

ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

In 1838, **Schwann** і **Scheiden** висунули так звану теорію тотипотентності, в якій йдеться про те, що клітини є автономними і здатні регенерувати повноцінну рослину. Їх теорія була насправді основою для культури клітин і тканин рослин. Перші спроби культивування ізольованих тканин рослин були зроблені наприкінці XIX - на початку XX ст. і пов'язані із прізвищами Г.Фьохтінга (Vochting H.), К.Рехінгера (Rechinger C.) та Г.Хаберландта (Haberlandt G.). **Фьохтінг** в 1878-1892pp вивчав явища регенерації і полярності у вищих рослин, вирощуючи в ізольованих умовах невеличкі шматочки різних тканин. Он показав что полярность присуща даже самым маленьким фрагментам ткани, и предположил, что она является свойством самой растительной клетки. **Рехінгер** у 1893р розміщував сегменти стебла тополі, кореня буряка і кульбаби на вологому піску (фільтрі) і спостерігав калусоутворення на зрізах. Уменьшая размер кусочка, он пытался индуцировать рост минимальной группы клеток, но срезы тоньше 1,5мм не образовывали каллуса. У 1902 р. німецький ботанік і фізіолог **Хаберландт** перший чітко обгрунтував ідею про можливість вирощування окремих рослинних тканин на штучних поживних середовищах. Були й інші дослідники. **Р.Броун** і **М.Моріс** (Brown, Morris, 1892) та **Р.Сахс** (Sachs, 1893) першими пробували вирощувати ізольовані зародки рослин у штучних умовах.

У 1922 р. американський дослідник **В.Робінс** (W.Robbins) і незалежно німецький учений **В.Коте** (W.Kotte) довели можливість культивування на синтетичному поживному середовищі меристеми кінчиків кореня томатів і кукурудзи. Однак жоден із згаданих вище дослідників не отримав субкультивованої *in vitro* культури тканин або клітин (т.е. не пересаживали). Тому викладене вище слід вважати скоріше передісторією методу культури тканин рослин.

Детальна розробка цього методу була здійснена у 30-х роках XX ст. працями Філіпа Уайта (P.White) в США та Роже Готре (R.Gautheret) у Франції. Вони почали з аналізу і повторення дослідів Робінса і Коте і показали, що коли кінчики культивованих коренів періодично пересаджувати на свіже поживне середовище, вони ростуть і культивують необмежено в часі.

Уайт вперше розробив склад поживного середовища для вирощування ізольованих тканин і органів, який використовується і дотепер, встановив, що коренева меристема зберігає здатність до необмеженого в часі росту *in vitro*, підтримував культуру коренів деяких рослин, зокрема томатів, пересаджуючи їх кінчики, понад 30 років. Першим повідомив про контрольований органогенез, отримавши пагони на калусі гібрида тютюну *in vitro*. Ці та інші багаторічні результати описані ним у публікаціях (White, 1934; Уайт, 1949).

Готре використовував головним чином камбій стебел як деревних, так і трав'янистих рослин, а також тканини (камбій і флоему) коренеплодів і бульб. Він вивчив близько 150 різних видів рослин, одержав субкультивовану культуру тканин від майже 100 видів рослин, розробив нові поживні середовища, вперше ввів до їх складу ауксин і показав його здатність стимулювати поділ клітин камбію. Отримані ним деякі калусні культури (зокрема, від камбію і флоєми моркви та камбію верби) вирощувались *in vitro* в пересадній культурі понад 50 років, і, можливо, вирощуються і дотепер. Монографія Р.Готре (Gautheret, 1959), що підсумувала головні відомі на той час результати експериментів із культурою тканин, є

енциклопедією для дослідників, та і нині має не лише історико-бібліографічну, а й наукову цінність.

Наприкінці 50-х років ХХ ст. дослідями американського вченого Френсіса **Скуга** і **К.Міллера** із співробітниками, які у той час працювали із культурою тканин тютюну, був знайдений новий регулятор росту - кінетин (6-фурфуриламінопурин), виділений методом лужного гідролізу із старого препарату ДНК молочка оселедця (Skoog, Miller, 1957). Це було відкриття нового класу фітогормонів — цитокінінів, речовин, що стимулюють поділ клітин і є необхідними факторами індукції органогенезу і регенерації *in vitro*. Було показано можливість утворення коренів і пагонів з калусної тканини при дії цитокінінів та ауксинів. Зокрема, кінетин виявився спроможним у комбінації з ауксином 3-індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК) стимулювати поділ клітин шматочка серцевинної паренхіми тютюну, позбавленої провідних пучків і камбію. Клітини серцевинної паренхіми вміщували на поживне середовище з ІОК, але без додавання кінетину вони не ділилися. У наступних роботах комбінацію одного ауксину з цитокініном (кінетин та інші 6-заміщені амінопурини) широко використовували під час культивування *in vitro*. Залежно від концентрації і співвідношення стимуляторів можна було посилювати поділ клітин експланта, підтримувати ріст калусної тканини, індукувати морфогенез.

Пізніше **Ж.Морель** (Mogel) встановив, що ще один фітогормон - гіберелін - індукує проліферацію меристем та їх диференціювання із утворенням цілої рослини.

З цих часів починається стрімкий розвиток нового напрямку в експериментальній біології — культури ізольованих тканин і клітин рослин. З цього часу починається ера синтетичних поживних середовищ чітко визначеного хімічного складу, які замість регуляторів росту невизначеного складу містять ауксин, цитокінін, гіберелін або інші фітогормони та їх синтетичні аналоги. Такі середовища придатні для вирощування будь-яких клітин і тканин будь-якого виду рослин. Започаткували цю еру Тошіо **Мурасіге** та Френсіс **Скуг**, які розробили в 1962 р. нове поживне середовище, найвідоміше і найуживаніше вже протягом 40 років (Murashige, Skoog, 1962).

На основі цього середовища, а також мінеральних складових середовищ, запропонованих раніше Р.Готре, Ф.Уайтом та У.Хеллером (Heller, 1953), нині розроблено десятки різних за складом поживних середовищ, оптимальних для різних видів рослин, типів тканин, клітин, органів і клітинних штамів. Вони широко використовуються для вирощування клітин і тканин рослин як для фундаментальних досліджень у галузі фізіології, біохімії, клітинної біології тощо, так і в прикладних дослідженнях та в промислових технологіях у рослинництві (Бутенко, 1964; Валиханова, 1996; Кучко, Олійник, 1998 та ін.).

Було також вивчено значення макро- і мікроелементів, вітамінів, цукрів і стимуляторів росту рослинного походження (незрілі ендосперми кокосового горіха (вперше **van Overbeek**, 1941 для зародків *Datura*), кукурудзи, каштана, дріжджовий екстракт тощо). Більшість рослинних тканин вирощували на середовищах, що містили складні органічні суміші, які використовували як стимулятори. Ці середовища сприяли підтриманню неорганізованого клітинного росту і стимуляції процесів органогенезу, соматичного ембріогенезу в культурі калусних тканин і клітинних суспензій.

У цей же період був розроблений метод одержання і вирощування великих кількостей клітинних суспензій (L. **Nickell**, W. **Tulecke**, 1959), а також метод культивування окремої, виділеної із суспензії, клітини, поділ якої індукувався за допомогою тканини-«няньки» (**Jones et al.**, 1960; **Павлова, Бутенко**, 1969).

Роботами **Ф.Стюарда** (1958) і **Дж.Рейнгерта** (1959) експериментально продемонстровано здатність ізольованих соматичних клітин утворювати зародкоподібні структури, що поклало основу вивченню соматичного ембріодогенезу в штучних умовах.

Розроблено метод культури меристем (**Morel**, 1959; **Бутенко**, 1964), яким можна швидко і з високим коефіцієнтом клонально розмножувати їх в асептичних умовах. Було показано, що рослини, отримані з меристем, у деяких випадках вільні від вірусних інфекцій. Тестування їх на відсутність вірусів і клональне розмноження дало змогу одержувати оздоровлений посадковий матеріал рослин.

Початок 70-х років характеризує розвиток нових напрямків біотехнології рослин - соматичної гібридизації і генної інженерії. Цілеспрямоване конструювання штучним шляхом рекомбінантних ДНК з метою одержання спадково змінених організмів пов'язане із роботами **Пола Берга**, **Дж.Беквіса**, **Гобінда Корани** та ін.

Найважливішою подією в біотехнології в період з 1960 по 1975 р. була розробка професором **Ноттингемського університету** (Англія) **Е.Кокінгом** (**Cocking**, 1960,1972) методу одержання ізольованих протопластів із тканин кореня і плодів томатів, оброблених сумішшю пектолітичних і целюлітичних ферментів, виділених із культуральної рідини грибів. Серед основних робіт по виділенню і злиттю протопластів необхідно відмітити публікації **Е.Такебе** (1971), **К.Као** (1975). Ізольовані протопласти вивели клітину з «дерев'яної в'язниці» і відкрили перспективи різних маніпуляцій з ними. Були знайдені умови культивування ізольованих протопластів, за яких вони утворювали нову клітинну стінку, ділились і давали початок клітинним лініям, спроможним у ряді випадків до морфогенезу. Водночас ізольовані протопласти, що ще не утворили клітинну стінку, були використані для розробки методів соматичної гібридизації методом злиття протопластів за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) і введення в них вірусних РНК, клітинних органел, клітин бактерій. Перші соматичні гібриди слугували моделями для вивчення поведінки ядерного і цитоплазматичного геномів — партнерів у гібридних клітинних лініях і в нащадків соматичних гібридів рослин (**Глеба**, **Ситник**, **Бутенко**, 1974-1979).

Багато уваги в цей період приділяли індукції морфогенезу в культурі тканин і клітин. Велике значення для фундаментальних і прикладних досліджень мало відкриття індукції андрогенезу в умовах культивування ізольованих пиляків (**Guha**, **Maheshwari**, 1964) і використання андрогенезу для одержання гаплоїдних ліній і подвоєних гаплоїдів з них. Вперше були отримані і вивчені рослини-регенеранти тютюну, що є соматоклональними варіантами вихідної форми (**Загорська та ін.**, 1971).

Розробка методів електрозлиття ізольованих протопластів (**Zimmerman et al.**, 1984) і різноманітних методів селекції гібридних клітин значно полегшила гібридизацію соматичних клітин рослин.

Застосування молекулярних маркерів ДНК (для аналізу безпосередньо геному) розпочалось після відкриття у рослин і тварин явища поліморфізму довжини

рестриктних фрагментів геномної ДНК (ПДРФ), яке описали **Бекман** та **Солер** (Beckmann J. S., Soller M., 1983). Новий етап у застосуванні молекулярно-генетичних маркерів (детекція патогенів, добір за потрібними ознаками) розпочався після розробки методик із використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), описаної **Saiki** та ін. (Saiki et al., 1988).

У 1985 р. отримано перші трансгенні рослини, стійкі проти шкідників, а у 1987 р. - трансгенні рослини, стійкі проти гербіцидів суцільної дії. В 1988 р. створено перший трансгенний злак - кукурудза, а у 1994 р. в США зареєстровано трансгенні томати для комерційного використання. У 1997 р. синтезовано гемоглобін у трансгенному тютюні, у 2000 р. створено кукурудзу, яка синтезувала білок молока свиноматки.

На Україні перші експериментальні спроби по культивуванню тканин рослин були зроблені у 1949 році в Інституті фізіології рослин АН УРСР (відділ росту і розвитку). Саме звідси, під керівництвом професора Ф Л Калініна, вийшла перша хвиля кваліфікованих національних кадрів з біотехнології рослин (В.В.Сарнацька, В.Е.Поліщук, В.К. Мусіяка, Л.В Желтоножська), які відомі роботами по вивченню фізико-хімічних і біохімічних механізмів пухлинної трансформації рослинних клітин, мікроклональному розмноженню та ін.

Крім цього наукового центру, теоретичні і практичні питання біотехнології вирішуються в інших наукових та вищих навчальних закладах України. Серед них — Інститут фізіології рослин і генетики НАН, Інститут картоплярства, Інститут садівництва, Інститут цукрових буряків, Інститут винограду і вина "Магарач", Державний Нікітський ботанічний сад, Інститут рослинництва, Селекційно-генетичний інститут, Інститут олійних культур та інші.