

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН**

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК

ОДЕСА  
ОНУ  
2015

УДК 58:60(075.8)  
ББК 28.5я73  
3-15

Рекомендовано до друку рішенням  
Науково-методичної ради ОНУ імені І. І. Мечникова.  
Протокол № 1 від 16 жовтня 2014 р.

**Рецензенти:**

**Б. Н. Мілкус** – доктор біологічних наук, професор агробіотехнологічного факультету Одеського державного аграрного університету;

**С. О. Ігнатова** – доктор біологічних наук, професор, завідувач лабораторії культури тканин відділу геноміки і біотехнології СГІ-НЦНС;

**Г. І. Стручаєва** – кандидат хімічних наук, доцент кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету.

**Науковий редактор:**

**В. М. Тоцький** – доктор біологічних наук, професор Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

**Задерей Н. С.**

**3-15 БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН:** Навчально-методичний посібник / Н. С. Задерей, Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2015. – 84 с.  
ISBN 978-617-689-132-1

У посібнику висвітлені механізми біотехнологічних процесів, які використовують при створенні сортів сільськогосподарських культур із заданими властивостями. Описані сучасні методи подолання генетичної несумісності при віддаленій гібридизації завдяки використанню запліднення *in vitro* та ембріокультури, отримання дигаплоїдів через андрогенез, гіногенез та за допомогою використання гаплопродусерів, а також використання мікроклонального розмноження для прискорення селекційного процесу.

Посібник рекомендований студентам та викладачам університетів, які мають загальнобіологічний або сільськогосподарський напрямки навчання, а також вчителям біології середніх учбових закладів (шкіл, гімназій, ліцеїв тощо).

**УДК 58:60(075.8)**  
**ББК 28.5я73**

ISBN 978-617-689-132-1

© Н. С.Задерей, 2015  
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b>	5
<b>Розділ 1. ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОГО КУРСУ «БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН»</b>	7
1.1. Місце дисципліни в навчальному процесі	7
1.2. Мета курсу, вимоги до знань та вмінь студентів	7
1.3. Структура навчальної дисципліни «Біотехнологія рослин»	8
1.4. Зміст навчальної дисципліни	8
1.5. Теми семінарських занять	12
1.6. Теми лабораторних занять	12
1.7. Структура залікового кредиту курсу	13
1.8. Методи оцінювання знань студентів	14
1.8.1. Залікові запитання з повною відповіддю	14
1.8.2. Запитання для тестового контролю	15
1.8.3. Запитання комплексної контрольної роботи	23
<b>Розділ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН ЯК НАУКА</b>	26
2.1. Основні етапи розвитку біотехнології рослин	27
2.2. Культура клітин та тканин вищих рослин	30
2.3. Характеристика поживних середовищ	31
2.4. Головні вимоги до лабораторії	32
2.5. Методика культивування тканин рослин	33
2.6. Типи культур клітин і тканин	36
2.7. Регенерація рослин з калюсних тканин. Органогенез. Ембріогенез	38
2.8. Технології на основі культури рослинних клітин і тканин	42
2.8.1. Виробництво біологічно активних речовин рослинного походження	43
2.8.2. Біотрансформація речовин ферментним апаратом рослинних клітин	45

2.8.3. Клональне розмноження і оздоровлення рослин	45
2.8.4. Культура гаплоїдних клітин	46
2.8.5. Культура ізольованих зародків (ембріокультура)	53
2.8.6. Запліднення in vitro	55
2.8.7. Культура ізольованих протопластів	56
2.8.8. Парасексуальна (соматична) гібридизація	61

### **Розділ 3. ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ ДО КУРСУ «БІОТЕХНОЛОГІЯ**

<b>РОСЛИН</b>	<b>70</b>
<b>Лабораторна робота № 1.</b> Принципи та методи вирощування ізольованих клітин і тканин рослин	70
<b>Лабораторна робота № 2.</b> Мікроклональне розмноження рослин in vitro на прикладі винограду	72
<b>Лабораторна робота № 3.</b> Культура пиляків in vitro	73
<b>Лабораторна робота № 4.</b> Методи отримання та культивування протопластів мезофіла листа	74
<b>Лабораторна робота № 5.</b> Індивідуальне культивування протопластів у мікрокраплях	76
<b>Лабораторна робота № 6.</b> Методи клітинної інженерії рослин. Отримання соматичних гібридів	77
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ</b>	<b>80</b>
<b>СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b>	<b>81</b>

## ВСТУП

Біотехнологія є одним із пріоритетних наукових напрямків, який сьогодні розвивається в усіх країнах світу. Інтенсивні темпи росту чисельності населення нашої планети і збільшення споживання природних ресурсів, за поступового зменшення площі родючих земель, не дозволяють продовжувати розвиток народного господарства традиційними методами. У зв'язку з цим в усіх розвинутих державах Західної Європи, США, Японії, Китаї створені фірми з багатомільйонними капіталами, які на основі методів біотехнології організують виробництво кормів, продуктів харчування, медичних препаратів, сировини для біопалива. Розвиток Української державності теж пов'язаний з введенням нових ефективних технологій у виробництво. Упровадження складних біотехнологій на підприємствах легкої промисловості потребує створення ринку висококваліфікаційних спеціалістів, які зуміли б обслуговувати ці технологічні процеси або забезпечити їх подальше ускладнення та розвиток. Підготовка спеціалістів необхідної кваліфікації покладається на вищі навчальні заклади, які мають відповідний напрямок навчання. Для забезпечення якості навчального процесу необхідним є повне забезпечення студентів науковою літературою. На жаль, національні ВНЗ України не можуть похвалитися достатньою кількістю підручників, виданих українською мовою, що дуже ускладнює викладання предмета. Особливістю даного посібника є те, що він має на меті забезпечити процес засвоєння матеріалу не тільки завдяки опануванню теоретичних знань та самостійної перевірки якості отриманих знань за допомогою відповідей на представлені запитання для самоконтролю, але й набуття студентами певних практичних навичок завдяки виконанню наведених у посібнику практичних робіт. Такий двохсторонній підхід до засвоєння знань забезпечує більш високий рівень підготовки спеціалістів, особливо якщо звернути увагу на те, що біотехнологія не є тільки теоретичною галуззю науки в чистому вигляді, а представляє собою

переплетення наукових знань з практичним, часто промисловим використанням теоретичних набутоків.

Біотехнології, що застосовуються для представників різних царств організмів, мають певні відмінності, пов'язані з особливостями морфології, фізіології цих організмів, тому ми вважаємо за доцільне розглянути як окремі розділи:

- біотехнологію рослин;
- біотехнологію тварин;
- біотехнологію мікроорганізмів.

Даний науково-методичний посібник забезпечить студентам можливість опанувати потрібні знання та навички в галузі біотехнології рослин.

## **Розділ 1**

### **ПРОГРАМА НАВЧАЛЬНОГО КУРСУ «БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН»**

#### **1.1. Місце дисципліни в навчальному процесі**

Спецкурс викладається студентам III курсу денної форми навчання за спеціальністю „Біологія” в VI семестрі.

Дисциплінами, що забезпечують курс „Біотехнологія рослин”, є ботаніка, морфологія та анатомія рослин, цитологія, генетика, хімія, молекулярна біологія. Під час вивчення спецкурсу відбувається систематизація та закріплення знань, які були отримані студентами в процесі вивчення вищевказаних дисциплін. Знання, які отримують студенти після проходження спецкурсу, є необхідною складовою професійних знань та вмінь для роботи в науково-дослідних лабораторіях.

#### **1.2. Мета курсу, вимоги до знань та вмінь студентів**

Мета курсу – забезпечити наявність у бакалаврів необхідний рівень знань та навичок з біотехнології рослин, передбачений чинними Державними освітніми стандартами (ОКХ і ОПП бакалавра-біолога). За вивчення спеціального курсу „Біотехнологія рослин” студенти повинні:

- зрозуміти механізми біотехнологічних процесів, які використовуються при створенні сортів сільськогосподарських рослин з заданими властивостями;
- знати сучасні технології створення та приклади практичного використання трансгенних рослин, стійких проти біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища;
- вміти активно використовувати дані літератури для визначення правильного напрямку дослідів з метою збільшення генетичного різноманіття серед значимих для людини представників царства Рослини.

### 1.3. Структура навчальної дисципліни «Біотехнологія рослин»

Структурні показники	Галузь знань, напрям підготовки, освітньо-кваліфікаційний рівень	Характеристика навчальної дисципліни
		<i>Денна форма навчання</i>
Кількість кредитів – 1,5	Галузь знань 0401 Природничі науки (шифр і назва)	Нормативна дисципліна
	Напрямок підготовки 6.040.102 „Біологія”	
Модулів – 1	Спеціальність 6.040.102 - біологія	<b>Рік підготовки:</b>
Змістових модулів – 2		3-й
Індивідуальне науково-дослідне завдання – не передбачено		<b>Семестр</b>
Загальна кількість годин - 54		6-й
		<b>Лекції</b>
Тижневих годин для заочної форми навчання: аудиторних – 0; самостійної роботи студента – згідно навчального плану	Освітньо-кваліфікаційний рівень: бакалавр - 6070402	20 год.
		<b>Практичні, семінарські</b>
		4 год.
		<b>Лабораторні</b>
		10 год.
		<b>Самостійна робота</b>
		20 год.
ІНДЗ: не передбачене		
Вид контролю: залік		

### 1.4. Зміст навчальної дисципліни

#### ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ I. Біотехнологія рослин як наука

**ТЕМА 1. Предмет, задачі та значення біотехнології. Історія розвитку біотехнології.**

Сучасні уявлення про біотехнологію. Характеристика визначень біотехнології. Предмет біотехнології, „біотехнологічна” і „технологічна” частини. Роль біотехнології у вирішенні продовольчої та енергетичної проблем, проблем медицини, екології та охорони довкілля. Використання трансформованих організмів в неконтрольованих умовах зовнішнього середовища. Отримання за допомогою трансформованих організмів



принципово нових речовин, що не мають природних аналогів – майбутні етапи розвитку біотехнології.

*ТЕМА 2. Культура тканин та клітин рослин in vitro як основний метод біотехнології рослин.*

Історія розвитку методу культури тканин in vitro. Типи середовищ для культивування тканин та клітин рослин (макроелементи, мікроелементи, органічні добавки, фізіологічно-активні речовини). Принципи культивування тканин. Вимоги до лабораторії біотехнології рослин.

*ТЕМА 3. Дедиференціювання рослинних клітин та калюсоутворення in vitro. Типи морфогенезу в культурі рослин.*

Роль генотипу вихідної рослини. Генетичний контроль індукції та росту калюсу. Калюсоутворення як результат взаємодії генотип – середовище. Основні фактори дедиференціювання та калюсоутворення. Довгостроково вирощувані (субкультивовані) культури. Шляхи індукції органогенезу у калюсній культурі. Залежність ініціації органогенезу від балансу ендогенних фітогормонів. Соматичний ембріогенез.

*ТЕМА 4. Мінливість геному соматичних клітин in vitro. Причини, механізми та наслідки мутагенезу in vitro.*

Генетичні зміни клітин, індуковані їх ізоляцією. Мінливість ДНК в ізольованих клітинах. Структурна мінливість хромосом в ізольованих клітинах. Мінливість числа хромосом в культурі клітин. Рівень та типи аберацій хромосом у первинних калюсах різних видів рослин. Вплив умов вирощування вихідних рослин на мінливість калюсних клітин. Причини та механізми геномної мінливості за диференціювання та калюсоутворення. Сомаклони як рослини-регенеранти зі зміненими ознаками. Генетичний аналіз соматиклонів. Спектр мінливості у рослин-регенерантів. Гаметоклональна мінливість.

*ТЕМА 5. Мікроклональне розмноження та оздоровлення рослин за допомогою культури меристем.*

Умови культивування тканин, особливості вмісту середовищ для культивування, роль генотипу та виду експланта для підвищення ефективності

методу. Можливість використання методу для оздоровлення рослин від вірусних інфекцій.

*ТЕМА 6. Гаплоїдія. Андрогагенез. Гіногагенез. Значення дигаплоїдів для селекції рослин.*

Культивування пиляків та пилку. Морфогенетичні процеси в індукованих мікроспорах незрілих пиляків. Типи морфогенезу незрілих пилкових зерен. Фактори, що впливають на процес андрогагенезу. Продуктивний морфогенез (ембріодогенез). Роль генотипу, фізіологічного стану вихідної рослини та експланта, умов культивування для розвитку андрогагенних структур. Гібридні зародки як джерело гаплоїдів. Гіногагенез. Регенерація та особливості гаплоїдних рослин. Диплоїдизація гаплоїдів.

*ТЕМА 7. Ембріокультура. Основні підходи до отримання віддалених гібридів з використанням методів культури in vitro.*

Генетичні механізми стерильності віддалених гібридів. Введення стерильних гібридів у культуру in vitro. Умови, що забезпечують культивування зрілих і незрілих зародків насінини. Спонтанна та індукована поліплоїдизація амфігаплоїдних клітин гібридів. Отримання регенерантів з подвоєним числом хромосом. Шляхи використання ембріокультури. Технологія запилення і запліднення в культурі in vitro.

*ТЕМА 8. Роль біотехнології у вирішенні проблем селекції та генетики.*

Використання досягнень біотехнології рослин у сучасній селекційній практиці. Використання культур тканин для виробництва біологічно активних речовин. Використання культури тканин та рослин для швидкого клонального мікророзмноження та оздоровлення рослин від вірусів.

## **ЗМІСТОВИЙ МОДУЛЬ 2. Клітинна та генетична інженерія рослин**

*ТЕМА 9. Методи отримання протопластів рослин. Методи отримання соматичних гібридів за допомогою злиття протопластів.*

Культура ізольованих протопластів та парасексуальна гібридизація рослин. Вихідний матеріал для виділення протопластів. Методи виділення

протопластів. Злиття протопластів та отримання парасексуальних гібридів. Принципи соматичної гібридизації.

*ТЕМА 10. Типи соматичних гібридів. Значення соматичних гібридів для селекційної практики.*

Генетичні особливості соматичних гібридів. Типи соматичних гібридів. Генетична комплементация як метод добору гібридних рослин. Методи аналізу соматичних гібридів. Практичне застосування соматичної гібридизації.

*ТЕМА 11. Генетична інженерія – новий напрямок біотехнології.*

Визначення поняття генетичної інженерії. Передумови виникнення генетичної інженерії. Ферменти, що виконують роль інструментів в генетичній інженерії. Характеристика ферментів, що використовуються для отримання фрагментів ДНК. Використання рестриктаз в генетичній інженерії.

*ТЕМА 12. Способи отримання генів.*

Методи безпосереднього отримання генів з природного генетичного матеріалу. Отримання генів шляхом хіміко-ферментного синтезу. Метод ферментного синтезу генів. Виділення мРНК та використання її за матрицю для отримання кДНК шляхом зворотної транскрипції.

*ТЕМА 13. Конструювання та клонування рекомбінантних ДНК.*

Характеристика векторних молекул. Визначення поняття вектора в біології. Властивості векторів, їх здатність до автономної реплікації, наявність селективного маркера. Складові елементи вектора на основі плазмід. Будова Ті-плазмід та Rі-плазмід. Вектори рослин на основі Ті-плазмід та Rі-плазмід.

*ТЕМА 14. Сучасний стан дослідів з трансформації рослин. Проблеми та перспективи.*

Використання методів генетичної інженерії для створення рослин, стійких до фітопатогенів, комах, ранніх заморозків, гербіцидів, які мають покращені харчові якості (покращений амінокислотний склад білків, підвищений вміст білків, підвищений синтез ефірних масел та інших речовин вторинного походження).

## **1.5. Теми семінарських занять**

Метою семінарських занять є поглиблення та систематизація знань, розвиток загальної культури мови, формування вміння ставити і аргументовано відповідати на запитання, ставити і вирішувати проблемні питання і завдання з теми, яку вивчають.

**Тема 1.** Роль біотехнології у вирішенні проблем селекції та генетики.

### ***Питання для обговорення:***

1. Отримання міжвидових та міжродових гібридів методами ембріокультури.
2. Прискорення процесу отримання чистих ліній через андрогенез чи гіногенез в культурі *in vitro*.
3. Підвищення ефективності розмноження цінних форм рослин. Приклади сучасних досягнень в цій області.
4. Оздоровлення рослин за допомогою культури меристем.
5. Практичне використання методу соматичної гібридизації. Приклади сучасних досягнень.

**Тема 2.** Сучасний стан дослідів з трансформації рослин. Проблеми та перспективи.

### ***Питання для обговорення:***

1. Області застосування генетичної інженерії та практичне використання трансгенних організмів.
2. Естетичні питання генетичної інженерії.

## **1.6. Теми лабораторних занять**

1. Принципи та методи вирощування ізольованих клітин і тканин рослин.
2. Мікроклональне розмноження рослин *in vitro* на прикладі винограду.
3. Культура пиляків *in vitro*.
4. Методи отримання та культивування протопластів мезофіла листа.
5. Індивідуальне культивування протопластів у мікрокраплях.
6. Методи клітинної інженерії рослин. Отримання соматичних гібридів.

### 1.7. Структура залікового кредиту курсу ( тематика і кількість годин )

Тема	Лекції	Семінар-ські заняття	Лабора-торні заняття	Само-стійна робота
<b>Змістовий модуль 1. Біотехнологія рослин як наука</b>				
<i>Тема 1.</i> Предмет, задачі та значення біотехнології. Історія розвитку біотехнології.	2			1
<i>Тема 2.</i> Культура тканин та клітин рослин in vitro як основний метод біотехнології рослин.	2		2	1
<i>Тема 3.</i> Дедиференціювання рослинних клітин та калюсоутворення in vitro. Типи морфогенезу в культурі рослин.	2			1
<i>Тема 4.</i> Мінливість геному соматичних клітин in vitro. Причини, механізми та наслідки мутагенезу in vitro.	1			1
<i>Тема 5.</i> Мікроклональне розмноження та оздоровлення садівного матеріалу за допомогою культури меристем.	1		2	1
<i>Тема 6.</i> Гаплоїдія. Андрогенез. Гіногенез. Значення дигаплоїдів для селекції рослин.	2		1	1
<i>Тема 7.</i> Ембріокультура. Основні підходи до отримання віддалених гібридів з використанням методів культури in vitro.	2			1
<i>Тема 8.</i> Роль біотехнології у вирішенні проблем селекції та генетики.	1	2		1
<b>Змістовий модуль 2. Клітинна та генетична інженерія рослин</b>				
<i>Тема 9.</i> Методи отримання протопластів рослин. Методи отримання соматичних гібридів за допомогою злиття протопластів.	2		1	2
<i>Тема 10.</i> Типи соматичних гібридів. Значення соматичних гібридів для селекції та генетики.	1		2	2
<i>Тема 11.</i> Генетична інженерія – новий напрямок біотехнології.	1		2	2
<i>Тема 12.</i> Способи отримання генів.	1			2
<i>Тема 13.</i> Конструювання та клонування рекомбінантних ДНК.	1			2
<i>Тема 14.</i> Сучасний стан дослідів з трансформації рослин. Проблеми та перспективи.	1	2		2
<b>Всього годин</b>	<b>20</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

## **1.8. Методи оцінювання знань студентів**

Оцінювання знань студентів можна проводити як на підставі усної співбесіди, так і внаслідок виконання студентами письмової контрольної роботи або проходження комп'ютерного тестування.

Рекомендовані до заліку запитання наведені нижче двома блоками:

1. Залікові запитання з повною відповіддю;
2. Залікові запитання у вигляді тестів.

### **1.8.1. Залікові запитання з повною відповіддю**

1. Біотехнологія як наука. Предмет та задачі біотехнології.
2. Історія розвитку біотехнології.
3. Основні напрямки біотехнологічних досліджень.
4. Метод культури тканин та клітин рослин *in vitro*. Історія розвитку метода.
5. Основні типи поживних середовищ. Вплив фізіологічно активних речовин на процеси де- та диференціації в культурі *in vitro*.
6. Типи морфогенезу в калюсних тканинах в залежності від умов культивування.
7. Мікроклональне розмноження рослин.
8. Оздоровлення рослин завдяки культурі меристем.
9. Андрогагенез.
10. Гіногагенез.
11. Значення дигаплоїдів для селекції.
12. Віддалена гібридизація рослин. Гаметофітна та спорофітна несумісність при міжвидовій гібридизації.
13. Використання гаплопродюсерів для отримання міжвидових та міжродових гібридів.
14. Отримання вторинних метаболітів з калюсних культур рослин.
15. Характеристика протопластів. Методи отримання.
16. Методи злиття протопластів.
17. Види соматичних гібридів, значення їх для селекції.







	<p>в) можливість отримати гібридні форми рослин</p> <p>г) можливість отримати соматоклональні варіанти</p>
17.ПФ.С.01.01.09	<p>1. Оздоровлені рослини можна отримати за допомогою таких прийомів, як:</p> <p>а) соматична гібридизація</p> <p>в) брунькування</p> <p>б) віддалена гібридизація</p> <p>г) мікроклональне розмноження</p> <p>2. Виберіть прийоми, що допоможуть оздоровити рослини під час культивування їх в умовах <i>in vitro</i>:</p> <p>а) отримання культури меристем</p> <p>б) отримання калюсної тканини</p> <p>в) термообробка донорних рослин</p> <p>г) додавання антибіотиків в середовище, яке використовується для культивування</p>
17.ПФ.С.01.01.10	<p>1. Метою створення банку культури клітин рослин – є:</p> <p>а) збереження генофонду сільськогосподарських та дикорослих рослин</p> <p>б) збереження клітин рослин з метою покращення їх життєздатності в умовах <i>in vitro</i></p> <p>в) розмноження калюсних культур різних видів рослин</p> <p>г) створення колекції клітинних ліній сільськогосподарських та дикорослих рослин</p>
17.ПФ.С.01.01.11	<p>1. Соматоклональні варіанти – це:</p> <p>а) рослини-регенеранти, отримані в результаті соматичної гібридизації</p> <p>б) група рослин зі зміненими властивостями, що виникли в результаті впливу факторів культивування на клітини калюсу під час його утримання в умовах <i>in vitro</i></p> <p>в) клітини калюсу, які зазнали зміни свого генетичного апарату під впливом мутагенної дії компонентів поживного середовища</p> <p>г) соматичні ембріоїди</p>
17.ПФ.С.01.01.12	<p>1. Гаплоїди це рослини, каріотип яких представлений:</p> <p>а) 1n набором хромосом      в) 3n набором хромосом</p> <p>б) 2n набором хромосом      г) 4n набором хромосом</p> <p>2. До методів отримання гаплоїдів відносяться:</p> <p>а) використання гаплопродюсерів для отримання гаплоїдів</p> <p>б) використання гомозиготних ліній для отримання гаплоїдів</p> <p>в) андрогенез</p> <p>г) гіногенез</p>

	<p>3. Гіногенез – це метод отримання гаплоїдів з:</p> <p>а) пилку                                  в) зав'язей  б) насінневих зачатків    г) приймочок</p>
17.ПФ.С.01.01.13	<p>1. Гаплопродюсери – це:</p> <p>а) рослини з яких отримують гаплоїди  б) рослини, які забезпечують можливість отримувати гаплоїди з важливих для селекції рослинних форм  в) хімічні речовини, які забезпечують можливість отримання гаплоїдів в культурі клітин in vitro  г) диплоїдизовані нащадки гаплоїдних рослин</p> <p>2. До гаплопродюсерів відносяться:</p> <p>а) <i>Hordeum bulbosum</i>                      в) колхіцин  б) <i>Hordeum vulgare</i>                      г) поліплоїдогени</p>
17.ПФ.С.01.01.14	<p>1. Гомозиготна лінія – це організми, каріотип яких можна позначити:</p> <p>а) 1n      б) 2n      в) 3n      г) 4n</p> <p>2. Гомозиготні лінії отримують з метою:</p> <p>а) розмноження цікавих для селекціонера сортів сільськогосподарських рослин  б) отримання чистих ліній, аналіз фенотипу яких дає можливість оцінити генотип організму  в) отримання алополіплоїдів  г) отримання анеуплоїдів</p>
17.ПФ.С.01.01.15	<p>1. З метою диплоїдизації генетичного матеріалу в клітинах гаплоїдів використовують:</p> <p>а) сахарозу                                  в) колхіцин  б) 2,4-Д                                      г) сорбіт</p>
17.ПФ.С.01.01.16	<p>1. Сомаклональні варіанти у рослин отримують за допомогою:</p> <p>а) спонтанного мутагенезу    в) штучного мутагенезу  б) соматичної гібридизації    г) ембріокультури</p>
17.ПФ.С.01.01.17	<p>1. Ембріокультура – це:</p> <p>а) культивування незрілих зародків на штучних поживних середовищах  б) культивування зрілих зародків на штучних поживних середовищах  в) культивування соматичних ембріоїдів у рідкому поживному середовищі  г) пророщування насіння</p> <p>2. Поживне середовище, яке використовують для</p>

	<p>культивування зрілих зародків має містити:</p> <p>а) дріжджовий екстракт  б) молоко кокосового горіха  в) мікроелементи  г) індоліл-3-оцетову кислоту</p> <p>3. Поживне середовище, яке використовують для культивування незрілих зародків має містити:</p> <p>а) дріжджовий екстракт  б) екстракт сирової картоплі  в) макроелементи  г) гібберелову кислоту</p>
17.ПФ.С.01.01.18	<p>1. Ембріокультура – метод, що використовується з метою:</p> <p>а) отримання соматичних ембріодів з клітин калусу  б) підвищення ефективності селекції рослин  в) отримання гібридів від міжродової гібридизації рослин  г) отримання гібридів від соматичної гібридизації рослин</p> <p>2. Виберіть приклади схрещувань, при яких використовується ембріокультура, як метод збереження та підтримання гібридних зародків:</p> <p>а) <i>Triticum aestivum</i> x <i>Triticum durum</i>  б) <i>Triticum aestivum</i> x <i>Triticum aestivum</i>  в) <i>Triticum aestivum</i> x <i>Secale cereale</i>  г) <i>Triticum aestivum</i> x <i>Hordeum vulgare</i></p>
17.ПФ.С.01.01.19	<p>1. Первинна культура – це:</p> <p>а) культура клітин, отримана з клітин ембріону  б) культура клітин, отримана з клітин після їх тривалого культивування  в) культура клітин, джерелом якої є органи і тканини або їх фрагменти (клітини), взяті безпосередньо з організму  г) культура клітин, до першого переміщення калусу в свіже поживне середовище</p> <p>2. Для отримання первинних культур тканин тварин та людини використовують середовище:</p> <p>а) MS    б) Гамборга B<sub>5</sub>  в) M 199    г) Дульбенко-Ігла</p> <p>3. Середовище M 199, що використовується для отримання первинних культур тварин та людини має включати такі компоненти, як:</p> <p>а) холестерин                                  б) цитокініни  в) мікроелементи                                  г) ауксини</p>



	<p>в) обробка клітин рослин ферментами г) обробка клітин рослин манітом та сорбітом</p> <p>3. Обов'язкові компоненти середовища, яке використовують під час отримання протопластів рослин: а) мікроелементи б) ауксини в) цитокініни г) осмопротектори</p> <p>4. Регенерація клітинної стінки на поверхні протопластів починається: а) через 24 години з моменту виділення протопластів б) через 48 годин з моменту виділення протопластів в) через 72 години з моменту виділення протопластів г) через 96 годин з моменту виділення протопластів</p>
17.ПФ.С.01.01.24	<p>1. Соматична гібридизація – це: а) гібридизація рослин з використанням статевих клітин б) гібридизація рослин, з використанням нестатевих клітин рослин в) парасексуальна гібридизація г) партеногенез</p> <p>2. Методи отримання соматичних гібридів: а) спонтанне злиття протопластів б) злиття протопластів за допомогою хімічних речовин в) штучне злиття протопластів г) злиття протопластів за допомогою електричних імпульсів</p> <p>3. Переваги соматичної гібридизації: а) отримання гомозиготних ліній б) отримання гібридів від двох, трьох та більшої кількості батьків в) отримання віддалених гібридів г) отримання мутантних форм рослин</p>
17.ПФ.С.01.01.25	<p>1. Соматична гібридизація дозволяє отримати наступні форми рослин: а) мутантні форми б) цибриди в) соматоклональні варіанти г) асиметричні гібриди</p> <p>2. Соматична гібридизація дозволяє отримати гібриди таких рівнів, як: а) міжтрибні б) міжродинні в) міжцарственні г) міжпопуляційні</p>

17.ПФ.С.01.01.26	<p>1. Найчастіше здійснюють пересадку таких частин клітини як:</p> <p>а) цитоплазма                          в) пероксисоми б) рибосоми                              г) ядро</p>
17.ПФ.С.01.01.27	<p>1. Хімери – організми, отримані в результаті злиття таких клітин як:</p> <p>а) двох яйцеклітин від різних самок б) двох сперматозоонів від різних самців в) яйцеклітини та сперматозоона г) двох бластомерів від різних зародків</p> <p>2. Хімера – це організм:</p> <p>а) отриманий в результаті мутагенезу б) отриманий в результаті партеногенезу в) отриманий в результаті віддаленої гібридизації г) отриманий в результаті злиття двох або більшої кількості генетично відмінних типів клітин, виділених з різних зигот</p>
17.ПФ.С.01.01.28	<p>1. Гібридами – це гібридні клітини, отримані в результаті злиття таких клітин як:</p> <p>а) гепатоцити та адипоцити б) гепатоцити та ракові клітини мієломи в) В-лімфоцити та ракові клітини мієломи г) В-лімфоцити та Т-лімфоцити</p> <p>2. Моноклональні антитіла синтезуються клітинами:</p> <p>а) В-лімфоцитами б) еозинофілами в) фагоцитами г) гібридними клітинами отриманими при злитті В-лімфоцитів з раковими клітинами мієломи</p>
17.ПФ.С.01.01.29	<p>1. Клонування – це:</p> <p>а) статеве розмноження      в) брунькування б) нестатеве розмноження   г) амейотичний партеногенез</p> <p>2. Клонування – це:</p> <p>а) отримання мутантних організмів б) отримання ідентичних організмів в) отримання соматоклональних варіантів г) отримання гомозиготних ліній</p> <p>3. На сьогоднішній день успішно клоновані такі тварини як:</p> <p>а) корова                                  в) верблюду</p>

	б) тхір г) лисиця
17.ПФ.С.01.01.30	1. Значення клітинної та генетичної інженерії: а) означені методи дозволяють отримати організми з новим поєднанням генів б) означені методи дозволяють отримати віддалені гібриди рослин та тварин в) означені методи дозволяють отримати лінії плюріпотентних стовбурових клітин г) означені методи дозволяють отримати химерні організми

### 1.8.3. Запитання комплексної контрольної роботи

#### ККР № 1 з біотехнології рослин

1. Дайте оцінку стану досліджень в області генетичної інженерії рослин.
2. Обґрунтуйте необхідність використання ембріокультури для отримання віддалених гібридів.
3. Опишіть методи злиття протопластів рослин. Значення цього процесу.

#### ККР № 2 з біотехнології рослин

1. Визначте значення біотехнології для розвитку суспільства.
2. Проаналізуйте залежність між концентраціями фізіологічно-активних речовин в поживних середовищах та напрямком морфогенезу в культурі тканин *in vitro*.
3. Опишіть будову Ті-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* та її значення в генетичній інженерії рослин.

#### ККР № 3 з біотехнології рослин

1. Проаналізуйте особливості двох напрямків отримання віддалених гібридів – соматичну гібридизацію та ембріокультуру.
2. Визначте роль ферментів для отримання рекомбінантних ДНК.
3. Опишіть методи та прийоми культивування клітин рослин *in vitro*.

#### ККР № 4 з біотехнології рослин

1. Проаналізуйте роль епохальних досліджень генетики, біохімії, молекулярної біології в розвитку біотехнології.

2. Обґрунтуйте необхідність розвитку мікроклонального розмноження рослин.
3. Опишіть типи морфогенезу в культурі тканин та клітин рослин *in vitro*. Які фактори впливають на напрямок морфогенезу в культурі *in vitro*.

#### **ККР № 5 з біотехнології рослин**

1. Проаналізуйте питання етичності та безпеки використання трансгенних організмів.
2. Обґрунтуйте необхідність використання осмопротекторів для отримання протопластів.
3. Опишіть методи отримання дигаплоїдів.

#### **ККР № 6 з біотехнології рослин**

1. Обґрунтуйте необхідність розвитку досліджень в області отримання вторинних метаболітів з калюсних тканин рослин. Наведіть приклади.
2. Визначте роль векторів в генетичній інженерії рослин.
3. Що таке соматична гібридизація, її значення для селекції рослин?

#### **ККР № 7 з біотехнології рослин**

1. Обґрунтуйте необхідність отримання трансгенних організмів.
2. Опишіть значення андрогенезу для селекції рослин.
3. Опишіть механізм трансформації клітин рослин за допомогою Ті-плазмід.

#### **ККР № 8 з біотехнології рослин**

1. Дайте оцінку методу культури тканин *in vitro*.
2. Опишіть етапи розвитку біотехнології.
3. Визначте роль ферментів для отримання рекомбінантних ДНК.

#### **ККР № 9 з біотехнології рослин**

1. Проаналізуйте роль соматичної гібридизації рослин для селекції рослин.
2. Опишіть роль гаплопродюсерів в селекції рослин.
3. Що таке вектор? Опишіть його будову.

#### **ККР № 10 з біотехнології рослин**

1. Дайте оцінку сучасному стану досліджень з біотехнології. Охарактеризуйте основні напрямки досліджень.



2. Визначте необхідність використання фізіологічно-активних речовин при культивуванні тканин та клітин *in vitro*.
3. Опишіть значення клонального розмноження для оздоровлення рослин.

#### **ККР № 11 з біотехнології рослин**

1. Дайте оцінку стану досліджень в області генетичної інженерії рослин.
2. Опишіть методи культивування протопластів.
3. Обґрунтуйте необхідність використання ембріокультури для отримання віддалених гібридів.

#### **ККР № 12 з біотехнології рослин**

1. Види соматичних гібридів та їх значення для генетики та селекції.
2. Обґрунтуйте необхідність розвитку мікроклонального розмноження рослин.
3. Проаналізуйте роль *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rizogenes* у природі і генетичній інженерії рослин.

#### **ККР № 13 з біотехнології рослин**

1. Поясніть терміни трансгенні та трансгеномні організми. Обґрунтуйте їх використання в селекції рослин.
2. Обґрунтуйте необхідність використання гаплопродюсерів в гаплоїдії.
3. Роль *Hordeum bulbosum* для отримання віддалених гібридів.

#### **ККР № 14 з біотехнології рослин**

1. Дайте оцінку методу культури тканин *in vitro*.
2. Види соматичних гібридів та їх значення для генетики та селекції.
3. Опишіть значення клонального розмноження для оздоровлення рослин.

#### **ККР № 15 з біотехнології рослин**

1. Визначте задачі біотехнології рослин.
2. Проаналізуйте залежність між концентраціями фізіологічно-активних речовин в поживних середовищах та напрямком морфогенезу в культурі тканин *in vitro*.
3. Що таке вектор? Опишіть його будову.

## Розділ 2 БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН ЯК НАУКА

Основною метою біотехнології рослин є створення нових сортів рослин та використання генетично модифікованих рослин та їх клітин для синтезу в промислових масштабах кормових білків, амінокислот, біологічно активних речовин рослинного походження – алкалоїдів, глікозидів та інших.

У сучасній біотехнології рослин виділяють три напрями:

### ***1. Клітинні технології***

Клітини рослин за їх культивування на поживних середовищах мають здатність до утворення меристемних зон, з яких розвиваються цілі рослини-регенеранти. Ця здатність рослинної клітини до тотіпотентності лягла в основу метода культури клітин та тканин. На сьогоднішній день цей метод широко використовується для мікроклонального розмноження рослин, отримання оздоровленого від вірусної інфекції посадочного матеріалу, отримання цінних продуктів метаболізму зникаючих або рідких лікарських рослин та ін.

### ***2. Клітинна інженерія***

На основі розроблених клітинних технологій відпрацьовані сучасні прийоми створення нових форм організмів за рахунок розширення меж гібридизації рослин (соматична або парасексуальна гібридизація), реконструкції клітин (перенесення таких органел як ядра, мітохондрії, пластиди від однієї клітини до іншої), що значно підвищує можливість отримання генетичного різноманіття серед важливих для селекції генотипів рослин.

### ***3. Генетична інженерія***

Виділення окремих генів та введення їх у геном рослини забезпечує можливість створення генетично модифікованих рослин. Такі генетично модифіковані рослини отримали назву трансгенних рослин. Трансгенні рослини представляють собою рослини нового типу, які дозволяють значно збільшити ефективність рослинництва, а тому під трансгенними рослинами сьогодні вже зайняті сотні млн. га.

## 2.1. Основні етапи розвитку біотехнології рослин

Вирощування ізольованих органів рослин вперше здійснили німецькі вчені наприкінці XIX століття.

1878 р. – Л. Фехтинг вивчав явище регенерації і полярність у вищих рослин.

Він вирощував в ізольованих умовах невеликі шматочки різних тканин.

1893 р. – Р. Броун, М. Моріс, Р. Сахс першими вирощували ізольовані зародки рослин у штучних умовах.

1893 р. – К. Рехінгер вивчав калусоутворення на шматочках стебла тополі, кореня буряків і кульбаби, товщина яких складала 20 мм, вирощуючи їх у вологому піску.

1902 р. – Г. Габерландт вперше чітко обґрунтував ідею і теоретичні принципи вирощування ізольованих тканин і клітин та доказав їх тотипотентність.

1907 р. – Харрісон ( 1911 – 1913 р. ) вирощував ізольовані клітини тварин на середовищах природного походження, таких, як плазма крові та зародкова рідина.

1922 р. – Кнудсон доказав можливість отримання значної кількості сіянців орхідей з насіння в умовах стерильної культури.

1922 р. – В. Роббінс та незалежно від нього В. Коте доказали можливість культивування на синтетичному поживному середовищі меристем коренів томатів і кукурудзи, однак, їм не вдалося субкультивувати *in vitro* культури калюсів.

1927 р. – О.Чех і С. Прат здійснили невдалі спроби вирощувати ізольовані тканини рослин.

З 1930р.– П. Уайт у США і Р. Готре у Франції повторили досліди Робінса і Коте і показали, що, коли кінчики культивованих коренів періодично пересаджувати на свіже поживне середовище, то вони ростуть на поживному середовищі тривалий термін. П. Уайт вперше розробив склад поживного середовища для вирощування ізольованих

рослинних тканин, яке використовується і в сучасній біотехнології. Він установив, що коренева меристема зберігає здатність до необмеженого у часі росту *in vitro*. Він підтримував культуру коренів деяких рослин, зокрема, томатів на протязі 30 років. Він вперше добився контрольованого органогенезу і отримав пагони тютюну з калюсу *in vitro*. Р. Готре працював з камбієм стебел дерев'янистих та трав'янистих рослин. Він отримав субкультуру тканин від 100 видів різних рослин, розробив нові поживні середовища, вперше ввів до їх складу гормон ауксин і показав його здатність стимулювати поділ клітин камбію. Деякі отримані ним калюсні культури (зокрема, з камбію і флоєми моркви і камбію верби) підтримувались *in vitro* за послідовних пасажів на свіже поживне середовище на протязі 50 років.

З цього часу розпочинається стрімкий розвиток нового напрямку експериментальної біології – культури ізольованих тканин і клітин рослин. Різними дослідниками були експериментально встановлені складові компоненти різнофункціональних поживних середовищ. Вивчена роль макро- і мікроелементів, вітамінів, вуглеводів та стимуляторів росту рослинного походження (незрілий ендосперм кокосового горіха, кукурудзи, каштана, дріжджовий екстракт). Більшість рослинних тканин вирощували на середовищах, що містять складні органічні суміші, які використовували в якості стимуляторів. Ці середовища сприяли підтриманню неорганізованого клітинного росту і стимуляції процесів органогенезу, соматичного ембріогенезу в культурі калюсних тканин і клітинних суспензій.

У 1959 році вперше була отримана суспензійна культура (Nickell, Tulecke, 1959). У 60-х роках минулого століття був розроблений метод культивування окремої виділеної із суспензії клітини, поділ якої індукували за допомогою клітин культури-„няньки” (Павлова, Бутенко, 1969; Jones et al., 1960).

Паралельно з розвитком і удосконаленням методів культивування рослинних тканин удосконалювалися і поживні середовища. Зокрема, в 50-х

роках ХХ ст. американський вчений Френсіс Скуг запропонував добавляти у поживне середовище новий регулятор росту кінетин (6-фурфуриламінопурин), виділений методом лужного гідролізу ДНК з молоків оселедця. Це призвело до відкриття нового класу фітогормонів – цитокінінів, які стимулюють поділ клітин і є необхідними факторами індукції органогенезу і регенерації *in vitro*.

З цього часу розпочинається ера синтетичних поживних середовищ з чітко визначеним хімічним складом, які замість регуляторів росту невизначеного складу містили ауксин, цитокінін, гіберилін та інші фітогормони та їх аналоги.

Одною з важливих подій у розвитку біотехнології рослин була розробка методів отримання протопластів – рослинних клітин, позбавлених клітинної стінки. Вперше протопласти були отримані в 1960 році професором Ноттінгемського університету Е. Кокингом. Він отримав протопласти з тканин кореня і плодів томатів шляхом їх обробки сумішшю пектолітичних та целюлолітичних ферментів, виділених з грибів. Ізольовані протопласти відкрили перспективи для соматичної гібридизації рослин різних видів та генетичної трансформації рослинних клітин.

70–80-ті роки минулого століття були присвячені розробці прийомів культивування протопластів, їх можливості відновлювати клітинну стінку, стимуляції їх поділу, утворенню клітинних колоній з наступним морфогенезом та регенерацією повноцінних рослин.

Ще одним перспективним напрямком біотехнології рослин була поява генетичної інженерії. Початок експериментальних робіт в галузі генетичної інженерії рослин приходить на 70-ті роки. У 1973 році Рой, Грешоф і Рольф вперше виявили, що інокуляція калюсних клітин томатів і арабідопсису бактеріофагами  $\lambda$  чи  $\phi 80$ , які містять гени галактозного або арабідозного оперонів кишкової палички, призводить до появи здатності рослинних клітин використовувати відповідні цукри як джерело вуглецю. Цей феномен став можливим завдяки функціонуванню генів бактеріофагів у рослинних клітинах, що показало можливість трансформації рослинних клітин будь-якими генами та створення трансгенних рослин.

## 2.2. Культура клітин та тканин вищих рослин

Метод вирощування тканин чи клітин вищих організмів на штучних поживних середовищах з метою отримання потрібних людині продуктів їх життєдіяльності має назву *метод культури тканин і клітин*. В основі цього методу лежить здатність клітин рослин до *totіpotентності*, завдяки чому соматичні клітини рослин можуть відтворити процеси розвитку від поодиноких клітин до повноцінної дорослої рослини. Метод культури клітин і тканин рослин дозволяє отримати чисельні популяції клітин за порівняно короткий проміжок часу і в обмеженому просторі. Можливість контролю за розвитком клітин в умовах *in vitro*, яке забезпечується маніпуляціями умов культивування клітин чи тканин, сприяє використанню цієї системи у промислових масштабах з метою отримання необхідних для людини продуктів життєдіяльності рослин. До технологій, оснований на культивуванні тканин і клітин *in vitro*, відносяться:

1. Отримання біологічно активних речовин рослинного походження:
  - традиційних продуктів вторинного метаболізму рослин (токсинів, гербіцидів, регуляторів росту, алкалоїдів, стероїдів, терпенів, які використовуються в медицині та легкій промисловості );
  - синтез нових речовин, які є продуктом генетично змінених популяцій клітин, відібраних за допомогою клітинної селекції і отриманих завдяки спонтанному або направленому мутагенезу;
  - біотрансформація речовин, суспензії клітин, що культивуються *in vitro*, можуть використовуватись як мультиферментні системи, які здатні до широкого спектру біотрансформації хімічних речовин (реакції окиснення, відновлення, метилювання, деметилювання, глікозилювання, ізомеризації). На основі біотрансформації отримують унікальні біологічно активні продукти на основі синтетичних речовин або речовин проміжного обміну рослин інших видів.
2. Прискорене мікроклональне розмноження рослин, яке дозволяє з одного експланта отримати від 10000 до 1000000 рослин за рік.

3. Отримання оздоровленого садивного матеріалу.
4. Ембріокультура та штучне запліднення в умовах *in vitro*.
5. Антерні культури – культури пиляків та пилку, з метою отримання гаплоїдів та дигаплоїдів.
6. Клітинний мутагенез та селекція.
7. Кріоконсервація та інші методи збереження генофонду.
8. Соматична гібридизація на основі злиття протопластів рослин.
9. Конструювання клітин шляхом введення різних клітинних органел.
10. Генетична трансформація на рівні генів або хромосом.

### 2.3. Характеристика поживних середовищ

Культура калюсних тканин вирощується поверхневим способом на напівтвердому агаризованому середовищі (концентрація агар-агару 0,6-1%). Основними компонентами поживних середовищ для культури тканин і клітин рослин є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), сахароза чи глюкоза, вітаміни, регулятори росту (гормони). У деякі поживні середовища входять комплексні органічні добавки (гідролізат казеїну, суміш амінокислот, дріжджовий екстракт, екстракти з різних органів рослин).

Найбільш поширеними в культурі тканин є поживні середовища, запропоновані Мурасіге і Скуг (MS), Гамборгом і Евелегою (B<sub>5</sub>), Уайтом, Ніч, Као і Михайлюком.

Універсальним і багатофункціональним середовищем, придатним для культивування багатьох рослинних клітин, є середовище Мурасіге і Скуг такого складу:

<i>Макроелементи</i>	<i>Концентрація, мг/л</i>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33000
KNO <sub>3</sub>	38000
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	8800
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	7400
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400
<i>Мікроелементи</i>	
KI	166

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4460
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1720
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	5
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5560
Na <sub>2</sub> EDTA·7H <sub>2</sub> O	7460
<b>Органічні речовини</b>	
Мезоінозит	20000
Нікотинова кислота	100
Піридоксин · HCl	100
Тіамін · HCl	100
Гліцин	400
Сахароза	30 г/л

pH 6,7

Середовище Гамборга і Евелега (B<sub>5</sub>) є ефективним для культивування клітин і тканин більшості бобових рослин та цукрових буряків.

Середовище Уайта використовується переважно для вкорінення пагонів та нормального росту стебел після регенерації.

Середовище Ніч (китайське середовище) рекомендується для індукції андрогенезу у культурі пиляків і для індукції морфогенезу у злаків.

Середовище Као і Михайлюка використовується для культивування ізольованих клітин і протопластів.

Слід відмітити, що для кожного виду рослин потрібно експериментально модифікувати поживне середовище, найчастіше змінюючи концентрації і склад органічних компонентів.

#### **2.4. Головні вимоги до лабораторії**

Для роботи з культурою рослинних клітин потрібні:

1. Приміщення для приготування середовищ.
2. Стерильна кімната або ламінарний бокс.
3. Кімната з постійною температурою чи термостат для вирощування калюсних культур.



Якість поживного середовища залежить від точного відтворення необхідного хімічного складу, що залежить від чистоти хімічного посуду та ретельності приготування. Недопустимо попадання у середовище навіть мінімальних домішок, наприклад, з брудних терезів чи електродів рН-метра.

Ламінарний бокс використовується для роботи з культурою тканин в асептичних умовах. Ламінарні бокси обладнані ультрафіолетовими лампами для стерилізації внутрішніх поверхонь. Після УФ-опромінення робочі поверхні бажано протерти етанолом або 20% водним розчином фенолу. Під час роботи у ламінарному боксі необхідно постійно користуватися пальником Бунзена.

Необхідною фізичною умовою вирощування культури тканин рослин є підтримання постійної температури їх культивування. Для невеликої кількості калюсних культур цілком придатний стандартний мікробіологічний термостат, який працює у режимі 25–27 °С. Зручною для розміщення культур є система полок з трубчатими люмінесцентними лампами над ними. Така система є придатною для культивування в будь-якому світловому режимі.

Калюсні культури вирощують у пластикових чашках Петрі, скляних пробірках, призначених для вирощування культури тканин чи пластмасових баночках з кришками. Суспензійні культури вирощують у скляних конічних колбах.

## **2.5. Методика культивування тканин рослин**

Для отримання культури рослинних тканин використовують фрагменти різних органів вищих рослин. Фрагменти тканин різних органів, які використовуються для культивування, називаються *експлантами*. Експланти поміщають на штучне поживне середовище *in vitro* у пробірки, колби, чашки Петрі. Процес культивування рослинних тканин потребує стерильних умов. Для цього за допомогою розчинів, які містять активованій хлор або ртуть (гіпохлорити, сулема) стерилізують експланти, після чого їх ретельно відмивають стерильною водою. Поживне середовище стерилізують в автоклаві чи за допомогою фільтрування на ультрафільтрах. Посуд, інструменти,

матеріали стерилізують в автоклавах за тиску  $19,6 \cdot 10^4$  Па (2 атм) при 160 °С на протязі 1,5 год. Посадку експлантів здійснюють у ламінарних боксах, де асептика досягається постійною подачею стерильного повітря. Експланти поміщають на агаризоване середовище і злегка втискують їх в агар для забезпечення тісного контакту з середовищем .

На першому етапі культивування експлантів на твердому поживному середовищі відбувається процес *дедиференціації* клітин експланта, тобто клітини спеціалізованих тканин кореня, стебла чи мезофілу листка повинні втратити структури, характерні для їх специфічних функцій у рослині і знову набуті здатності до поділу. Часто експлант є частиною органу і включає різні тканини, наприклад, використаний фрагмент стебла містить у своєму складі клітини епідермальної первинної корової паренхіми, камбію, судинної системи і серцевої паренхіми. У цих нездатних до поділу, спеціалізованих клітинах експланту повинно відбутися і дедиференціювання і підготовка їх до поділу. У клітині, яка готується до поділу, стимулюється синтез всіх форм РНК, зникають тканиноспецифічні білки-антигени і з'являються білки, необхідні для поділу. Це свідчить про зміни експресії генів в геномі клітин під час їх дедиференціації. Дуже своєрідно процес дедиференціації відбувається в апікальній меристемі стебла, яка складається з клітин, здатних до поділу. Зразу після розміщення меристеми стебла на поживному середовищі спостерігається припинення мітозів, клітини дедиференціюються, збільшуються в об'ємі, втрачають притаманну для меристематичної клітини форму, змінюється структура ядра і цитоплазми. Лише після цього вони знову набувають здатності ділитися.

На другому етапі розпочинається поділ дедиференційованих клітин на поживному середовищі і утворення калюсної тканини. Основним типом культивованої рослинної клітини є калюсна. *Калюсні клітини* представляють собою один з типів клітинної диференціації, притаманної вищій рослині. Для рослини калюс є тканиною, яка виникає лише при травмах. Ця тканина захищає місце пошкодження рослини, накопичує поживні речовини, необхідні для регенерації втраченого органу. *Калюсна тканина* представляє собою аморфну

масу тонкостінних паренхімних клітин, які мають чітку анатомічну структуру. Сформована калюсна тканина може бути білого, жовтого, зеленого, червоного кольору, може бути пігментована повністю чи зонально. Процеси дедиференціації клітин і калюсоутворення є гормонозалежними і визначаються співвідношенням ауксинів і цитокінінів у поживному середовищі.

Первинний калюс утворюється на експлантах за 4–6 тижнів (в залежності від темпів росту). Далі калюс потрібно переносити на свіже поживне середовище, тобто здійснювати його субкультивування. Цей процес перенесення калюсу на свіже поживне середовище називається пасажем. Розмір трансплантата на агаризованому поживному середовищі становить від 60 до 100 мг маси тканини.

Важливе значення для процесу калюсоутворення має правильний підбір регуляторів росту рослин. Найбільш вживані регулятори росту рослин представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

**Регулятори росту, які використовуються за культивування  
тканин і клітин рослин**

Клас фітогормонів	Назва	Скорочена назва	Концентрація, М
Ауксини	Хлорфеноксиоцтова кислота	ХФОК	$10^{-7} - 10^{-5}$
	2,4-Дихлорфеноксиоцтова к-та	2.4-Д	$10^{-7} - 10^{-5}$
	Індоліл-3-оцтова кислота	ІОК	$10^{-7} - 10^{-5}$
	3-Індолілмасляна кислота	ІМК	$10^{-7} - 10^{-5}$
	1-Нафтилоцтова кислота	НОК	$10^{-7} - 10^{-5}$
	$\beta$ -Нафтоксиоцтова кислота	НООК	$10^{-7} - 10^{-5}$
Цитокініни	6-Бензиламінопурин	БАП	$10^{-7} - 10^{-5}$
	N-Ізопентениламінопурин	2-іП	$10^{-7} - 10^{-5}$
	6-Фурфуриламинопурин (кінетин)	К	$10^{-7} - 10^{-5}$
	Зеатин	Зеа	$10^{-7} - 10^{-5}$
Гібереліни	Гіберелова кислота	ГК <sub>3</sub>	$10^{-7} - 10^{-5}$

Різні рослинні об'єкти потребують різного співвідношення регуляторів росту в поживних середовищах.

Таким чином, можна заключити, що техніка культивування рослинних тканин дозволяє отримати тривалу, пересаджувану калюсну культуру з будь-яких живих клітин рослини. Різноманітні диференційовані клітини (у тому числі і меристемні) переходять *in vitro* до складної дедиференціації, втрачають притаманну їм структурну організацію і специфічні функції, після чого індукуються до поділу, утворюючи первинний калюс. У процесі **субкультивування** формуються штами вторинних калюсів, які характеризуються індивідуальними генетичними і фізіологічними особливостями.

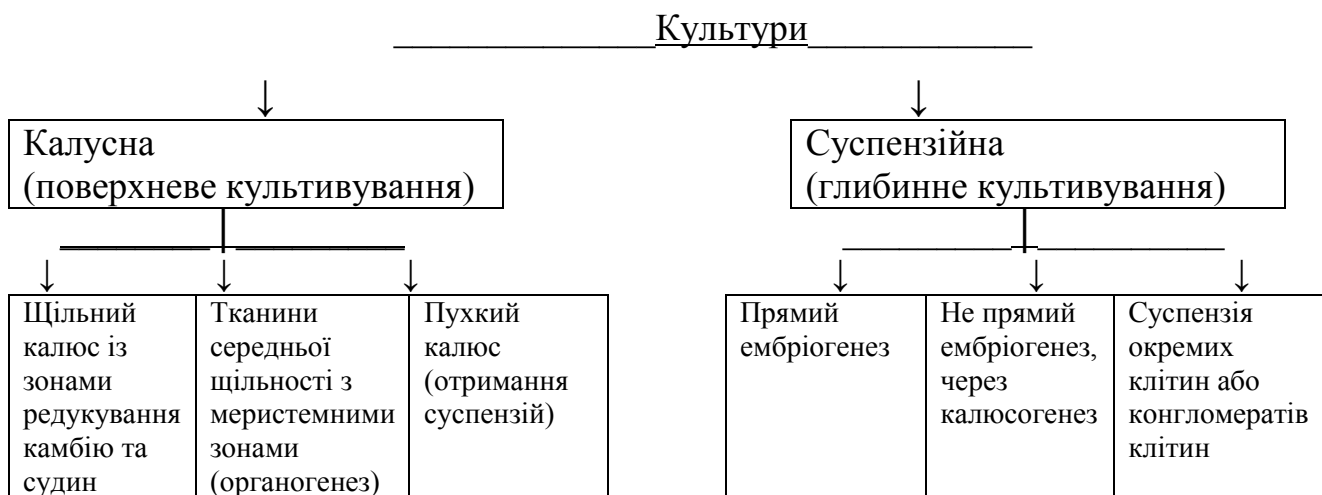
В залежності від походження і умов вирощування калюсні тканини бувають: 1) пухкими, дуже обводненими, що легко розпадаються на окремі клітини; 2) середньої щільності з добре сформованими меристемними зонами; 3) щільними калюсами, які містять зони редукованого камбію і судин. Як правило, калюси стають більш пухкими і втрачають пігментацію у довготривалій пересаджуваній культурі на середовищі, що містить ауксин 2,4-дихлорфенолоцтову кислоту (2,4-Д).

В процесі вирощування калюсні клітини після ряду поділів проходять притаманний для рослинної клітини онтогенез. Вони приступають до росту розтягуванням, потім диференціюються як зрілі калюсні клітини і наостанок деградують. Калюсні тканини, вирощені поверхневим способом культивування, використовують для збереження колекції різних штамів або ліній рослинних клітин. З них також отримують суспензії клітин для вирощування у рідкому поживному середовищі.

## **2.6. Типи культур клітин і тканин**

В залежності від способу та умов культивування чи походження клітин виділяють декілька типів культур клітин і тканин (рис. 1).

Культивування рослинних клітин та тканин можна здійснювати поверхневим та глибинним способами. Поверхнєве культивування



**Рис.1. Типи культур рослинних клітин і тканин**

здійснюється на агаризованому поживному середовищі. У цьому випадку утворюється калусна тканина, яка може відрізнитися щільністю. Походження та умови вирощування визначають, якою буде калусна тканина: щільною, середньої щільності чи пухкою. У щільних калусних тканинах розрізняють зони редукованого камбію і трахеоподібних елементів. Тканина середньої щільності містить меристематичні зони. У ній легко ініціюються процеси органогенезу. Пухка калусна тканина містить дуже обводнені клітини, легко розпадається на невеликі групи і тому може бути використана для отримання суспензійної культури.

Глибинний спосіб культивування притаманний суспензійним культурам. Клітинні суспензії можна отримувати з калусних тканин, а також ізолювати з окремих органів рослин. Для отримання суспензійних культур краще використовувати калуси пухкого типу. Первинний калус поміщають в рідке поживне середовище і крутять на качалці зі швидкістю 100–120 об/хв. У результаті дезагрегації калусу утворюються групи клітин (по 5 – 10 клітин у групі). Вирощування клітинних суспензій у рідкому поживному середовищі має ряд переваг порівняно з вирощуванням калусних тканин поверхневим способом. Зокрема, в рідкому середовищі екзогенні фактори рівною мірою доступні кожній клітині, тобто всі клітини в суспензійній культурі знаходяться

в однакових умовах, а тому легше направлено впливати на метаболізм і ріст клітинних популяцій екзогенними чинниками. Найбільш поширеним режимом глибинного культивування клітинних суспензій є закрита періодична система. У закритій системі за періодичного режиму вирощування клітинна маса поміщається в певний об'єм середовища. До кінця вирощування система залишається закритою за всіма параметрами, крім газів. Критерієм росту в циклі вирощування слугує збільшення числа клітин. Склад середовища, температура, рН, склад газової фази, швидкості перемішування – це ті компоненти, від яких залежать процеси росту клітин.

### **2.7. Регенерація рослин з калусних тканин. Органогенез. Ембріогенез**

За певних умов культивування калусних тканин деякі клітини виявляються тотипотентними, тобто можуть розвиватися до цілісної рослини. Регенерація рослин відбувається за наявності рослинних гормонів у відповідних концентраціях. Крім гормонального балансу на регенерацію впливають й інші фактори. По-перше, важливим фактором є вік калусної культури. Чим більше пасажів проходить калусна тканина, тим менше клітин зберігає тотипотентність. Ефективність регенерації залежить також від таких фізичних факторів, як вологість, освітленість, рН та інших. Регенерація залежить також від виду рослини. Індукувати регенерацію можна не у всіх видів рослин. Клітини таких видів рослин, як тютюн, петунія, томати регенерують дуже легко. У злаків, бобових регенерація виникає рідко.

Регенерація може здійснюватися шляхом органогенезу чи ембріогенезу. **Органогенезом** називається процес, під час якого в клітинах або тканинах відбуваються зміни, які приводять до утворення однополярної структури, а саме: пагоневого або кореневого зачатка. Отримувати рослини-регенеранти через органогенез можна різними способами:

- шляхом формування додаткових коренів на калусі, отриманому з експланта – різогенез;

- шляхом формування додаткових коренів безпосередньо з експланта без проміжної фази калусоутворення;
- шляхом стимуляції формування пагонів з верхівкових, бічних та сплячих бруньок, з подальшою регенерацією на них додаткових коренів – прямий органогенез;
- шляхом формування пагонів з меристемних клітин калюсу – непрямий органогенез.

Тютюн представляє собою модельну систему регенерації рослин через органогенез. В залежності від концентрації регуляторів росту в поживному середовищі можна вирощувати пагони тютюну прямо з експланта або через проміжний калусогенез. Для вкорінення пагонів підходить середовище з низькими концентраціями ауксинів або без них.

Органогенез пагонів складається з трьох основних етапів:

1. Формування бруньки пагона (гемогенез);
2. Ріст і розвиток пагона;
3. Вкорінення пагона.

**Соматичний ембріогенез** – це процес утворення біполярних структур з віссю корінь – пагін, з закритою незалежною судинною системою. Переваги соматичного ембріогенезу порівняно з органогенезом полягають у більшій ефективності процесу та отриманні морфологічно і цитологічно однорідних рослин.

Регенерація рослин шляхом соматичного ембріогенезу складається з двох етапів:

1 етап. Індукція процесу створення ембріогенно-компетентних клітин в тканинах експлантів або клітинах калюсу завдяки додаванню високих концентрацій ауксину в поживні середовища;

2 етап. Стимуляція ембріогених клітин до розвитку в ембріоїди за рахунок зниження концентрацій ауксину.

Утворення соматичних зародків у культурі *in vitro* може здійснюватися прямим і непрямим шляхами. Прямий соматичний ембріогенез полягає у

формуванні вегетативного зародка з одної або декількох клітин тканини експланта без стадії утворення проміжного калюса. Такий шлях розвитку притаманний цитрусовим, у яких тканини нуцелюсу дають початок нуцелярним зародкам (як *in vivo*, так і *in vitro*), а також за умови, що культивовані недозрілі зародки здатні брунькуватись. Відомо, що у деяких видів рослин епідермальні клітини стебла дають початок додатковим зародкам. Відомі випадки прямого ембріогенезу в деяких культурах пиляків і протопластів, однак вони досить рідкісні.

Непрямий ембріогенез здійснюється шляхом стимуляції калюсоутворення і формування передзародків на поживному середовищі з високим вмістом ауксину (0,45–4,52 мкмоль 2,4-Д). Перенесення такого калюса з передзародками на поживне середовище без факторів росту забезпечує формування біполярних зародків. У відповідних умовах ці зародки проростають і утворюють рослини-регенеранти.

Найуживанішим ауксином, що забезпечує ембріогенез, є 2,4-Д. Важливими для розвитку нормальних ембріодів є також фітогормони гіберелова та абсцизова кислоти, зеатин, БАП, диметиламінопурин.

Для культивування калюса і отримання регенерантів найбільш розповсюдженим є середовище Мурасіге і Скуг. Водночас, підбір концентрацій регуляторів росту необхідно здійснювати експериментально для кожного типу тканин. У таблиці 2 наведені експериментально підібрані концентрації гормонів для деяких видів рослин.

Таблиця 2

### Потреби в регуляторах росту у різних видів рослин

Вид рослини	Концентрації гормонів (мкмоль), які необхідні для формування	
	пагонів чи ембріогенезу	коренів
Пшениця	Зеа – 4,6; ІОК – 5,7	НОК – 0,054
Люцерна	НОК - 0,3; БАП – 2,3	НОК – 0,054
Горох	БАП – 22,2; НОК – 1,1	
Картопля	Кін – 4,7	
Тютюн	НОК – 1,0; Кін – 5,0	



Використовуючи одне й те ж середовище для культивування (наприклад, середовище МС), але змінюючи концентрації регуляторів росту, можна регулювати шлях морфогенезу *in vitro*. Як правило, за високих концентрацій ауксинів досягають формування калюсу. Використання цитокінінів разом з ауксинами у деяких видів рослин також сприяє формуванню калюсу. Зниження концентрації ауксинів і підвищення вмісту цитокінінів використовують для індукції утворення пагонів з калюсу. Перенесення калюсу у середовище без регуляторів росту забезпечує стимуляцію пізніх стадій розвитку зародка при соматичному ембріогенезі. Для індукції росту пазушних бруньок у меристемних тканинах їх культивують на середовищах з низькими концентраціями ауксинів і цитокінінів у різних співвідношеннях. Використання інших регуляторів росту, як наприклад, абсцизової чи гіберелової кислоти може бути корисним для індукції утворення коренів (цитрусові) або розвитку рослин-регенерантів (морква).

Здатність клітин регенерувати шляхом органогенезу чи ембріогенезу є видоспецифічною ознакою. Так, тканини тютюну утворюють здебільшого органи, а тканини моркви – ембріоїди. Регенерація розпочинається з того, що у відповідь на певні індуктивні сигнали клітини утворюють або меристемоїди, або кластери проембріогенних структур, з яких розвиваються чи то зачатки органів (примордії), чи то ембріоїди відповідно. Ці процеси розпочинаються у результаті включення певних генів, тобто процесів реплікації, транскрипції, процесингу і трансляції. З'являються нові ферменти, активізуються нові метаболічні шляхи.

Згідно з теорією морфогенезу Шарпа та Еванса (1981) в експлантах містяться детерміновані на ембріогенний розвиток клітини. Такі соматичні клітини, які є ембріодогенними, легше переходять до соматичного ембріогенезу, ніж диференційовані соматичні клітини. Саме ці клітини є тотипотентними і забезпечують появу рослин-регенерантів.

Блокування регенерації може бути генетичним. Воно відбувається внаслідок втрати рослинами певного виду тотипотентності. Втрата останньої

клітинами багатьох видів рослин зумовлена накопиченням генетичних змін у процесі тривалого культивування клітин *in vitro*.

Блокування регенерації може бути епігенетичним, коли у функціонуванні генів, необхідних для організованого розвитку, відбуваються зміни. Такі клітини називаються некомпетентними. Їх некомпетентність обумовлена репресією транскрипції. Епігенетичний блок може бути знятий дією зовнішніх умов, зокрема, певними фітогормонами, які здатні перетворювати некомпетентні клітини в компетентні та індукувати морфогенез і регенерацію.

Фізіологічне блокування регенерації означає відсутність необхідних зовнішніх сигналів, а саме: конкретних фітогормонів у певних співвідношеннях, наявність у середовищі інгібіторів регенерації або не оптимально підібраних умов культивування.

Таким чином, у переважній більшості випадків культивовані клітини і тканини здатні до регенерації. В процесі тривалого субкультивування регенераційна здатність послаблюється іноді аж до повної втрати. Підбір оптимальних умов індукції організованого розвитку *in vitro* потрібно здійснювати експериментально для кожного виду рослин.

## **2.8. Технології на основі культури рослинних клітин і тканин**

Технології на основі культивованих *in vitro* клітин і тканин рослин розвиваються в чотирьох основних напрямках. Перший – отримання промисловим способом цінних біологічно активних речовин рослинного походження. Другий – використання тканинних і клітинних культур для швидкого клонального мікророзмноження та оздоровлення рослин. Третій – отримання вихідного матеріалу для прискореної селекції важливих сільськогосподарських рослин. Четвертий – використання методів клітинної та генетичної інженерії для генетичної модифікації клітин і отримання на їх основі нових форм рослин.

### **2.8.1. Виробництво біологічно активних речовин рослинного походження**

Однією з характерних особливостей рослин є їх здатність до синтезу різноманітних метаболітів. До них відносяться такі важливі для медицини та різних галузей промисловості речовини, як алкалоїди, глікозиди, флавоноїди, фенольні речовини, ефірні масла та багато інших.

Культивовані *in vitro* клітини зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів, властивих тому виду рослини, з якої вони отримані. Крім того, технології культивування клітини для отримання біологічно активних речовин мають певні переваги над їх отриманням з природної сировини, а саме: незалежність отримання продукту від клімату, сезону, погоди, ґрунту, можливість оптимізувати і стандартизувати умови вирощування та застосувати комп'ютерне управління процесом.

Важливою умовою отримання високопродуктивного штаму клітин є використання рослини з високою біосинтетичною активністю. Разом з тим не достатньо високий рівень синтезу цих речовин клітинами в культурі *in vitro* потребує проведення селекції на створення більш продуктивних штамів клітин.

Селекція клітинних культур можлива перш за все тому, що ізольованим рослинним клітинам властива мінливість. Однією з причин мінливості є те, що в ізольованих клітинах порушені механізми репарації, які властиві цілісному організму. Однак, визначальним чинником ступеня мінливості клітин є генетична особливість виду рослин, з яких вони отримані. Клітинним культурам різних видів може бути притаманна або стабільність або мінливість. Зокрема, цитогенетичною мінливістю відзначаються популяції клітин, отримані з тих родин рослин, у яких тканинна диференціація пов'язана з поліплоїдизацією клітин. Мінливість клітин у культурі значно підвищується за використання різноманітних мутагенів. Використання методів індукованого мутагенезу на клітинному рівні забезпечує швидкий добір клітинних ліній, стійких до хвороб та несприятливих зовнішніх умов.

Другою особливістю клітинних культур є їх здатність до клітинного добору. Цей процес відбувається спонтанно, а тому отримав назву автоселекція.

Клітинна селекція призводить до наростаючого домінування клітин певного типу, тому дуже важливо розробляти методи підтримання клітинних культур з цінними виробничими характеристиками. Зокрема, певний склад поживного середовища забезпечує селекцію клітин, направлену на отримання високопродуктивних ліній рослин. Наприклад, добір мутантів на селективних середовищах з аномальними амінокислотами дозволяє створити лінії клітин, забезпечені незамінними амінокислотами.

ст жут                      зіолог р                      зи                      **О**                      имані                      **ри**                      ш роук 10 (внЕаз)кл

### ***2.8.2. Біотрансформація речовин ферментним апаратом рослинних клітин***

Одним з методів отримання нових біологічно активних речовин є біотрансформація хімічних сполук ферментним апаратом рослинних клітин. Цей метод поєднує хімічний синтез інертних речовин і наступне використання їх рослинними ферментами в якості субстратів з метою утворення цінних біологічно активних продуктів. Зокрема, вивчена можливість біотрансформації клітинами лікарської рослини наперстянки шерстистої такого серцевого глікозиду як диготоксин у більш активну і придатну для медичного використання форму – дигоксин; або ж перетворення клітинами м'яги перцевої проміжних хімічних сполук пулегону чи ментону в активний кінцевий продукт – ментол.

Ефективність біотрансформації хімічних сполук значно підвищується за використання іммобілізованих на носіях рослинних клітин. Іммобілізовані клітини не діляться, але залишаються живими і здатними до біотрансформації хімічних сполук та неактивних попередників, а також до синтезу вторинних метаболітів, які їм властиві.

### ***2.8.3. Клональне розмноження і оздоровлення рослин***

Тотипотентність рослин, тобто їх здатність до регенерації з культивованих клітин чи тканин забезпечує можливість швидкого клонального мікророзмноження рослин. Оптимізовані умови для всіх етапів клонального розмноження, зокрема отримання великої кількості експлантів з однієї рослини, отримання від первинної меристеми чисельних пагонів, їх укорінення та висадка отриманих регенерантів у ґрунт. Підібрані поживні середовища для кожного з етапів культивування та регенерації рослин. Можливість використання клонального розмноження підтверджена для більш ніж 500 видів рослин, які відносяться до десятків різноманітних родин.

Культуру тканин можна використовувати не лише для швидкого мікророзмноження рослин, але й для їх оздоровлення у разі ураження рослин вірусами. Розроблені технології оздоровлення від вірусів садильного матеріалу

картоплі, садових суниць, малини, декоративних рослин, квітів. Суть технології полягає у використанні в якості експланту для культивування зрізу апікальної меристеми товщиною до 1 мм. Встановлено, що клітини апікальної меристеми у результаті швидкого поділу практично не містять вірусів. Розроблені високочутливі методи діагностики оздоровлення від вірусів рослин-регенерантів, отриманих з апікальної меристеми інфікованої рослини. Цінність технологій отримання рослин-регенерантів через культуру клітин і тканин полягає не лише в тому, що вдається отримати високоякісний неінфікований садильний матеріал, використання якого набагато підвищує врожайність рослин та покращує його якість, але ще й у тому, що при цьому значно прискорюється розмноження нових господарсько-цінних сортів рослин. Останнє особливо важливе для прискорення розповсюдження нових перспективних сортів кущівних та дерев'янистих рослин.

Клональне мікророзмноження може бути використане для створення колекції рослин, необхідних в якості вихідного матеріалу для роботи генетиків і селекціонерів. Такі колекції практично не займають площ, а також можуть підтримуватися не лише у стадії росту, але консервуватися при низьких ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) температурах. Цю технологію можна використовувати для збереження пулу геномів рідкісних і зникаючих рослин.

#### **2.8.4. Культура гаплоїдних клітин**

**Гаплоїди** – рослини, у клітинах яких міститься одинарний (як у гаметах), а не соматичний набір хромосом. Відповідно, **гаплоїдизація** – це кратне зменшення (редукція) кількості хромосом у клітинах. Гаплоїди, у залежності від рівня плоїдності висхідної особини, поділяють на дві головні групи:

1. Моноплоїди (моногаплоїди) – гаплоїди, які походять від особин з диплоїдним числом хромосом.
2. Полігаплоїди – гаплоїди, які походять від поліплоїдних особин.

Наприклад, гаплоїд жита *Secale cereale* ( $2n = 2x = 14$ ) є моноплоїдом

( $n=x=7$ ), а гаплоїд м'якої пшениці (*Triticum aestivum*), яка є природним гексаплоїдом ( $2n = 6x = 42$ ), є тригаплоїдом ( $n = 3x = 21$ ).

Явище гаплоїдії було відкрите в 1922 році. Першу гаплоїдну рослину експериментальним шляхом було отримано з дурману *Datura stremonium*. Це відкриття зацікавило вчених і активізувало дослідження у цьому напрямку. У середині 30-х років Я. С. Могилевським (Інститут ботаніки НАН України) були отримані десятки гаплоїдів різних видів рослин. У кінці 60-х – на початку 70-х років минулого століття були закладені основи технології отримання гаплоїдів в культурі *in vitro*, що надало можливості отримати гаплоїди з більшості важливих сільськогосподарських рослин, наприклад:

1. Арахісу	7. Дерева какао	13. Пшениці	19. Тютюну
2. Африканської фіалки	8. Кукурудзи	14. Рису	20. Фікусу
3. Батату	9. Огірків	15. Спаржі	21. Сахарної тростини
4. Винограду	10. Перців	16. Суниць	22. Ячменю
5. Герані	11. Петунії	17. Томатів	
6. Жита	12. Піона	18. Тритикале	

Гаплоїди мають велике значення для практичної селекції у зв'язку з тим, що:

1. Гаплоїди використовують в якості посередників для отримання гомозиготних (тобто чистих) ліній рослин шляхом подвоєння числа хромосом. Цей шлях досягнення гомозиготності є значно ефективнішим порівняно з альтернативним, який полягає в багатократних циклах інбредних скрещувань з метою отримання гомозигот.
2. За допомогою гаплоїдів можливо виявляти лінії рослин з різноманітними комбінаціями ознак уже у першому статевому поколінні ( $F_1$ ) завдяки можливості їх прояву у гомозиготі.

3. У гаплоїдів є можливість здійснювати добір за рецесивними ознаками. У них відсутня домінантність, оскільки кожна ознака у гаплоїдів кодується одним алелем. Такий стан прискорює добір потрібних генотипів за їх фенотипами.
4. У полігаплоїдів швидко досягається хромосомна гомологія.
5. Гаплоїдизація дає можливість ефективно включати ядерні гени в будь-яку чужорідну цитоплазму, отримуючи за одно-два покоління потрібні комбінації цитоплазматичних та ядерних генів. Цей підхід має важливе значення для селекції, враховуючи, що саме в цитоплазматичних органелах знаходяться гени, що відповідають за стійкість рослини до стресових чинників, збудників хвороб, урожайність, гетерозис.
6. Гаплоїди дозволяють виявляти наявність мутацій та частоту їх виникнення за індукованного мутагенезу.
7. Гаплоїди можна використовувати для генетичного аналізу, зокрема для виявлення груп зчеплення генів.

Існує декілька способів отримання гаплоїдних рослин:

1. Андрогагенез.
2. Гіногагенез.
3. Використання гаплопродюсерів.

### ***Андрогагенез***

***Андрогагенезом*** називається форма розмноження організмів, за якої зародок рослини розвивається лише з ядра чоловічої гамет. Це явище лежить в основі отримання гаплоїдів з пиляків чи пилку. Такі гаплоїди називають ***андрогагенними***. Вперше андрогагенні гаплоїди були отримані індійськими вченими в 1964 році з дурману індійського.

### ***Культивування пиляків і пилку***

Ізольовані з квітки пиляки з пилком поміщають на поживне середовище MS, Ніча, Чуанга, Чу або їх модифікації. Варіанти цих середовищ можуть відрізнятися вмістом вітамінів, фітогормонів, вуглеводів. Маніпуляції складом середовища може призвести до суттєвого підвищення ефективності андрогагенезу, оскільки існує значна залежність між генотипом та складом



середовища. Встановлено, що вітаміни і мікроелементи не впливають на індукцію андрогенезу, хоча від їх концентрацій залежить ефективність розвитку ембріодів на ранніх стадіях андрогенезу. Залізо у формі хелатів потрібне на всіх стадіях андрогенного розвитку пилякових зерен. Сахароза як джерело вуглеводів – один з важливих компонентів будь-яких поживних середовищ, для різних генотипів рослин потрібна у різних кількостях. Так, для культивування пиляків з родини Пасльонові використовується 20-30 г/л сахарози, а з пшениці, тритикале, ячменю, рису, кукурудзи, капусти – від 60 до 120 г/л сахарози. До складу поживних середовищ для культивування пиляків входять органічні добавки – амінокислоти (глутамін, серін, пролін), гідролізат казеїну, лактальбумінгідролізат, кокосове молоко, екстракт картоплі.

Необхідна комбінація фітогормонів для культивування пиляків залежить від виду рослини. Для деяких видів рослин придатне поєднання 2,4-Д і цитокінінів з послідувачим виключенням ауксинів за розвитку ембріодів. Для інших видів рослин використовується НОК з цитокінінами. Загальною закономірністю є необхідність використання низьких концентрацій фітогормонів, оскільки високі концентрації регуляторів росту можуть призвести до утворення вторинного калюсу. Часто для андрогенезу рекомендують використання менш активних регуляторів росту, таких, як гіберелова кислота, 2,3,5-трийодбензойна кислота, етилен, глутатіон, аскорбінова кислота.

У деяких видів рослин ефективність ембріогенезу на пиляках значно підвищується за добавку в поживне середовище активованого вугілля.

Як правило, культивування пиляків або ізольованого пилку здійснюється за температури 25-28 °С. В процесі культивування пиляки темніють і здаються загиблими. Але на 4-5 день культивування *in vitro* у пилкових гніздах ізольованих пиляків мікроспори під дією регуляторів росту перетворюються в ембріоди. Через 3-4 тижні (деколи кілька місяців) почорнілі пиляки розтріскуються і з тріщин з'являються проростки.

Згадаємо, що розвиток мікроспори у пиляках рослин *in vivo* відбувається шляхом того, що ядро мікроспори ділиться і утворюється генеративна і вегетативна клітини (чоловічий гаметофіт). Оскільки поділ мікроспори відбувається нерівномірно, то такий поділ називається асиметричним. У генеративній клітині міститься незначна кількість цитоплазми, вона набуває лінзоподібної форми. Ядро генеративної клітини ділиться і утворюється два спермія. Ця генеративна клітина є метаболічно малоактивною і представляє собою найбільш спеціалізовану клітину рослини. На відміну від генеративної у вегетативній клітині здійснюється інтенсивний синтез РНК, білків.

Культивування пиляків в умовах *in vitro* на поживних середовищах з експериментально підібраним для кожного виду рослин співвідношенням регуляторів росту змінює напрям розвитку мікроспори. Замість розвитку чоловічого гаметофіту індуковані до розвитку *in vitro* одноядерні мікроспори діляться симетрично і асиметрично. Якщо після першого симетричного поділу клітини продовжують ділитися симетрично, то результатом цього поділу є утворення ембріодоподібної структури, з якої у подальшому розвивається гаплоїдна рослина. Якщо ж одноядерна мікроспора поділилася асиметрично, то утворюється вегетативна та генеративна клітини. Доля цих новоутворених клітин може бути різною. Якщо вегетативне ядро продовжує ділитися асиметрично, то утворюються структури, не здатні до ембріогенезу, які гинуть. Якщо ж вегетативне і генеративне ядра продовжують ділитися симетрично після першого асиметричного поділу, то формуються ембріоїди, з яких розвиваються гаплоїдні рослини. У більшості видів рослин генеративна клітина гине, а з вегетативної клітини розвивається кулеподібна щільна структура – проембрію, яка у подальшому диференціюється в ембріод.

Рідко з пилку розвиваються не лише ембріодоподібні структури, але й калюсні тканини, з яких теж можуть бути отримані ембріоїди.

Вважаємо за доцільне звернути особливу увагу на ті чинники, від яких залежить ефективність андрогенезу.

## **Чинники, що впливають на андрогенез**

### **1. Стадія розвитку мікроспори.**

Обов'язковим є використання пиляків на стадії одноядерних мікроспор.

### **2. Генотип рослини.**

За вивчення ролі генотипу для процесів андрогенезу було встановлено ряд особливостей, які варто враховувати в роботі з гаплоїдизації. Присутність у генотипі ярових злаків, домінантного алеля локусу *Vrn 1*, забезпечує підвищення частоти формування ембріодів і регенерантів. У гібридів, отриманих шляхом схрещування озимих і ярових пшениць, частота формування гаплоїдних регенерантів буде вищою, аніж у їх озимих батьків.

Встановлена роль деяких хромосом у процесах андрогенезу. Зокрема, в м'якої пшениці андрогенез знаходиться під генетичним контролем великої мультигенної системи. Індукція морфогенезу знаходиться під впливом 7А і 1В хромосом, а регенерація рослин – під контролем 3А і 2Д хромосом. Етапи андрогенезу знаходяться під ядерно-цитоплазматичним контролем.

Відкриття генетичного контролю андрогенезу дало можливість використовувати для створення гомозиготних ліній пшениці та й деяких інших видів рослин певні генотипи, які мають досить високу здатність до регенерації (так звані донори, або генетичні джерела). Використовуючи донорів у схрещуваннях в якості батьківських форм, вдається передати ці гени іншим рослинам з потрібними сільськогосподарськими генотипами. Завдяки цьому вдається збільшити вихід подвоєних гаплоїдів більш, ніж у п'ять разів.

### **3. Фізіологічний стан рослини.**

Одним з головних чинників, від яких залежить здатність деяких генотипів до андрогенезу, є умови вирощування донорних рослин. Зокрема, вихід гаплоїдів з пиляків рослин буде значно більшим, якщо донорні рослини виростили в польових умовах, порівняно з оранжерейними рослинами. Як правило умови оранжереї негативно впливають на метаболізм пиляків.

Для підвищення інтенсивності виходу гаплоїдів, особливо у злаків, донорні рослини в період формування пиляків (на стадії виходу колосу у

трубку) витримують при низькій температурі (1-5 °C), а донорні рослини капусти і перцю необхідно витримувати при температурі 32-33 °C протягом двох днів. Найкраще вивчені умови вирощування для тютюну *Nicotiana tabacum*. Для цієї рослини важливими є короткий світловий день (8 год) та інтенсивність освітлення в 11000 лк. Для ячменю *Hordeum vulgare* рекомендована знижена температура вирощування (12 °C) та висока інтенсивність світла (20000 лк).

### ***Гіногенез***

***Гіногенез*** – це одна з форм партеногенезу, яка полягає в стимуляції розвитку зародка з яйцеклітини. Метод індукції гіногенезу в культурі насінних зачатків і зав'язей є одним з ефективних методів одержання гаплоїдних рослин для більшості покритонасінних, у тому числі для рису, соняшнику, цукрових буряків, цибулі, гербери.

### ***Використання гаплопродюсерів***

У середині 70-х років минулого століття було відкрите явище ***елімінації хромосом*** одного з батьківських генотипів у процесі розвитку гібридних зародків, що призводило до утворення гаплоїдів. Це відкриття було зроблене на ячмені і сприяло розробці прискореного отримання гомозиготних рекомбінантних ліній культурного ячменю *Hordeum vulgare* на основі схрещування *H. vulgare* x *H. bulbosum* та пошуку нових гаплопродюсерів (продуцентів гаплоїдів) для отримання гаплоїдів, особливо у злаків.

Явище елімінації хромосом одного з батьків є одним із механізмів несумісності між різними видами, що обмежує утворення міжвидових гібридів. Так, за міжвидової гібридизації *H. vulgare* x *H. bulbosum* запліднення відбувається нормально, проте на ранніх стадіях розвитку зародка хромосоми *H. bulbosum* елімінують. Незрілі зародки вичленують на 10-12-ту добу після запліднення і переносять на поживні середовища (звичайно В<sub>5</sub> Гамборга) для культивування *in vitro*. В умовах *in vivo* такі зародки гинуть на ранніх стадіях розвитку. Обробка запиликів колосків гібереловою кислотою низької концентрації (25-100 мг/л) протягом кількох діб значно підвищує вихід

гаплоїдних рослин. Подібним чином отримують гаплоїди м'якої пшениці та її гібридів, схрещуючи її з кукурудзою, теосінте, сорго, дикою формою ячменю *H. bulbosum*. Гаплоїди тютюну *N. tabacum* отримують у разі його схрещування з дикоростучими видами, наприклад, *N. africana*.

У процесі віддаленої гібридизації гаплоїди одержують внаслідок стимуляції яйцеклітини до партеногенетичного розвитку. Наприклад, партеногенетично гаплоїди картоплі *S. tuberosum* отримують у разі її запилення пилком *S. phureja*. Проте, в цьому разі гаплоїдні зародки розвиваються повільно, часто гинуть і тому їх вичленують і переносять в умови *in vitro* для формування гаплоїдних рослин.

#### **2.8.5. Культура ізольованих зародків (ембріокультура)**

Метод вирощування ізольованих зародків на штучних живильних середовищах (ембріокультура) започаткований у 1904 р. Ханнігом. Культивування *in vitro* зародків передбачає вирощування їх на спеціально підібраних середовищах в асептичних умовах, попередньо ізольованих з дозрілого (нормально сформованого) насіння, з недозрілого насіння (на ранніх стадіях розвитку). У першому випадку зародки повністю диференційовані, у другому – знаходяться на різних фазах розвитку.

Практичне значення культури ізольованих зародків з дозрілого насіння полягає в прискореному отриманні рослин з насіння, що погано або зовсім не проростає, а також у виведенні зародка із стану спокою, що починається ще під час дозрівання насіння на рослині. Стан спокою зародка може бути коротким, але іноді для його подолання потрібно застосовувати спеціальні прийоми впливу на насіння, такі, як стратифікація – дія знижених температур – або скарифікація – пошкодження шкірки твердої насінини з метою підвищення здатності до набухання для прискорення проростання. Вирощування в стерильних умовах на штучних живильних середовищах дає змогу застосовувати різні речовини для подолання спокою і стимулювання росту

зародка. Класичним прикладом в цьому відношенні є *Musa balbisiana* – дика форма культурного банана.

Культивування зародків з дозрілого насіння відносно нескладне, тому може бути організоване в будь-якій лабораторії біологічного профілю. Під час культивування ізольованих зародків з дозрілого насіння звичайно використовують просте мінерально-сахарозне середовище без вітамінів і регуляторів росту, оскільки біологічно активні речовини часто викликають появу ненормальних форм зі спотвореними окремими органами і калюсоутворенням. Зародки, як правило, виділяють з дозрілого насіння після набухання. Насіння стерилізують, іноді додатково обпалюють в полум'ї спиртівки, а потім у стерильних умовах виділяють зародки.

Метод культури незрілих зародків найчастіше використовується тоді, коли неможливо ефективно одержати визначену генетичну комбінацію бажаних ознак традиційними методами. Культивування незрілих зародків здійснюють після проведення віддаленої гібридизації, метою якої є збільшення генетичного різноманіття серед важливих сільськогосподарських культур. Отримані в результаті віддаленої гібридизації зародки, як правило, є не життєздатними, страждають від генетичної несумісності і абортуються на ранніх етапах розвитку у тому випадку, якщо не будуть збережені завдяки дорощуванню в штучних умовах *in vitro*. Здебільшого бар'єр несумісності під час розвитку гібридного зародка виникає на середніх і пізніх стадіях ембріогенезу. Звичайно це проявляється в порушенні розвитку ендосперму або повній його відсутності, що призводить до загибелі зародків. Спеціально підібраний склад компонентів живильних середовищ для культивування незрілих зародків надає всі необхідні речовини для нормального розвитку зародка і, таким чином, замінює ендосперм.

Найважливішою вимогою при роботі з ізольованими зародками є вибір живильного середовища, здатного підтримувати їх ріст і розвиток. Незважаючи на те, що склад живильних середовищ змінюється залежно від виду культивованих зародків, очевидно, що чим молодший зародок, тим вищі

вимоги до складу живильних середовищ. Наприклад, якщо відносно зрілі зародки можна вирощувати на середовищах тільки з додаванням солей і сахарози, то для нормального розвитку зародків, ізольованих на ранніх стадіях, необхідні вітаміни, амінокислоти, фітогормони, а також складні комплексні добавки у вигляді екстракту дріжджів, гідролізату казеїну, кокосового молока тощо. Рекомендується також додавання манітолу й інших компонентів, що забезпечують оптимальний осмотичний тиск, необхідний для правильного розвитку ембріона. Отримані гібридні рослини дорощують в умовах теплиць.

Метод культивування незрілих зародків застосовують більш ніж для 70 видів рослин. Зокрема, цей метод успішно використовують на таких рослинах, як льон, кокосова пальма, горох, а також у разі одержання нових гібридних комбінацій вігні, квасолі, *Triticum* x *Aegilops*, гібридів ячменю і жита, кукурудзи і сорго, конюшини і різноманітних злакових культур. Цей метод дуже важливий при роботі з тритикале і деякими олійними культурами.

Ембріокультури широко використовують у селекції плодових. Особливо вони ефективні в селекції ранньостиглих сортів, коли плоди дозрівають раніше часу, потрібного для нормального розвитку зародка. Подальша селекційна робота з такими сортами залучає метод ембріокультури.

#### **2.8.6. Запліднення *in vitro***

Здолати труднощі, що виникають внаслідок невідповідності репродуктивних органів схрещуваних рослин можна за допомогою запліднення в умовах *in vitro*.

Технологічно метод передбачає обов'язкову кастрацію самоzapильних рослин за кілька днів до розпускання пуп'янків з наступною ізоляцією пергаментними чи марлевими ізоляторами. За день до розкриття пуп'янків їх зрізають, кілька секунд витримують у 70%-му етиловому спирті та стерилізують протягом 10 хв хлорною водою. Потім з пуп'янків офтальмологічними пінцетами вилучають або цілу маточку (з приймочкою, стовпчиком та зав'яззю), або зав'язь, стінку якої розрізають, щоб оголити

насіннєві зачатки. Іноді вирізають шматочки плаценти з насіннєвими зачатками.

Ізольовані таким чином складові квітки переносять на живильне середовище, а через 2-3 доби до них додають стерильний пилок, що за декілька годин проростає пилковою трубкою, чим забезпечується запліднення яйцеклітини та утворення зиготи.

### ***2.8.7. Культура ізольованих 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 ХХ ст. англійський вчений Едвард Кокінг запропонував метод руйнування клітинної оболонки, в результаті якого живий вміст клітини або клітина без оболонки, але з плазматичною клітинною мембраною, залишається неушкодженою та життєздатною. 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, виділення з клітин мутантного походження або клітин іншого виду чи навіть роду рослин.

Існує два способи руйнування клітинної оболонки – ***механічний і ферментний***. Механічний спосіб обмежений незначним виходом протопластів, а також вузьким діапазоном видів рослин, до яких його можна застосувати. Перше повідомлення про використання ферментів для виділення протопластів було зроблено в 1960 р. Протопласти з клітин корінців томатів були отримані



методом їх обробки неочищеним ферментом целюлазою, одержаним з гриба *Myrathecium verrucaria*. Запропонована методика нині значно модифікована й удосконалена завдяки використанню різних ферментів і їх сумішей. До найчастіше вживаних ферментних препаратів для виділення протопластів належать дрейселаза базидіоміцетів (збагачена целюлазою і пектиназою), пектиназа *Rhizopus* та ін.

Кількість ферменту в розчині для руйнації клітинних оболонок варіює від 0,025 до 5% і залежить від типу ферменту та джерела протопластів.

Ферментні суміші для ізолювання протопластів готуються на осмотичних стабілізаторах. Рекомендується використовувати метаболічно активні стабілізатори (глюкозу, сахарозу, сорбітол) разом з метаболічно інертними (манітолом), тому що перші активно засвоюються протопластами під час їхнього росту й утворення клітинної оболонки, що призводить до редукції осмотичного тиску в середовищі для культивування протопластів.

Для стабілізації мембран протопластів у деяких випадках добавляються мінеральні солі, особливо двовалентні катіони  $\text{Ca}^{2+}$ . Декстран-сульфат калію і поліаміни додають для нейтралізації шкідливої дії деяких токсичних чинників (наприклад, рибонуклеаз) під час ізолювання протопластів, а сироватку бичачого альбуміну – для зменшення руйнування органел.

Оптимальний рН середовища знаходиться в межах 5,5 – 6,0.

Температура, при якій здійснюють виділення протопластів, може коливатися від 20 до 30 °С. Позитивні результати отримують за порівняно низьких (+20 °С) і високих (+36 °С) температур. Для злакових культур ефективна обробка за знижених температур (+14 °С) у поєднанні з короткочасною інкубацією при +30 °С. Час, необхідний для ізолювання протопластів, може варіювати від 30 хв до 24 год і залежить від вихідного матеріалу, суміші ферментів, рН інкубаційного середовища і температури.

Протопласти ізолюють з культивованих *in vitro* клітин і тканин, але найбільш вживаними джерелами для цих цілей є тканини листків і клітинні суспензії. Перед виділенням протопластів поверхню листків стерилізують,

епідерміс нижньої поверхні листків видаляють або натирають карборундом, або для поліпшення проникнення ферментів листки густо надрізають. Переважно використовують листки стерильних рослин, що культивують *in vitro*, оскільки при цьому забезпечується однорідність вихідних тканин, наявність стерильного матеріалу в будь-яку пору року, незалежно від сезону, а також висока повторюваність результатів.

### ***Очищення протопластів***

Після руйнування клітинних стінок суспензія протопластів очищається від решток клітин і тканин фільтруванням крізь стінки або фільтри з діаметром отворів від 40 до 150 мкм. Інкубаційна суміш ферментів видаляється центрифугуванням з наступним 3-4-кратним відмиванням у промивному розчині або культуральному середовищі. Іноді використовують промивання протопластів методом флотації в концентрованих розчинах сахарози, манітолу або фіколу. Для ефективного видалення решток клітин, і особливо клітинних органел, що забруднюють культури протопластів, ефективні центрифугування у градієнті щільності.

### ***Культивування протопластів***

Після очищення протопласти ресуспендують у культуральному середовищі. Мінімальна щільність при цьому становить  $10^4$  в 1 мл культурального середовища. Проте, більш придатна щільність протопластів  $10^5$  в 1 мл. Сприятливі умови культивування стимулюють регенерацію клітинних стінок і перші поділи клітин.

Для культивування протопластів застосовуються загальновідомі поживні середовища (B<sub>5</sub>, MC, Као та Михайлюка), що модифікують залежно від специфічних вимог культури протопластів. Поживні середовища діляться на хімічно визначені і комплексні. Так, для вирощування окремих протопластів *Vicia hajastana* використовують комплексне середовище Као та Михайлюка, що містить як доповнення до нормального складу неорганічні речовини, 14 вітамінів, ауксини і цитокініни, різноманітні органічні кислоти, 10 видів цукрів

і цукрових спиртів, 21 амінокислоту, основи нуклеїнових кислот, гідролізат казеїну і кокосове молоко.

Протягом перших діб протопласти культивуються в темряві або за слабого освітлення (100–300 лк), після чого інтенсивність освітлення збільшують до 2 – 5 тис. лк.

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 чашку Петрі поміщають кілька крапель стерильної води.

**Суспензії протопластів.** Протопласти суспендують у тонкому прошарку (1мм) рідкого поживного 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. Протопласти можуть бути суспендовані у напіврідкому середовищі (0,4% агару ) або на поверхні культурального середовища (0,8% агару).

**Культивування на „живильному прошарку”.** Неподільні, але з активним метаболізмом клітини, опромінені рентгенівськими або гамма-променями і занурені в живильне середовище, можуть підтримати 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.

### ***Регенерація рослин з протопластів***

У процесі культивування життєздатні протопласти регенерують клітинну оболонку і перетворюються на звичайну культивовану *in vitro* клітину. Попередники целюлози і пектинових речовин синтезуються в основному в апараті Гольджі, але можуть утворюватись і в інших клітинних структурах, наприклад, в ендоплазматичній сітці під контролем ядра. Протопласти без ядра (цитопласти) не можуть відновлювати нову клітинну оболонку.

Утворення клітинної стінки протопластів починається відразу після відмивання ферментів, за допомогою яких вони були отримані. Так, у *Vicia hirsutana* поява перших целюлозних мікрофібрил на поверхні протопласта починається вже через 10-20 хв, а через 20 год вони утворюють густу сітку. Ушкодження зв'язку клітинної стінки з плазмолемою, очевидно, спонукає до дії механізми відновлення клітинної стінки. Протопласти рослин родини пасльонових, хрестоцвітих, зонтичних утворюють клітинну стінку протягом близько 24 год. Через 24-36 год спостерігаються перші поділи клітин, а через 3-4 тижні утворюються колонії калюсних клітин. У процесі культивування поступово (через 2 тижні) знижують осмотичний тиск у культуральному середовищі з метою прискорення поділу клітин. Потім калюси субкультивують на агаризоване середовище для регенерації рослин.

У багатьох сільськогосподарських рослин дотепер неможливо одержати культуру протопластів з наступною регенерацією рослин, оскільки невідомі чинники, що визначають клітинну проліферацію і диференціацію. У тютюну й інших представників пасльонових (петунія, картопля, томати) рослини з протопластів регенеруються легко, тоді як у злакових і бобових (двох найважливіших родин харчових рослин) це залишається проблемою внаслідок недостатніх фундаментальних знань з біології рослинної клітини та генетичних особливостей детермінації клітин до морфогенезу. У деяких рослин (соя, картопля, черешня, груша) вплив на протопласти електричним полем напругою

до 125 В/см, що спричиняє електропробій, стимулює поділ отриманих з протопластів клітин, сприяє регенерації рослин, поліпшує укорінення. Механізми прискорення процесів морфогенезу електрообробкою протопластів не встановлені. Можливо, вона впливає на мембрани, посилюючи поглинання фітогормонів, або посилює синтез ДНК. Ефективність поділу клітин з протопластів підвищується дією теплового шоку на останні перед їхнім висіванням на збагачене поживне середовище з агарозою.

Кількість і різноманітність видів рослин, у яких культивування протопластів призводить до утворення калюсних колоній, безупинно збільшується. Регенерація ембріоподібних структур, ембріодів і бруньок відзначена в культурі протопластів 212 видів вищих рослин, представлених 96 родами і 31 родиною.

#### **2.8.8. Парасексуальна (соматична) гібридизація**

Гібридизація за допомогою злиття протопластів, гібридних клітин, отриманих методом, який не передбачає статевого схрещування, називається **парасексуальною (соматичною)**.

Це повністю штучний метод гібридизації, що використовується для багатьох видів рослин. Для записування парасексуальних гібридів замість знаку „x” ( A x B ), яким позначається статевий схрещування, використовується знак „+”, наприклад, *N. tabacum* + *N. glauca*.

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

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

### *Принципи соматичної гібридизації*

Перші гібридні клітини були отримані в результаті експериментів з соматичними клітинами тварин ще на початку 60-х років ХХ ст. За допомогою методів гібридизації соматичних клітин тварин вирішується багато теоретичних проблем біології і медицини, наприклад, використання гібридом для отримання соматоклональних антитіл.

Соматичні гібриди рослин отримані набагато пізніше. Методи соматичної гібридизації рослин почали активно розроблятися після налагодження методів виділення та злиття протопластів. Важливою особливістю соматичних гібридів рослин є той факт, що завдяки тотипотентності, притаманній клітинам рослин, у дослідників виникає можливість отримати повноцінний організм з однієї-єдиної гібридної клітини. У зв'язку з зазначеним фактом метод парасексуальної гібридизації з застосуванням соматичних клітин є інструментом не тільки генетичного аналізу, а і генетичного поліпшення рослин. Таким чином, соматична гібридизація є новим засобом гібридизації, що дозволяє долати обмеження статевого процесу і штучно конструювати нові рослини.

Соматична гібридизація дає змогу:

- схрещувати філогенетично віддалені види рослин (організмів), які неможливо схрестити звичайним статевим шляхом;
- одержувати асиметричні гібриди, що несуть весь генний набір одного з батьків поряд з декількома хромосомами (або декількома генами, або тільки органелами і цитоплазмою) іншого;
- створити систему гібридизації, яка включає одночасне злиття трьох і більшої кількості батьківських клітин;
- одержувати гібриди, що є в генетичному розумінні сумою ідіотипів батьків;
- отримувати рослини, гетерозиготні за позаядерними генами;
- долати обмеження генеративних систем несумісності;
- схрещувати форми, які неможливо гібридизувати статевим шляхом внаслідок відхилень в морфогенезі або гаметогенезі батьків;

- гібридизувати клітини, що несуть різноманітні епігенетичні програми.

Отже, соматична, або парасексуальна гібридизація є методом подолання статевої несумісності рослин, перенесенням ядерних і цитоплазматичних геномів.

### ***Злиття протопластів***

З метою злиття протопластів соматичних клітин рослин використовують хімічний та електричний методи.

***Хімічний метод*** полягає в додаванні до суспензії протопластів речовин, які стимулюють їх злиття, наприклад, нітрати, головним чином  $\text{NaNO}_3$ . Для нейтралізації негативного заряду на поверхні протопластів та покращення процесу їх злиття, застосовують такі прийоми як підвищення концентрації йонів  $\text{Ca}^{+2}$  (50 мМ) в середовищі та збільшення рН до показника 10,5. Метод ефективний для злиття мезофільних протопластів, але непридатний для злиття протопластів отриманих з калюсних клітин. Для зближення протопластів застосовують центрифугування за невеликих швидкостей (60 об/хв протягом 2–3 хв).

Іншим індуктором злиття протопластів є поліетиленгліколь (ПЕГ). Попередня обробка суспензії протопластів концентрованим (20-30%) розчином ПЕГ призводить до злипання клітин і забезпечує їх злиття з утворенням гібридом. Через 10-15 хв ПЕГ видаляється з середовища за рахунок відмивання протопластів розчином, який має лужний рН (9 – 11) і високий вміст йонів  $\text{Ca}^{+2}$  (100-300 мМ). В означеному розчині мембрани протопластів зливаються. Застосовуючи ПЕГ, можна злити 10-50% протопластів від загальної кількості.

На сьогоднішній день існує декілька теорій щодо механізмів злиття протопластів під впливом ПЕГ:

1. Внаслідок дегідратації протопластів;
2. ПЕГ поглинає вільну воду між протопластами, розриваючи подвійний шар мембрани і сприяючи злиттю оголених місць мембрани;

3. ПЕГ зменшує полярність водяного середовища, що перерозподіляє полярні і гідрофобні компоненти мембрани, стабілізуючи ліпідні структури мембрани;
4. ПЕГ індукує утворення пор на всій поверхні мембрани, крізь які відбувається перетікання внутрішньоклітинного матеріалу.

Відразу після злиття протопластів на певних ділянках мембрани клітин зберігаються пори, що утворились під впливом хімічних чинників, однак, за деякий час злиті протопласти округлюються, у них відновлюється регенерація клітинних стінок і відбувається поділ утворених клітин.

Метод злиття протопластів з використанням хімічних реактивів має цілу низку недоліків:

- частина протопластів пошкоджується і гине;
- часто зливається не два, а більше протопластів, які виявляються нежиттєздатними;
- протопласти, що не злилися, часто залишаються у вигляді конгломератів клітин, не здатних до подальшої регенерації.

Недоліки попереднього методу спонукали до створення нового методу злиття протопластів, який і був розроблений на початку 80-х років ХХ ст.

**Метод електрозлиття.** Цей метод злиття протопластів ґрунтується на використанні електричного поля для аглютинації і наступного злиття клітин. З цією метою в суспензії протопластів розміщують два електроди, на які подають електричний струм. Змінний електричний струм спричинює диелектрофорез, в результаті чого протопласти вишукуються у ряд, приєднуючись своїми полярними поверхнями один до одного. Такі ланцюжки протопластів стабільні тільки протягом часу існування електричного поля. Додатковий поодинокий сильний імпульс (600 В/см, 10- 20 мкс) призводить до утворення пор на сильно стиснутих мембранах протопластів, у результаті чого відбувається перетікання вмісту від однієї клітини до іншої.

Після відключення електричного струму злиті протопласти повертають свою сферичну форму та відновлюють біохімічні процеси.



Злиття протопластів під дією електричного поля відбувається з високою ефективністю без застосування хімічних стимуляторів за кімнатної температури і фізіологічних значень рН.

Сильний короткий імпульс стискає мембрану і призводить до діелектричного розривання в місцях контакту плазмалем протопластів. Електричне поле спричиняє латеральну дифузію білків мембрани і створює безбілкові ділянки, за допомогою яких і здійснюється контакт між мембранами протилежних протопластів. Навколо цих ділянок можливий обмін ліпідними молекулами і утворення ліпідних містків, що призводить до злиття мембран. За допомогою електричного поля можна здійснити злиття протопластів різних видів рослин. Ефективність цього методу складає 80-100%.

У той же час метод електрозлиття потребує дорогого устаткування, і тому часто для злиття протопластів застосовують різноманітні модифікації хімічного методу. На злиття протопластів діє багато чинників, зокрема особливості ультраструктури клітин. Так, меристемні і калюсні протопласти зливаються легко, а вакуолізовані та фотосинтезуючі – важче. Впливають також видові особливості: клітини тютюну зливаються гірше, ніж клітини моркви, картоплі, арабідопсіса; протопласти однодольних рослин легше спонукаються до злиття, ніж протопласти дводольних.

### ***Методи добору гібридних клітин і рослин***

У результаті злиття протопластів звичайно виникають два типи гібридних клітин – ***гомокаріони*** (складаються з клітин одного батька) і ***гетерокаріони*** (складаються з клітин обох батьків).

Гетерокаріони або гетерокаріоцити, кількість яких значно менша, ніж вихідних батьківських протопластів, легко втрачаються в процесі культивування. Тому успішне одержання соматичних гібридів значною мірою залежить від ефективності засобів виявлення і виділення продуктів злиття. Селекція може бути проведена безпосередньо після процедури злиття або на різноманітних стадіях культивування соматичних гібридів.

Існують різні методи тестування протопластів після їх злиття та регенерованих з них рослин, до них відносяться:

- генетична комплементация;
- фізіологічна комплементация;
- біохімічна комплементация;
- візуальний метод;
- використання біохімічних мутантів;
- добір за інтенсивністю росту;
- добір за морфологічними ознаками.

### ***Генетична комплементация***

Для доказу гібридної природи рослин, регенерованих з гібридних клітин, використовують генетичну комплементацию. ***Генетична комплементация*** – це така взаємодія генів у гібридній клітині, внаслідок якої відновлюється функція дефектних генів. Наприклад, як батьківські лінії використовували два сорти тютюну, що відрізнялися дефектними хлоропластами. У кожного сорту ядерний геном містив рецесивні гени V і S, які спричинюють світло-залежну хлорофілну недостатність. Рослини, гомозиготні за будь-яким з цих генів, у разі вирощування за інтенсивного освітлення знебарвлюються і гинуть. Статеві гібриди мають нормальні хлоропласти, тому що мутації в їхніх клітинах комплементували. Такий самий результат отримують після злиття гаплоїдних протопластів обох сортів. Експеримент складався з декількох етапів. Спочатку в культурі пиляків були отримані гаплоїдні рослини, які вирощували за слабого освітлення і тому мали зелений колір. Потім з їхніх листків виділяли протопласти, зливали і культивували до утворення клітинних колоній. Останні пересаджували на середовище для індукції стеблового органогенезу і культивували при освітленні 10 000 лк. За таких умов тільки гібридні рослини утворювали хлорофіл і виживали, негібридні були альбіносами і гинули.

Хлорофілдефектні мутації, контрольовані хлоропластними генами, притаманні багатьом культурним рослинам, тому використання генетичної комплементации на їх основі є одним з найбільш надійних і простих шляхів

ідентифікації соматичних гібридів. Перевагою роботи з ними є можливість виявлення цитоплазматичних гібридів, а також цитоплазматичних гетерозигот. Проте, недоліком методу є те, що гібриди добираються лише на стадії регенерації рослин, тобто втрачається багато часу.

Крім хлорофільних мутантів для селекції парасексуальних гібридів методом генетичної комплементачії використовують й інші мутанти, наприклад ауксотрофні. Ауксотрофи – це біохімічні мутанти клітин, які внаслідок мутації втратили спроможність рости на звичайному поживному середовищі і потребують додаткових речовин, синтез яких у них блокований мутацією. Наприклад, виділено один гібрид печінкового моху шляхом злиття протопластів чоловічого штаму, ауксотрофного за глюкозою, з протопластами жіночого штаму, дефектного за нікотиновою кислотою.

Іншим методом добору гібридних клітин є **фізіологічна комплементачія**, для якої характерна здатність гібридних клітин жити і розмножуватися або переходити до організованого росту (морфогенезу) в умовах культури, при яких батьківські клітини цього робити неспроможні. Ця здатність батьків до росту і морфогенезу не пов'язана з мутацією, а є нормальною фізіологічною реакцією на зовнішні умови. Вперше успішно використали цей метод П. Карлсон зі співробітниками в 1972 р. під час одержання міжвидового соматичного гібриду у тютюнів *Nicotiana glauca* і *N. langsdorffii*. Клітини статевих гібридів між цими видами були отримані раніше і не потребували для росту в умовах *in vitro* ауксинів. Клітини батьківських видів у культурі *in vitro* були ауксин-залежними. Протопласти з мезофілу листків обох видів зливали з наступним культивуванням на середовищі без ауксинів. Клітини, спроможні рости за цих умов, були гібридними.

При використанні фізіологічної комплементачії спочатку вивчають умови культивування для росту батьківської форми і виявляють придатні для росту клітин одного батька і непридатні для іншого. Потім суспензію клітин після злиття поміщають послідовно на ці різні живильні середовища, у кожному з

них відповідно гинуть клітини одного з батьків, але продовжують рости і розвиватися гібридні клітини.

Існують й інші підходи селекції гібридних клітин після злиття протопластів, що можна використовувати в тому разі, коли немає специфічних генетичних маркерів або не вивчена можливість застосування фізіологічної комплементарності. Ці методи полягають в інактивації протопластів перед злиттям речовинами – інгібіторами метаболізму клітини. Функціонування клітин відновлюється методом злиття з іншими клітинами, інактивованими іншими інгібіторами, тобто відбувається своєрідна **біохімічна комплементарність**.

Метод обробки метаболічними інгібіторами популяцій вихідних клітин для соматичної гібридизації полягає в тому, що батьківські клітини обробляють інгібіторами незворотної дії, такими, як йодацетат, йодацетамін або діетилпірокарбамід, внаслідок чого розвиваються лише гібридні клітини. Обробка йодацетатом використана для одержання соматичних гібридів *N. sylvestris* + *N. tabacum* і *N. plumbaginifolia* + *N. tabacum*. Для одержання соматичних гібридів ефективний спосіб, коли протопласти одного батька обробляють біохімічним інгібітором, що інактивує метаболізм цитоплазми, а протопласти іншого батька опромінюють гамма-променями  $^{60}\text{Co}$  або рентгенівськими променями, що інактивують основні функції ядра. Життєздатними після такої обробки є лише гібридні клітини.

Проте вважається, що селекція за принципом компліментарності призводить до виживання переважно амфідиплоїдних соматичних гібридів і виключення інших потенційно цінних генотипів. Останні можуть містити один повний геном і лише декілька хромосом іншої батьківської рослини, тобто бути асиметричними і тому губляться в процесі жорсткого добору. Внаслідок цього добір окремих гетерокаріонів ефективніше проводити візуальним методом.

**Візуальний метод** ґрунтується на виділенні ознаки, за якою можна було б легко ідентифікувати гібридні клітини з суміші батьківських. Наприклад, використовуючи інвертований мікроскоп і мікроманіпулятор, можна відібрати продукт злиття протопластів мезофілу (зелені пластиди, мало цитоплазми,

велика вакуоля) і калюсів (збагачених цитоплазмою з чітко вираженими цитоплазматичними тяжами, добре видимим ядром). Перевагою цього методу селекції гібридних клітин є те, що він не пов'язаний з використанням мутантів або попереднім вивченням різноманітних умов культивування.

За відсутності природних візуальних маркерів протопласти до злиття фарбують флуоресціюючими барвниками. Протопласти для злиття мітять фарбами з різною флюоресценцією. Наявність двох кольорів флюоресценції в одній клітині і є показником здійснення потрібного злиття. На виживання клітин фарба не впливає.

Проте, метод візуальної селекції клітин має свої недоліки. Здебільшого він застосовується для протопластів калюсної тканини, тому що їх легше культивувати в індивідуальній культурі. Селекція і подальше культивування в мікрокраплях окремих гетерокаріоцитів (гібридних клітин) є водночас і методом клонування, тобто одержання популяції клітин від однієї клітини. Клонування окремих продуктів злиття протопластів гарантує одержання гібридних рослин.

### Розділ 3

## Лабораторні роботи, рекомендовані до курсу «Біотехнологія рослин»

### Лабораторна робота № 1. ПРИНЦИПИ ТА МЕТОДИ ВИРОЩУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН РОСЛИН

#### Матеріали та обладнання

- ламінар-бокс для досягнення стерильних умов роботи;
- автоклав;
- рН-метр;
- інструменти (пінцети, скальпелі);
- лабораторний посуд (склянні та пластикові чашки Петрі, колби, хімічні стакани);
- мембранні фільтри;
- хімічні реактиви (макро- та мікросолі, цукри, фітогормони, вітаміни, амінокислоти, агар);
- стерилізуючі розчини (гіпохлорид натрію, хлоракс, 70% етанол);
- стерильна дистильована вода;
- рослини, вирощені в стерильних умовах, насіння.

#### Практична частина

На першому етапі необхідно підготувати ламінар-бокс до роботи в умовах стерильності. З цією метою поверхню ламінар-боксу стерилізують ультрафіолетом протягом 30 хв, після чого її обробляють 70% етанолом. Інструменти та посуд, що використовують в роботі попередньо стерилізують в автоклаві протягом 25 хв при 1-1,2 атм. Безпосередньо перед використанням інструменти поміщають в ємність з етанолом та при необхідності пропалюють над полум'ям спиртівки.

На другому етапі необхідно здійснити стерилізацію рослинного матеріалу. Для ніжних тканин рослин (листя, бруньки, пиляки, сім'язчатки)

використовують 70% етанол протягом 1-2 хв, насіння, фрагменти стебел або інші частини рослин, що мають щільні покрови стерилізують гіпохлоридом натрію протягом 30-40 хв.

Третім етапом є підготовка поживних середовищ, які будуть використовуватись для культивування експлантів. Розчини макро- та мікросолей, вітамінів, цукрів, амінокислот готують відповідно до пропису з використанням дистильованої або бидистильованої води. Розчини фітогормонів готують з дотриманням певних методичних підходів. Так, ауксини (2,4-Д, НОК, ІОК або ІМК) – 100 мг речовини – розчинюють в 0,5-2 мл етанолу, підігрівають та доводять до 100 мл дистильованою водою; цитокініни (кінетін, зеатин, БАП) розчинюють у невеликому об'ємі 0,5 н НСІ, підігрівають та додають необхідний об'єм води.

Після введення в середовище всіх необхідних компонентів об'єм доводять до необхідного, перевіряють рН. Середовища можуть бути рідкими або твердими. В останньому випадку в середовище додають агар-агар у концентрації 0,8 мг/л. Стерилізацію твердих середовищ здійснюють за допомогою автоклава, рідкі середовища, які містять компоненти, що можуть зазнати руйнування при високих температурах, стерилізують за допомогою фільтрування через мембранні фільтри з використанням спеціальних вакуумних насосів.

Отримання калюсної тканини. Для індукції калюсу стерильні експланти поміщають на поживне середовище. Інкубацію тканин здійснюють в термостаті при температурі 23-28 °С. Після утворення калюсу необхідно його пересаджувати на свіже середовище, ідентичне до попереднього або інше за вмістом фітогормонів в залежності від потреб експерименту.

Отримання суспензійної культури. Калюс поміщають в рідке середовище; з метою покращення аерації і живлення клітин суспензію утримують на круглій качалці з діаметром обертів 2-4 см і швидкістю 30-140 об/хв.

Регенерація рослин з калюсу. Для отримання органогенезу калюс пересаджують на середовище з підвищеним вмістом цитокинінів і змінюють умови культивування культур (температура 12-20 °С, освітлення 500-1000 лк).

## **Лабораторна робота № 2. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН IN VITRO НА ПРИКЛАДІ ВИНОГРАДУ**

### Матеріали та обладнання

- ламінар-бокс;
- біокулярна лупа;
- інструменти (пінцети, скальпелі, препарувальні ігли);
- лабораторний посуд (чашки Петрі, колби Ерленмейєра на 250 мл, стаканчики, пробірки);
- стерилізуючі розчини (гіпохлорид натрію, 70% етанол);
- поживні середовища для культивування;
- рослинний матеріал.

### Практична частина

Існують декілька підходів до мікроклонального розмноження рослин in vitro.

#### 1 спосіб – отримання рослин з живців

Стерилізація рослинного матеріалу здійснюється за стандартною методикою. Пагони винограду розрізають на чубки довжиною 3-5 мм, які мають одну пазушну бруньку і розміщують їх у пробірки або колби на поживне середовище з низьким вмістом ІОК (0,1-0,2 мг/л). Культивування здійснюють при температурі 25-28 °С, освітленні 1000 лк протягом 3-4 тижнів.

#### 2 спосіб – отримання рослин через культуру меристем

У стерильних умовах під біокуляром з верхівкових та пазушних бруньок виділяють меристеми (довжина до 1 мм), відокремлюючи скальпелем примордіальні листочки. Ізольовані меристеми поміщають у рідке або на



поверхню твердого поживного середовища. Інкубацію меристем здійснюють при температурі 25-26 °С, інтенсивності освітлення 150 лк на першому місяці культивування та 500 лк – протягом другого місяця, дотримуючись 12-часового фотоперіоду. Пагони, що утворились у процесі культивування меристем, переносять на середовище з незначним вмістом ауксинів з метою їх укорінення.

### **Лабораторна робота № 3. КУЛЬТУРА ПИЛЯКІВ IN VITRO**

#### Матеріали та обладнання

- обладнання та реактиви для ведення культури in vitro за стандартними методиками;
- мікроскоп, об'єктиви x20, x40;
- розчин 2% ацетокарміна;
- предметне та покривне скельця.

#### Практична частина

Ефективність андрогенезу залежить від стану мікроспор на момент їх введення в культуру. У зв'язку з цим перед висадкою пиляків на поживні середовища необхідно провести цитологічний аналіз і визначити стадію розвитку мікроспор, що будуть використані в досліді. Для отримання гаплоїдів можна використовувати тільки ті мікроспори, які знаходяться на одноядерній стадії. Визначення стадії розвитку мікроспори здійснюють за допомогою фарбування їх 2% ацетокарміном та наступним мікроскопічним аналізом. Відібраний рослинний матеріал стерилізують 70% етанолом, виділяють пиляки в стерильних умовах та розміщують їх на поверхні твердого поживного середовища. Для культивування ізольованих пиляків найчастіше використовують середовища Уайта, Мурасиге і Скуга та Нича. Інкубацію пиляків здійснюють при температурі 24-27 °С, інтенсивності освітлення близько 2000 лк та фотоперіоді 14/10 год. Для отримання рослин з мікроспор у культурі пиляків необхідно від 3 до 8 тижнів.

## Лабораторна робота № 4. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ МЕЗОФІЛА ЛИСТА

### Матеріали та обладнання

1. Асептичні рослини.
2. Стерильний посуд та інструменти:
  - чашки Петрі (6 см та 10 см в діаметрі);
  - колби Ерленмейєра (50 мл);
  - пастерівські піпетки;
  - колби з скляними воронками та нейлоновими фільтрами (діаметр пор фільтра – 60 мкм);
  - механічні піпетки з наконечниками на 1 мл та 10 мл;
  - центрифужні пробірки на 10 мл;
  - мембранні фільтри фірми „Millipore” з діаметром пор 0,2 мкм або 0,4 мкм;
  - шприц з насадкою для фільтрів „Millipore”;
  - пінцети та скальпелі;
  - стерильні розчини ферментів:
    - 0,5% Driselase ( “Sigma”, США );
    - 0,8% Cellulysin, 0,4% Macerase ( “Calbiochem”, США ), які готуються на 0,5 М розчині сахарози і 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, рН 5,5 - 5,8;
  - стерильні поживні середовища;
  - ламінар-бокс;
  - центрифуга;
  - інвертований мікроскоп;
  - камера Горяєва або Фукса-Розенталя;
  - штатив для пробірок.

### Практична частина

Протопласти отримують завдяки обробці тканин рослин ферментними розчинами целюлази, пектинази, дрейселази, мацерази, які готуються безпосередньо перед дослідом. Розчини ферментів стерилізують, продавлюючи

їх через мембранні фільтри фірми „Millipore”. Для ферментації використовують молоді листочки, з яких попередньо знімають нижній епідерміс для кращого проникнення ферментів між клітинами. Очищене від епідермісу листя розміщують на поверхні рідкого ферментного розчину в чашки Петрі та поміщають у термостат, де відбувається інкубація при температурі 28-30 °С протягом 15-18 годин.

Отримані суспензії протопластів фільтрують через нейлонові фільтри з метою очищення від крупних фрагментів тканин і переносять у центрифужні пробірки. Повного очищення протопластів від фрагментів зруйнованих тканин і клітин, а також ферментів досягають за допомогою трьохкратного центрифугування суспензії протопластів при 1000 об/хв протягом 3 хвилин в розчині, що не містить ферментів. При таких умовах життєздатні протопласти спливають на поверхню і їх відбирають за допомогою пастерівської піпетки. Відібрані протопласти ресуспендують у невеликій кількості (0,5 мл) середовища, яке будуть використовувати для культивування протопластів (Мурасиге і Скуга, Као і Міхайлюка), після чого акуратно переносять в чашку Петрі (6-10 см в діаметрі), в яку попередньо вносять 6-10 мл ідентичного середовища. Оптимальна щільність висіву протопластів має складати біля  $10^3$  клітин в 1 мл середовища. Контроль за щільністю висіву здійснюють за допомогою камери Горяєва або Фукса-Розенталя.

Культивування протопластів здійснюється на розсіяному світлі або в термостаті при температурі 26-28 °С. Якість протопластів і контроль за їх поділом здійснюють за допомогою інвертованого мікроскопа.

## Лабораторна робота № 5. ІНДИВІДУАЛЬНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ У МІКРОКРАПЛЯХ

### Матеріали та обладнання

1. Обладнання та реактиви для культивування протопластів за стандартними методиками.
2. Матеріали, обладнання і реактиви для індивідуального культивування протопластів:
  - ламінарний бокс;
  - інвертований мікроскоп;
  - маніпулятор Фонбрюна (з комплекту мікроманіпуляторів КМ-2);
  - установка для витягування капілярів ПВК-1;
  - мікроузня МЕ – 4;
  - мікроаплікатор;
  - скляні трубки і тефлоновий шланг різного діаметру, держателі капілярів з комплекту КМ – 2;
  - парафінове та вазелінове масло.

### Практична частина

Експериментальна робота, пов'язана з культивуванням протопластів, потребує особливої уваги до чистоти посуду та реактивів. Всі середовища, які будуть використовуватись у роботі, потрібно обов'язково профільтрувати крізь нейлонові фільтри з метою очищення від часток, що здатні засорити мікропіпетки. Для збереження стерильності всі роботи проводяться в ламінарному боксі, де поміщається вся установка, інструменти та реактиви.

Роботу по індивідуальному культивуванню протопластів у мікрокраплях можна розділити на дві частини:

- підготовчі операції;
- основні операції.

### Підготовчі операції

Виділення протопластів. Проводиться по стандартним методикам.

Виготовлення мікропіпеток. Використовуючи мікрокузню ME-4, з тонкостінних капілярів діаметром 1,5 мм витягують мікропіпетки діаметром близько 100 мкм. Кінчики мікропіпеток вигинають. Капіляри витягують з скляної трубки на приборі ПВК – 1.

Підготовка масла. Парафінове та вазелінове масло заливають в розділяючій воронці деіонізуючою водою (провідність не вище 0,3 мікросіменс) у співвідношенні 1:1-1:2. Воронку встряхують до отримання тонкої емульсії і залишають у вертикальному положенні для відстоювання. Воду, яка збирається внизу воронки, зливають. Процедуру повторюють 5 раз. Після цього масло центрифугують для видалення найменших краплин води (120 хв при 20 000 об/хв).

## **Лабораторна робота № 6. МЕТОДИ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ РОСЛИН. ОТРИМАННЯ СОМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ**

### Матеріали та обладнання

#### 1. Обладнання:

- ламінарний бокс;
- інвертований мікроскоп;
- автоматичні мікропіпетки.

#### 2. Рослинний матеріал:

- стерильні рослини;
- калусна культура;

#### 3. Хімічні реактиви:

- ферментні суміші і середовища для виділення протопластів за стандартними методиками; поживні середовища для культивування протопластів;
- розчин поліетиленгліколя ( ПЕГ );
- буферний розчин;
- 0,4 М манітол.

#### 4. Лабораторний посуд та інструменти:

- чашки Купрака;
- наконечники для мікропіпеток;
- лабораторний посуд і інструменти, необхідні для виділення і культивування протопластів за стандартними методиками.

Всі перераховані матеріали та інструменти використовуються стерильними.

### Практична частина

Основною проблемою соматичної гібридизації є ідентифікація гібридних клітин і відокремлення їх від батьківських. Для полегшення відбору гетерокаріоцитів для дослідження найчастіше використовують протопласти, отримані з клітин, які мають значні морфологічні відмінності. Так, калюсні протопласти багаті цитоплазмою, з ярко вираженими тяжами, добре помітним ядром, протопласти, отримані з мезофілу листа, мають зелені пластиди, мало цитоплазми, велику вакуоль. Використання калюсних та мезофільних протопластів для соматичної гібридизації полегшує вирішення зазначеної проблеми.

Джерелом отримання калюсних протопластів може бути як первинний калюс, так і ті калюсні тканини, що зазнали більш довготривалого культивування в умовах *in vitro*. Для отримання мезофільних протопластів найкраще використовувати листя рослин, які вирощувались у стерильних умовах. Ферментацію проводять при 25 °С протягом 14-16 годин у темноті. Для синхронного виділення калюсних і мезофільних протопластів фермент, який використовується для виділення протопластів з мезофілу, має бути розбавлений в 2 рази середовищем, в якому будуть культивувати протопласти.

Отримані протопласти фільтрують через капронову сіточку з діаметром пор 60-100 мкм, фільтрат центрифугують 3-4 хв при 100-150 g. Надосадову рідину удаляють, протопласти ресуспензують в 10 мл 0,4 М маніта і повторюють процедуру 2 рази. Іноді необхідна очистка протопластів за допомогою градієнта щільності сахарози (0,5 М). Це дає можливість видалити з

суспензії протопластів мертві клітини та залишки клітинних стінок, які б заважали наступному злиттю протопластів.

Злиття протопластів здійснюють шляхом змішування двох суспензій: калюсних та мезофільних протопластів у співвідношенні 2:1. Змішану суспензію протопластів невеликими краплями (діаметром близько 1 мм) за допомогою мікропіпетки наносять на поверхню чашки Петрі і залишають на 10-20 хв для осідання. Після проходження зазначеного часу до суміші протопластів додають 1-3 краплі ПЕГ і витримують 5-25 хвилин. Розчин ПЕГ готується за прописом: у 100 мл дистильованої води розчинюють 2 г глюкози, 150 мг  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 г ПЕГ з мол. вагою 6000. Під впливом ПЕГ відбувається злипання та агрегація протопластів і утворення гібридних клітин. Після злиття суміш гібридних та батьківських протопластів культивують на багатих органічними добавками поживних середовищах.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

На сьогоднішній день для прискорення та удосконалення селекційних програм, основною метою яких є створення нових форм сільськогосподарських рослин, активно використовуються різноманітні біотехнологічні прийоми. Основними методичними підходами для підвищення генетичного різноманіття серед важливих для селекції сортів рослин є такі: отримання гомозиготних ліній за рахунок створення дигаплоїдів; добір соматональних варіантів, у тому числі отриманих за рахунок штучного мутагенезу; отримання фертильних міжвидових та міжродових гібридів завдяки використанню прийомів ембріокультури *in vitro*, тощо.

Розвиток ДНК-технологій дозволяє ще більше підняти ефективність процесу створення генетично змінених форм живих організмів та прискорити процеси вдосконалення важливих сільськогосподарських рослин з метою збільшення їх врожайності, поліпшення смакових якостей та підвищення стійкості до хвороб і шкідників.

У зв'язку з вищесказаним, з'являється потреба в постійному надходженні на ринок праці фахівців-біотехнологів високої кваліфікації, що володіють прийомами та методами культивування клітин, тканин та органів рослин *in vitro*.

Навчально-методичний посібник «Біотехнологія рослин» забезпечує можливість ознайомлення з основними методами та прийомами, що використовуються у сучасних біотехнологічних лабораторіях усього світу. Матеріали, викладені в посібнику, надають студентам всі необхідні для теоретичної підготовки спеціаліста знання, а також забезпечують можливість вдосконалення практичних навичок на лабораторних заняттях, які описані в методичній частині посібника.



## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Адамс Р. Методы культивирования клеток для биохимиков. – М.: Мир. – 1983. – 256 с.
2. Бекер М. Е., Лиепиньш Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология. – Агропромиздат, 1990. – 334 с.
3. Биотехнология: Учебное пособие для вузов в 8-ми книгах.
  - Кн. 1: Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуилов. Проблемы и перспективы. – М.: Высшая школа, 1987. – 148с.
  - Кн. 2: В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. – М.: Высшая школа, 1988.–208 с.
  - Кн. 3: Р. Бутенко. Клеточная инженерия растений. М.: Высшая школа, 1989. – 127 с.
  - Кн. 5: В. А. Быков, М. Н. Манаков, В. И. Понфилов, А. А. Свитцов, Н. В. Тарасова. Производство белковых веществ. – М.: Высшая школа, 1987. –155 с.
  - Кн. 6: В. А. Быков, И. А. Крылов, М. Н. Манаков, Н. С. Марквичев, О. М. Орлова, Н. В. Тарасова. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.
  - Кн. 7: И. В. Березин, Н. Л. Клячко, А. В. Левашов, К. Мартинек, В. В. Можаяев, Ю. Л. Хмельницкий. Иммуобилизованные ферменты. – М.: Высшая школа, 1987. – 159 с.
  - Кн. 8: И. В. Березин, А. А. Клесов, В. К. Швядас, Н. Н. Угарова, С. Д. Варфоломеев, А. И. Ярополов, Н. Ф. Казанская, А. М. Егоров. Инженерная энзимология. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.
4. Биотехнология. Под. ред. А. А. Баева. – М.: Наука, 1984. – 231 с.
5. Биотехнология. Принципы и применение. Под. ред. И. Хиччинса, Д. Беста, Д. Джонса. – М.: Мир, 1988. – с. 273.
6. Биотехнология клеток животных. Под ред. Р.Е. Спiera и Дж. Б. Гриффитса. – М.: Агропромиздат, 1989. – 301с.

7. Болвел П. Г., Чапман Ж. В. Биотехнология растений: культура клеток. – М.: Агропромиздат, 1989. – 298 с.
8. Борисюк Н. В., Зубко М. К., Кириченко И. В., Махорина О. К. и др. Методы клеточной биотехнологии растений. – К.: Институт ботаники им. Н. Г. Холодного, 1987. – 53 с.
9. Вакула В. Л. Биотехнология, что это такое? – М.: Молодая гвардия, 1989. – 154 с.
10. Варфаломеев С. Д. Инженерная энзимология. – М.: Высшая школа, 1987. – 87 с.
11. Варфаломеев С. Д., Калюжный С. Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: Высшая школа, 1990. – 210 с.
12. Воробьева Л. И. Техническая микробиология. – Изд-во МГУ, 1987. – 195 с.
13. Генетика промышленных микроорганизмов и биотехнология. Под ред. В. Г. Дебабова – М.: Наука, 1990. – 212 с.
14. Геном, клонирование, происхождение человека. Под ред. Л. И. Корочкина. – Фрязино: «Век 2», 2004. – 224 с.
15. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. – К.: Наук. думка, 1982. – 104 с.
16. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. – М.: Мир, 2002. – 588 с.
17. Запорожан В. Н., Бажора Ю. И. Стволовые клетки. – Одесса: Одесский медуниверситет, 2004. – 227 с.
18. Криобиология и биотехнология. Под ред. А. А. Цуцаевой. – К.: Наукова думка, 1987. – 196 с.
19. Кучук Н. В. Генетическая инженерия растений. – К.: Наукова думка, 1997. – 152 с.
20. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 315 с.
21. Сассон А. Биотехнология: Свершения и надежды. – М.: Мир, 1987. – 167 с.
22. Сельскохозяйственная биотехнология. Под ред. В. С. Шевелухи. – М.: Высшая школа, 1998. – 142 с.

Навчальне видання

**Задерей** Наталя Сергіївна

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН**

НАВЧАЛЬНО-МЕТОДИЧНИЙ ПОСІБНИК

*В авторській редакції*

Підп. до друку 18.08.2015. Формат 60x84/16.  
Умов.-друк. арк. 4,77. Тираж 70 пр.  
Зам. № 1211.

**Видавець і виготовлювач**  
**Одеський національний університет**  
**імені І. І. Мечникова**

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12  
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua