотехнологічних досліджень, зокрема, генно-інженерних технологій з боку виробників сільськогосподарської продукції не лише у розвинених країнах, але і у тих, що розвиваються. Так, у розвинених країнах посівні площі під трансгенними культурами у

2002 р. становили 42,7 млн га, а у країнах, що розвиваються, — 16,0 млн га.

Перспективні напрями генно-інженерних досліджень у рослинництві:

1) підвищення загальної продуктивності рослин;
2) поліпшення якості рослинної продукції;
3) поліпшення зберігання;
4) зміна вмісту вуглеводів;
5) стійкість проти гербіцидів;
6) стійкість проти вірусів і віроїдів;
7) стійкість проти грибних патогенів;
8) стійкість проти бактеріозів;
9) стійкість проти шкідників;
10) стійкість проти абіотичних стресових чинників;
11) отримання чоловічостерильних форм;
12) зміна забарвлення квіток

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве / А. Атанасов. – Новосибирск : ИЦиГСО РАН, 1993. – 242 с.

2. Биотехнология сельскохозяйственных растений / пер. с англ. В. И. Негрука; с предисл. Р. Г. Бутенко. – М. : Агропромиздат, 1987. – 301 с.

3. Биотехнология – сельскому хозяйству / А. Г. Лобанок, М. В. Залашко, Н. И. Анисимова и др.; под ред. А. Г. Лобанка. – Мн. : Ураджай, 1988. – 199 с.

4. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

5. Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение растений / В. А. Высоцкий; отв. ред. Р. Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология – М. : Наука, 1986. – С. 91–102.

6. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала / Г. Лейке, Р. Лабес, К. Эртель, М. Петерсдорф. – М. : Колос, 1980. – 77с.

7. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. думка, 1980. – 488 с.

8. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 96 с.

7. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин : підруч. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.

8. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / С. Г. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. И. Тихоненко, М. И. Прокофьев. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.

9. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. / под ред. В. С. Шевелухи. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.

10. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* / Г. Хасси // Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М., 1987. – С. 105–133.

Навчальне видання

Манушкіна Тетяна Миколаївна

БІОТЕХНОЛОГІЯ В РОСЛИННИЦТВІ

курс лекцій

Відповідальний за випуск: В.В. Гамаюнова

Формат 60х84 1/16. Ум. друк. арк. 3,12.
Тираж 50 прим. Зам. №___

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької комуни, 9

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